(مقاله پژوهشی)

شناسایی ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس گیاه مریم گلی اصفهانی (*Salvia reuterana Bios*) و بررسی خواص آنتی میکروبی-آنتی اکسیدانی، محتوی فنولی و فلاونوئیدی کل عصاره گیاه

محمدحسن محمدی [1*] ،بهنام مهدوی[2]، هاشم اخلاقی فیض آباد[1]، حدیث فرمان برجعفرآبادی[2]

۱- گروه شیمی، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران.

۲- گروه شیمی، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۱۱ تاریخ پذیرش:۱۴۰۰/۰۷/۱۱

چکیده

مریم گلی اصفهانی با نام علمی *Salvia reuterana* متعلق به تیره نعناعیان ودارای پراکنش وسیعی در ایران است. به دلیل اثرات سرطانی آنتی اکسیدان های سنتزی موجود محققین تمایل زیادی به جایگزینی این مواد با ترکیبات طبیعی با خواص مشابه دارند. در پژوهش حاضر فعالیت آنتی اکسیدانی وآنتی میکروبی بخش های هوایی گیاه مریم گلی اصفهانی شامل گل و برگ به وسیله پنج آزمون تکمیلی فعالیت مهار رادیکال های آزاد، شلاته کنندگی یون آهن، تعیین محتوای فنولی تام، محتوای فلاونوئیدی تام و آزمون آنتی میکروبی مورد ارزیابی قرارگرفت. به این منظور، برگ‌ها وگل‌های گیاه مریم گلی اصفهانی‌در اردیبهشت ۹۳ از سبزوار جمع آوری شد. نمونه ها خشک، پودر و در حلال متانول خیسانده شدند و عصاره خام به‌دست آمده به ترتیب با حلال های n - هگزان، آب و اتیل استات جداسازی شد. نتایج نشان داد که بخش آبی گل در آزمون RSA بیشترین فعالیت را با مقادیر ۶/۳۵±۰/۲۹ µg/ml دارد. بخش اتیل‌استاتی برگ دارای بیشترین TFC با مقدار۱۷۶/۷۶±۱/۵۱ (mgRU/g) و بخش آبی و اتیل‌استاتی گل بیشترین TPC با مقدار۷۶/۵±۲/۰۷ و۶۸/۹۵±۲/۰۷ (mgGEA/g) بود. درآزمون آنتی‌میکروبی عصاره اتیل‌استاتی برگ و گل فعالیت آنتی‌میکروبی قابل توجهی را در مقابل *Citrobacter frurdii* و *Pseudomonas aeruginosa* نشان داد درحالی‌که در مقابل *Serratio(-)* فعالیت چندانی مشاهده نشد.

واژه های کلیدی: مریم گلی اصفهانی، فعالیت آنتی اکسیدانی، فعالیت آنتی میکروبی، مهار رادیکال آزاد.

[*]مسئول مکاتبات: mhmohamady@iaus.ac.ir

۱-مقدمه

مریم گلی اصفهانی با نام علمی *Salvia reuterana* متعلق به تیره نعناعیان ودارای پراکنش وسیعی در ایران می باشد. جنس سالویا یکی از جنس های مهم تیره نعناعیان می باشد که دارای حدود ۹۰۰ گونه در جهان و بیش از ۷۰ گونه در ایران است (۳). گونه مریم گلی اصفهانی گیاهی بوته ای، پایا و پوشیده از پرز است. این گیاه دارای خواص دارویی متعدد نظیر ویژگی‌های ضدباکتریایی وآنتی‌اکسیدانی است و همچنین در عطرسازی و تهیه چاشنی مورد استفاده قرار می‌گیرد. گیاهان بسته به گونه و عوامل محیطی مانند منطقه کشت، آب وهوا و زمان برداشت ترکیبات فعال وغلظت آن‌ها متفاوت است. این تیره در صنایع دارویی، خوراکی، زینتی، آرایشی، تولید عسل و ترکیبات آروماتیک اهمّیت زیادی دارد(۱). رادیکال های آزاد و فرم های مختلفی از اکسیژن فعال وگونه‌هایی از نیتروژن شناخته شده اند که با اکسیداسیون‌بافت‌های بدن نقش‌مهمی در ایجاد بیماری های مختلفی چون بیماری های قلبی عروقی، التهابی اختلالات عصبی، سرطان، فشارخون و پیری ایفا می کنند(۱۳). آنتی‌اکسیدان‌هاترکیباتی‌هستندکه‌قادرندتشکیل‌رادیکال‌های آزاد را از طریق میان‌کنش مستقیم با آن ها کاهش دهند و آن‌هاراغیرفعال‌کنندو یا اینکه خسارات‌ناشی از رادیکال های آزاد را محدود کنند. شواهد نشان می دهد که مکمل های گیاهی ممکن است اثرات آنتی اکسیدانی داشته باشند(۸). به دلیل اثرات سرطانی آنتی اکسیدان های سنتزی موجود، محققین تمایل‌زیادی به‌جایگزینی این مواد با ترکیبات طبیعی با خواص‌مشابه دارند. لذا در سال های اخیر تحقیقات در این زمینه رو به افزایش بوده است. بر طبق مطالعات برون‌زیست[1] برای عصاره های مریم گلی تأثیرات ضدمیکروبی، ضد سرطان، آنتی‌اکسیدانی و درمان بیماری‌های پیچیده مانند بیماری‌نارسایی‌مزمن‌کلیوی‌گزارش‌شده است(۹). گونه های مختلف سالویا برای انسداد شریان قلب، بیماری مغزی، هپاتیت، سیروز کبدی و بی خوابی های عصبی مفید شناخته شده‌اند(۱۱) .با توجه به مطالعات صورت گرفته بر روی دیگر گونه‌های این جنس، این گیاه می تواند منبعی از آنتی اکسیدان‌ها باشد. از آن‌جاکه‌بادرنظرگرفتن‌مطالب فوق و خواص دارویی گیاه مریم‌گلی اصفهانی و این که تاکنون هیچ بررسی برای تعیین‌خاصیت‌آنتی‌اکسیدانی‌این‌گیاه‌درمنطقه‌خراسان صورت نگرفته‌است، گونه مورد نظر برای شناسایی ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس، بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی و فعالیت ضد میکروبی انتخاب شده است.

۲-مواد وروش ها

هیدروکسیدپتاسیم، کلریدآلومینیوم‌وکربنات‌سدیم، گالیک اسید(GA)، ۲و۲-دی‌فنیل-۱-پیکریل‌هیدرازیل (DPPH)، معرف‌فروزین[2] ازشرکت‌مرک‌آلمان، کلریدآهن($FeCl_3$)، معرف‌سیوکالتیو[3](FCR)ازشرکت‌فلوکا، هیدروکسیتولوئن بوتیل‌دار شده[4] (BHT)، روتین[5](Ru) از شرکت سیگما آلدریچ‌تهیه‌شدند.بخش‌های هوایی گیاه مریم گلی اصفهانی که‌درفصل‌بهارازمنطقه شمال سبزوار از حاشیه جاده افچنگ جمع‌آوری و پس از خشک کردن در نور غیر مستقیم، ذخیره شد. برای تهیه عصاره متانولی، هر بخش از گیاه پس از آسیاب شدن به مدت۷۲ ساعت در حلال متانول خیسانده و پس‌از صاف کردن عصاره مادر در دستگاه روتاری تغلیظ شد. درادامه، برای جداسازی ترکیبات گیاه براساس قطبیت، عصاره به‌دست آمده دوباره در مقدار مشخص متانول حل شد و سپس به ترتیب با حلال n - هگزان و اتیل‌استات شسته و محلول حاصل از هر مرحله تغلیظ شد(۴).

۲-۱- تست فیتوشیمیایی

به‌منظورتعیین‌نوع‌ترکیبات آنتراکینونی، فلاونوئیدی و فنولی درهربخش، بعد از بررسی‌های لازم بر روی پروفایل[6]TLC بخش‌های مختلف عصاره‌ها حضور یا عدم حضور هر گروه از ترکیبات طبیعی ذکر شده با مشاهده تغییر رنگ لکه‌های موجود بر روی TLC با استفاده از معرف‌های لازم مشخص

1- In vitro

2- Ferrozine
3- Ciocalteu
4- Butylated hydroxytoluene
5- Rutin
6- Thin Layer Chromatography

گردید. (جدول- ۱) معرف‌ها و تغییر رنگ‌ها به ترتیب به صورت: محلول اتانولی ۵٪ KOH - قرمز رنگ؛ محلول متانولی ۱٪ $AlCl_3$ - زرد یا نارنجی رنگ؛ محلول آبی ۱٪ $FeCl_3$-آبی یا سبز رنگ. همچنین از معرف واگنر و تست سالکوسکی برای شناسایی ترکیبات آلکالوییدی (تشکیل رسوب‌قهوه ای) وترکیبات استروییید-ترپنوییید(تشکیل دوفاز به رنگ قرمز یا نارنجی) استفاده شد(۲۰).

جدول ۱-حضور متابولیت های ثانویه موجود در عصاره گیاه مریم گلی اصفهانی

ترکیبات	گل(۱)	برگ(۱)	گل(۲)	برگ(۲)	گل(۳)	برگ(۳)
آلکالوئید	+	-	-	-	+	-
آنتراکینون	-	+	-	-	+	+
فلاونوئید	+	+	-	-	+	+
فنول	+	+	-	-	+	+
استروئید-ترپنوئید	+	-	+	-	-	-

(۱)-فاز آبی (۲)-فاز n-هگزانی (۳)-فاز اتیل استاتی

۲-۲-تست آنتی‌میکروبی

ابتدادیسک‌هایی‌از جنس کاغذ کروماتوگرافی‌به قطر 6mm تهیه شده و همراه با دیگر ظروف مصرفی برای استریل شدن دردستگاه‌اتوکلاوقرارگرفت. روی هرکدام از این‌دیسک ها ۳۰ میکرولیتر از عصاره های متانولی گل و برگ گیاه با غلظت ۱۰۰mg/mL ریخته و برای استفاده های بعدی در یخچال نگهداری شد(۴).

۲-۳-میکروارگانیسم ها

میکروارگانیسم‌های مورد استفاده در این تحقیق ۹ باکتری گرم منفی شامل، سودوموناس آئروژینوزا[1]، اشریشیا کلی[2]، استافیلوکوکوس کواگولاز[3]،سیتروباکترفروندی[4]، انتروباکتر[5] آسینتوباکتر[6]، سراشیا[7]، کلبسیلا پنومونیه[8] و یک باکتری گرم مثبت استرپتوکوک پنومونیه[9] بوده است.. تمامی این میکروارگانیسم‌هاازآزمایشگاه زیست شناسی دانشگاه حکیم سبزواری و دانشگاه علوم پزشکی سبزوار تهیه شده‌است.

۲-٤-سنجش مهار رادیکال‌های آزادDPPH (RSA)

۲و۲-دی‌فنیل-۱-پیکریل‌هیدرازیل(DPPH) یک رادیکال آزادپایداراست.این‌ترکیب در مجاورت با یک ترکیبدهنده، یک‌هیدروژن دریافت‌کرده و به فرم کاهش‌یافته خود تبدیل می شود. به دلیل‌یک جذب‌قوی در ناحیه ۵۱۷nm رادیکال DPPH در حالت محلول دارای رنگ ارغوانی تیره است و درمجاورت‌یک‌مولکول دهنده الکترون کاهش‌یافته و خنثی می شود و به شکل بی رنگ یا زرد روشن تغییر می‌کند(۶). میزان‌کاهش‌رنگ‌محلول DPPH متناسب با کاهش توانایی رادیکال‌است. این کاهش به‌وسیله رسیدن یک اتم هیدروژن ازمولکول‌آنتی‌اکسیدان به الکترون منفرد اتم نیتروژن در DPPH انجام می شود(۱۷). در این روش ۱/۵میلی لیتراز هر عصاره با غلظت(۸۰،۶۰،۴۰،۲۰µg/ml) به۱میلی لیتر از محلول‌های‌متانولی‌DPPH ۰/۱میلی‌مولارافزوده شد. مخلوط حاصل پس از یک دقیقه تکان شدید به مدت۹۰ دقیقه در تاریکی و دمای اتاق باقی ماند تا واکنش آن کامل شود، سپس جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۵۱۷ نانومتر با دستگاه اسپکتروسکوپی PHotonix Ar 2015 خوانده شد. تمام اندازه گیری ها با سه بار تکرار انجام شدند. در این تحقیق از

1- Pseudomonas Aeruginosa
2-Escherichia Coli
3- Staphylococcus Coagulase
4- Citrobacter Freundii
5- Enterobacter
6- Acinetobacter
7- Serratia
8- Klebsiella pneumoniae
9- Streptococcus Pneumonia

α-توکوفرول و BHT به‌عنوان استاندارد استفاده شد(۴). درصد بازدارندگی عصاره ها از طریق فرمول زیر محاسبه شد:

RSA (%)= [(Ac-As)/Ac] ×100

که در آن Ac جذب کنترل (محلول DPPH) و As جذب نمونه است.

۲-۵- یون های آهن

FeSO4 (۲mM) به ظرف محتوی ۱میلی لیتر از عصاره (با غلظت‌های۲۰، ۴۰، ۶۰ ،۸۰)و ۲ میلی لیتر آب مقطر افزوده شد، واکنش با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر از فروزین (۵mM) آغاز شد. مخلوط واکنش به شدت تکان داده شده و پس‌از۱۰ دقیقه جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۶۲nm اندازه‌گیری شد. این تست باEDTA و آسکوربیک اسید نیز به عنوان استاندارد، در غلظت های مشابه با نمونه‌ها انجام شد(۱۲). درصد بازدارندگی کمپلکس فروزین- آهن(II) به‌وسیله‌ی رابطه ی زیر محاسبه شد:

FIC(%)= [(Ac-As)/Ac] ×100

که در آن Ac جذب کنترل (محلول فروزین) و As جذب نمونه است.

۲-۶-اندازه‌گیری محتوای کل ترکیبات فنولی(TPC)

ترکیبات پلی فنولی موجود در گیاهان با معرف اکسایش کاهش خاصی به نام فولین سیوکالتیو واکنش می‌دهند و وکمپلکس آبی‌رنگی که‌به‌وسیله‌اسپکتروفوتومتر UV-VIS قابل‌اندازه‌گیری‌است‌تشکیل‌می‌شود. معرف فولین سیوکالتیو مخلوطی‌شامل فسفوتنگستیک($H_3PW_{12}O_{40}$)و فسفومولیبدیک اسید($H_3PMo_{12}O_{40}$) است که در مجاورت محلول قلیایی سدیم کربنات (Na_2CO_3)تجزیه وبه کروموفورآبی تبدیل می‌شود(۲۲).محتوای کل ترکیبات فنولی عصاره ها به روش فولین‌سیوکالتیو(FCR) انجام شد. به طور خلاصه ۰/۵ میلی‌لیترازمعرف‌آبی٪۱۰FCRبه ظرف محتوی۰/۵میلی لیتر از هر عصاره با غلظت‌های (mg/mL۱۰۰۰)و ۱/۵میلی لیتر آب مقطر اضافه و مخلوط حاصل به‌شدت هم زده شد.پس ازدو دقیقه ۲ میلی لیتر از محلول سدیم کربنات ۱۰٪ اضافه و مخلوط دوباره به شدت هم زده شد. محلول به مدت ۲ساعت دردمای‌اتاق و درتاریکی‌قرارگرفت و سپس جذب جذب آن توسط اسپکتروفتومتر UV-VIS در طول موج ۷۶۰nm اندازه گیری شد. آزمایش برای هر نمونه سه بار تکرارشد،دراین‌تست‌ازگالیک‌اسیددرغلظت (۲۰،۴۰،۶۰،۸۰ µg/ml) به‌عنوان استاندارد استفاده شد. نمودار استاندارد گالیک اسیدبرای تعیین‌محتوای‌کل‌فنولی برحسب میلی گرم گالیک اسید در گرم عصاره خشک(mgGEA/g)استفاده شد. (۴)

۲-۷-اندازه‌گیری‌محتوای‌کل‌ترکیبات فلاونوئیدی(TFC)

محتوای‌کل‌فلاونوئیدعصاره ها با استفاده از آلومینیوم کلراید تخمین‌زده شد و نتایج بر حسب میلی‌گرم روتین درگرم عصاره خشک(mgRU/g) بیان شد. .۱میلی‌لیتر از هر عصاره(۱۰۰µg/ml) با ۱میلی لیتر محلول متانولی آلومینیوم کلراید (۲٪) مخلوط شد و پس از۳۰ دقیقه قرار گرفتن در تاریکی ودمای اتاق جذب نمونه ها در طول‌موج ۴۱۵nm اندازه‌گیری شد.این اندازه‌گیری برای‌هرعصاره سه بار تکرار شد و از نمودار استاندارد روتین در غلظت‌های مختلف (۴۰،۶۰،۸۰،۲۰µg/ml) برای اندازه‌گیری استفاده شد. (۱۵). تجزیه‌وتحلیل‌آماری‌شامل‌محاسبه‌میانگین‌وانحراف استاندارد توسط نرم افزارExcel انجام شده است.ارقام ارائه شده نشان دهنده میانگین ± انحراف استاندارد می باشند.

۳- بحث ونتیجه گیری

۳-۱- ارزیابی خواص آنتی‌میکروبی

نتیجه فعالیت ضد میکروبی عصاره متانولی گل و برگ مریم منفی‌درجدول ۲ نشان داده شده‌است. باتوجه به نتایج حاصل از تست ضدمیکروبی مریم گلی اصفهانی مشخص شد که عصاره اتیل استاتی‌گل و برگ در برابرمیکروارگانیسم های *سیتروباکترفروندی*[1] و *سودوموناس آئروژینوزا*[2] مقاومت بیشتری دارد در حالی که در مقابل *سراشیا*[3] فعالیت چندانی

1- *Citrobacter freundii*
2- *Pseudomonas aeruginosa*
3- *Serratia*

ندارد. عصاره متانولی برگ و گل نوروز که فعالیت آنتی میکروبی و *انتروباکتر* فعالیتی نداشت(۴).
قابل توجهی را در مقابل *استرپتوکوک پنومونیه*[1] و *سودوموناس آئروژینوزا* نشان داد درحالی که در مقابل *سیتروباکتر فروندی*

جدول ۲-میزان فعالیت ضد میکروبی عصاره متانولی گل و برگ مریم گلی اصفهانی در برابر باکتری‌ها

	استاندارد		گل		برگ		
نام پاتوژن	کلرامفنیل	ونکومایسین	اتیل استاتی	آبی	هگزانی	اتیل استاتی	آبی	هگزانی
Gram-negative								
Pseudomonas aeruginosa(-)	۲۲		۱۶	–	۹	۱۵	–	۱۲/۵
درصد فعالیت نسبت به ونکومایسین		۸	۲۰۰	–	۱۱۲/۵	۱۸۷/۵	–	۱۵۶/۲
درصد فعالیت نسبت به کلرامفنیل			۷۲/۷۲	–	۴۰/۹	۶۸/۱۸	–	۵۶/۸۱
Escherichia coli(-)	۳۱	۱/۳۳	۲۰	–	۸	۱۰	–	۷
درصد فعالیت نسبت به ونکومایسین			۱۵۰۳/۷۶	–	۶۰۱/۵۰	۷۵۱/۸۸	–	۵۲۶/۳۱
درصد فعالیت نسبت به کلرامفنیل			۶۴/۵۱	–	۲۵/۸	۳۲/۲۶	–	۲۲/۵
Staphylococcus coagulase(-)	۲۳	۱/۳۳	–	–	۱۰	۸	۱۰	–
درصد فعالیت نسبت به ونکومایسین			–	–	۷۵۱/۸۸	۶۰۳/۵	/۸۸ ۷۵۱	–
درصد فعالیت نسبت به کلرامفنیل			–	–	۴۳/۴۸	۳۴/۷۸	۴۳/۴۸	–
Citrobacter frurdii(-)	–	–	۲۱	–	۹	۲۰/۱۴	–	۱۱/۷۳
درصد فعالیت نسبت به ونکومایسین			–	–	–	–	–	–
درصد فعالیت نسبت به کلرامفنیل			–	–	–	–	–	–
Enterobacter sp. (-)	۲۱/۵	–	۱۵	–	۸	۷/۶۲	–	–
درصد فعالیت نسبت به ونکومایسین			–	–	–	–	–	–
درصد فعالیت نسبت به کلرامفنیل			۶۹/۷۷	–	۳۷/۲۱	۳۵/۴۴	–	–
Acinetobacter(-)	۳۶	۲۱	۹	–	–	۱۲	۱۱	۱۱
درصد فعالیت نسبت به ونکومایسین			۴۲/۸۶	–	–	۵۷/۱۴	۵۲/۳۸	۵۲/۳۸
درصد فعالیت نسبت به کلرامفنیل			۲۵	–	–	۳۳/۳۳	۳۰/۵۵	۳۰/۵۵
Serratio(-)	۴۷/۵	–	۸	–	–	۷/۵	۱۳	–
درصد فعالیت نسبت به ونکومایسین			–	–	–	–	–	–
درصد فعالیت نسبت به کلرامفنیل			۱۶/۸۴	–	–	۱۵/۷۹	۲۷/۳۷	–
Klebsiella pneumoniae(-)	۲۰/۳۳	۸/۵	۱۴/۵	–	۱۲	۱۰	۱۶	۱۱/۳۵
درصد فعالیت نسبت به ونکومایسین			۱۷۰/۵۸	–	۱۴۱/۱۸	۱۱۷/۶۵	/۲۳ ۱۸۸	۱۳۳/۵۳
درصد فعالیت نسبت به کلرامفنیل			۷۱/۳۲	–	۵۹/۰۲	۴۹/۱۹	۷۸/۷۰	۵۵/۸۳
Gram- posetive								
Streptococcus pneumoniae (+)	۲۱/۵	۱۴	۱۵	–	۸	۱۵	۸	۱۰
درصد فعالیت نسبت به ونکومایسین			۱۰۷/۱۴	–	۵۷/۱۴	۱۰۷/۱۴	۵۷/۱۴	۷۱/۴۳
درصد فعالیت نسبت به کلرامفنیل			۶۹/۷۷	–	۳۷/۲	۶۹/۷۷	۳۷/۲۰	۴۶/۵۱

1- *Streptococcus pneumonia*

۳-۲-محتوای‌فنول کل(TPC)و محتوای فلاونوئید کل (TFC)

عصاره‌آبی‌و اتیل استاتی گل مریم گلی اصفهانی در مقایسه با دیگر عصاره ها مقدار فنول بیشتری را با مقدار ۲/۰۱± ۹۳/۵ نشان داد. (جدول ۳)در مطالعه ای که برروی عصاره متانولی برگ گونه دیگری از این جنس به نام مریم گلی باغی انجام شد میزان ترکیبات فنولی تام آن mgGEA/g ۰/۰۹ ± ۱/۳۴محاسبه گردید(۱۰). در تحقیقی دیگر که بر روی‌گونه برگ‌مریم‌گلی قرمز انجام شد، میزان ظرفیت فنولی کل mgGEA/g ۱/۱۳±۳۹ و ۱±۵۴/ به ترتیب برای عصاره استونی و متانولی برگ آن بدست آمد(۵). همچنین در اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنولی گیاه نوروزک برای عصاره‌ی اتیل استاتی گل، بیشترین مقدار mgGEA/g ۱/۸۳±۸۶/۴۳ گزارش‌گردید(۱۹) و این مقادیرگزارش شده از میزان ترکیبات فنولی موجود در گیاه مریم گلی اصفهانی به ویژه در عصاره آبی واتیل استاتی گل به مراتب کمتر می باشد.

جدول ۳ - مقدار فنول کل در عصاره گل مریم گلی اصفهانی

فنول کل(میلیگرم گالیک اسید درگرم عصاره)	عصاره	نمونه گیاه
۲۵/۷۳±۳/۳٤	n-هگزانی	گل
۹۳/۵۰±۲/۰۱	آبی	
٦۹/۹۵±۲/۰۷	اتیل استاتی	
۳۳/۹٤±۱/۱۵	n - هگزانی	برگ
۵۲/۸۹±۱/۳۷	آبی	
٤٤/٦۷±۱/۰۵	اتیل استاتی	

میزان ترکیبات‌فلاونوئیدی درعصاره اتیل استاتی هردو اندام گل‌وبرگ با اختلاف زیادی بیشترین میزان می باشد.(جدول ۴) علت این برتری عصاره اتیل استاتی در میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی را می توان به قطبیت بیشتر این حلال نسبت داد. احتمالاً ساختار قطبی این ترکیبات با تمایل زیاد آن ها برای حل شدن در حلال های قطبی می باشد که جزء اتیل‌استاتی را برای حضور این دسته از ترکیبات عصاره غالب‌کرده است(۲۱). درمطالعه‌ای‌که برروی عصاره اتانولی گونه‌مریم‌گلی‌باغی‌انجام‌شده،مقدار mgRU/g۱۷/۲۴±۱/۳۱ محتوای فلاونوئیدی آن بدست آمده است (۲۱). همچنین در بررسی که‌بر روی مریم‌گلی قرمز انجام شده ،به ترتیب مقادیر۲/۹۳±۲۷/۰۵و۰/۹۸±۱۳/۲۷ mgRU/g برای عصاره اتانولی‌وآبی‌آن‌هابدست‌آمده‌است(۱).همان‌طورکه‌ازنتایج‌داد ه‌هادرجدول۴مشخص‌است‌مقدارظرفیت‌فلاونوئیدی‌عصاره‌های مریم‌گلی اصفهانی نسبت به سایر گونه ها حتی در غیرقطبی ترین حلال نیز مقادیر بیشتری از خود نشان داده اند.

جدول ٤- مقدار فلاونوئید کل درعصاره مریم گلی اصفهانی

فلاونوئید کل (میلیگرم روتین در گرم عصاره)	عصاره	بخش های گیاه
۱۷/۷۳±٤/۰۰	n – هگزانی	گل
٦۳/۸۹±۲/۳۳	اتیل استاتی	
۲۹/۲۳±۳ /٤۷	n –هگزانی	برگ
۱۷٦/۷٦±۱/۵۱	اتیل استاتی	

۳-۳-کلاته کنندگی یون های آهن(FIC)

برخی از ترکیبات فنولی خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود را از طریق کلاته‌کردن یون‌های فلزی نشان می‌دهند(۲۴). در تحقیقاتی که برروی گیاهان مختلف انجام شده، در این تست با افزایش غلظت، خاصیت کلاته‌کنندگی یون‌های آهن نیز افزایش می‌یابد. در این مطالعه بدلیل تداخل رنگ عصاره‌ها نتیجه به‌دست آمده ارقام منفی بود به همین دلیل این نتایج هیچ تناسبی با نتیجه سایر آزمون‌ها نداشت. در مطالعه ای که بر روی مریم گلی قرمز[1] صورت گرفته مشخص شده که این گیاه فعالیت کلاته‌کنندگی ضعیفی دارد که حتی احتمال عدم‌فعالیت‌آن‌نیزمی‌رود(۲۳). درصد فعالیت کلاته کنندگی دوگونه مریم *گلی*[2] و مریم‌*گلی اصفهانی* درعصاره متانولی نیز به ترتیب $\mu g\ ml^{-1}$ ۳/۲۴ و۳۸/۸۳ گزارش شده است (۱۶).

۳-٤-سنجش مهار رادیکال‌های آزاد (RSA)

براساس نتایج مقدار IC_{50} محاسبه شده فازآبی‌گل مریم گلی‌اصفهانی بیشترین خاصیت آنتی اکسیدانی را با مقدار $\mu g\ ml^{-1}$ ۶/۳۵± ۰/۲۹ دارا می باشد.(جدول ۵) باتوجه به این نکته که فازآبی نسبت به فازاتیل‌استاتی قطبی تر و مقدار فنول وفلاونوئید موجود درآن بیشتر بوده که عوامل موثر درفرایند آنتی اکسیدانی می باشند. درمطالعه ای که برروی نوروزک[3] انجام گرفته مقدار IC_{50} محاسبه شده $\mu g\ ml^{-1}$ ۲۳/۶۴±۰/۸۱ و ۲۵/۰۸ ±۱/۵۳ به ترتیب برای عصاره‌ی‌اتیل‌استاتی‌برگ‌وگل‌گزارش‌شده‌است(۴)همچنین. در بررسی هایی که برروی گونه مریم گلی قرمز برای تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی آن صورت گرفته، مقدار $\mu g\ ml^{-1}$ ۴/۲۴ ± ۲۰۲/۴ و ۰/۰۰ ± ۱۰۴/۹۳ به ترتیب در عصاره آبی و عصاره اتانولی برگ برای IC_{50} گزارش شده است(۷).

جدول ۵- خاصیت آنتی‌اکسیدانی گل مریم گلی اصفهانی

غلظت عصاره (ppm)	RSD فاز اتیل استاتی		فازآبیRSD	
	گل	برگ	گل	برگ
۲۰	۵/۷۸±۱۸/۷۳	۸/۱۸ ±۷۵/۵۰	۰/۲۹ ±۶/۱۸	۱/۵۵ ±۶۹/۳۱
٤۰	۷۹/۹۱±۵/۷۸	۸/۱۸ ±۸۲/۲۴	۰/۲۹ ±۱۸/۳۰	۱/۵۵ ±۷۸/۱۸
٦۰	۵/۷۸ ±۸۲/۵۲	۸/۱۸ ±۸۸/۳۶	۰/۲۹ ±۴۳	۱/۵۵ ±۸۵/۸۰
۸۰	۵/۷۸ ±۸۸/۸۸	۸/۱۸ ±۹۴/۲۲	۰/۲۹ ±۵۰/۶۱	۱/۵۵ ±۹۵/۶۵
IC_{50}	**۲۱/۲۸ ± ۵/۷۸**	**۱۷/۸۸ ±۸/۱۸**	**۰/۲۹±٦/۳۵**	**۱/۵۵±۱۱/۹۹**

1 -*Salvia miltiorrhiza*

2 - Salvia Leriifolia

3--*Salvia multicaulis*

۳-۵-بررسی مواد موثره موجود دراسانس‌مریم‌گلی اصفهانی

در مطالعه حاضر، اسانس حاصل از گل مریم گلی اصفهانی مورد استخراج‌وتجزیه قرار گرفته و ۲۱ ترکیب به نمایندگی ازکل‌اجزا شناسایی‌گردید. ترکیبات شناسایی شده منوترپن هیدروکربنی،منوترپن‌اکسیژن‌دار،سزکوئی‌ترپن‌هیدروکربنی سزکوئی‌ترپن‌اکسیژن دار، بتا- المن ، بتا- D هگزیل-۳-متیل بوتانوات، دی ترپنوئید و ترکیب غیر ترپنوئیدی را شامل می‌شدند. ترکیبات بتا کاریوفیلن (۲۷/۶)، ژرماکرن د (۱۳/۵)، بتا اوسیمن (۱۲/۹)، کاریوفیلن اکساید (۸/۶) و کالامن (۶/۳) از درصد بالایی برخوردار بودند (جدول ۶). مطالعات دیگری در رابطه با اسانس خانواده مریم‌گلی انجام گرفته است. در یک تحقیق ترکیبات شیمیایی اسانس‌گل مریم‌گلی‌اصفهانی‌ومریم‌گلی‌مزرعه‌روی[1]توسط دستگاههای GC-MS وGCموردبررسی قرارگرفته اند، که ۳۱ ترکیب برای‌مریم‌گلی مزرعه روی و ۲۱ ترکیب برای مریم‌گلی اصفهانی شناسایی شده‌اند. ترکیبات بتاکاریوفیلن، جرماکرن ب، کاریوفیلن اکسید،سیس-بتا-فارنزن‌وجرماکرن-داجزای اصلی‌تشکیل‌دهنده در مریم گلی مزرعه روی و بتا اوسیمن، آلفاگورجونن،جرماکرن- د وهگزیل‌استات به عنوان اجزای تشکیل‌دهنده اصلی در مریم‌گلی‌اصفهانی بوده اند(۱۲). در تحقیق دیگر،اسانس برگ و گل مریم گلی اصفهانی و مریم گلی‌سوری ازمنطقه بروجرد مورد آنالیز قرار گرفته اند. مواد اصلی در اسانس برگ‌های مریم‌گلی اصفهانی شامل بتا کاریوفیلین کاریوفیلن(۱۳/۱درصد)،اسپاتولنول(۱۲/۴درصد) بوده است.ولی‌دربرگ‌های‌گونه‌مریم‌گلی‌سوری، اسپاتولنول (۱۸/۶ درصد)، بورنیل استات (۱۰/۵ درصد)، آلفا کادینن (۱۰/۲ درصد) و دلتا المن (۷/۹ درصد) ترکیبات عمده بوده‌اند.همچنین‌مواداصلی‌اسانس‌گل‌های‌مریم‌گلی اصفهانی شامل‌بتاکاریوفیلن(۱۵/۰درصد)،ایزواسپاتولنول(۷/۸درصد) بورنیل استات (۵/۸ درصد) و بتاالمن (۶/۰ درصد) و در گل‌های گونه مریم گلی سوری، اسپاتولنول (۲۱/۴ درصد)، بورنیل‌استات (۹/۸ درصد)، جرماکرن-ب (۸/۴درصد)، آلفاپینن(۶/۱ درصد)، دلتاکادینن (۵/۸ درصد) و دلتا المن (۵/۳ درصد) بیشترین میزان مواد را به خود اختصاص داده‌اند. یافته‌های‌این‌مطالعه نشان میدهد که ترکیبات موجود در اسانس برگ‌ها وگل‌های نمونه های مورد بررسی و حتی محل تجمع یک ماده (اسپاتولنول) در دو گونه مختلف نیز متفاوت‌بوده‌است.ماده‌عمده‌موجود رگونه‌مریم‌گلی‌اصفهانی، بتاکاریوفیلن و ماده عمده موجود در گونه مریم‌گلی سوری اسپاتولنول بوده است(۲) .در مطالعه‌ای دیگر خواص آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره متانلی برگ و گل مریم گلی اصفهانی‌موردارزیابی‌قرار گرفته است. ۴۴ ترکیب در اسانس شناسایی‌شده‌است. ترکیبات عمده اسانس برگ، جرمکرن د (۲۱/۲ درصد)، سدران دی ال (۹/۹ درصد)، اپی لورن (۹/۵ درصد) و بایسیکلو جرمکرن (۸/۲ درصد) بوده اند در حالی‌که بنزوئیک اسید هگزیل استر (۱۷/۰ درصد)، بتا گورجونن (۷/۵ درصد)، بتا اودسمول (۶/۹ درصد) و ایشوارن (۶/۰ درصد) ترکیبات عمده اسانس گل را تشکیل داده اند (۱۸). اسانس و فراکسیون‌های مختلف اندام هوایی مریم‌گلی‌اصفهانی در مطالعه دیگری جهت ارزیابی خاصیت آنتی اکسیدانی مورد تحقیق قرار گرفته اند. آنالیز اسانس اندام هوایی توسط‌دستگاه GC/MS انجام شده است. ۲۴ ترکیب در این اسانس مورد شناسایی قرار گرفته است که ترکیبات عمده اسانس بنزیل بنزوات (۲۶/۶ درصد)، ان- هگزیل بنزوات(۲۳/۰درصد) وان- هگزیل ایزووالرات (۶/۰ درصد) بوده اند (۱۴).

1- Nemorosa L

جدول ٦-ترکیبات موجوددراسانس گل مریم گلی اصفهانی.

نام ترکیب	ضریب بازداری KI	درصد موجود در اسانس	روش شناسایی
p-Cymene	۱۰۲۶	۰/۲	RI[1], MS[2]
ß-Elemene	۱۳۳۸	۱/۲	RI, MS
ß-Bourbonene	۱۳	۰/۶	RI, MS
ß-Caryophyllene	۱۴۰	۲۷/۲	RI, MS
Aromadendrane	۱۴۵۹	۴/۳	RI, MS
ß-Cadinene	۱۴۷۰	۰/۷	RI, MS
Germacrene D	۱۴۸۰	۱۳/۵	RI, MS
Bicyclogermacrene	۱۴۹	۰/۷	RI, MS
(E)-calamene	۱۵۳۲	۶/۳	RI, MS
Occidentalol	۱۵۴۸	۲/۳	RI, MS
(Z)-dihydro occidentalol acetate	۱۷۳۸	۰/۵	RI, MS
Methyl hexadecanoate	۱۹۲۷	۰/۲	RI, MS
Tricosane	۲۳۰۰	۰/۱	RI, MS
(Z)-ß-Ocimene	۱۰۳۵	۲/۱	RI, MS
Hexyl, 3-methyl butyrate	۱۰۳۸	۲/۳	RI, MS
(E)-β-Ocimene	۱۰۴۵	۱۲/۹	RI, MS
Germacrene-B	۱۵۰۳	۰/۸	RI, MS
α-Farnesene	۱۵۰۷	۲/۱	RI, MS
β-Eudesmol	۱۶۵۹	۳/۴	RI, MS
Spathulenol	۱۵۸۱	۲/۶	RI, MS
Caryophyllene oxide	۱۵۸۵	۸/۶	RI, MS

1- Retention Index (Kovats Index)
2 -Mass Spectrometry

٤- نتیجه گیری

درتحقیق‌حاضرخواص‌بیولوژیکی‌شامل‌خواص‌آنتی اکسیدانی وآنتی‌میکروبی عصاره های اندام های مختلف گیاه مریم گلی اصفهانی با استفاده از آزمون های رایج مورد ارزیابی قرارگرفتند. نتایج به دست آمده مشخص کرد که عصاره آبی‌گل بیشترین میزان مهارکنندگی رادیکال های آزاد و همچنین بیشترین میزان ترکیبات فنلی را دارد. در حالی که عصاره اتیل استات برگ دارای‌ب یشترین میزان ترکیبات فلاونوئید است. در بررسی خواص آنتی میکروبی، عصاره اتیل‌استاتی‌برگ و گل گیاه بیشترین توانایی را در جلوگیری از رشد میکروب‌ها از خود نشان دادند. در این تحقیق ترکیبات موثره اسانس گیاه مریم گلی اصفهانی نیز با استفاده از روش کروماتوگرافی مورد مطالعه قرار گرفت. مطابق نتایج حاصل شده ترکیبات بتا کاریوفیلن، ژرماکرن D، بتااوسیمن، کاریوفیلن‌اکسایدوکالامن به عنوان ترکیبات اصلی شناسایی شدند.

٥- منابع

۱. حسین‌پور، ز. ۱۳۹٤. اندازه گیری ترکیبات فنولی و فلانوییدی و بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی اندام های هوایی گیاه نوروزک جمع آوری شده از منطقه سبزوار. [پایان‌نامه] سبزوار، دانشگاه حکیم سبزواری

۲. حقیرچهرگانی، ع.، یزدانی، د. ، گودرزی، م. و لاری یزدی، ح. ، ۱۳۸٤. بررسی ترکیبات شیمیایی اسانس برگ وگل‌دوگونه *Salvia syriaca* L. و *Salvia reuterana* Boiss جمع‌آوری‌شده از منطقه بروجرد. *فصلنامه گیاهان دارویی*، سال چهارم، شماره۱٦.

۳. غلامی، ز. ۱۳۸۱. بررسی ترکیبات موجود در salvia reuterana توسط GC-Mass.[پایان‌نامه] تهران، دانشگاه علوم پزشکی.

4. Abadi, Z. H. M., Mahdavi, B. and Rezaei-Seresht, E.2016. Contents of Aerial Parts of Salvia leriifolia Benth. *Journal of Chemical Health Risks*,6(3).

5.Alagumanivasagam, G., Pasupathy, R., Kottaimuthu, A. and Manavalan, R. 2012. A Review on In-vitro Antioxidant Methods. *International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences*, 1(2): 662-74.

6.Alger, M. S. 1997. *Polymer science dictionary*. Springer Science & Business Media.

7. Esmaeili, A., Rustaiyan, A., Nadimi, M., Larijani, K., Nadjafi, F., Tabrizi, L. and Amiri, H. 2008. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from leaves, stems and flowers of Salvia reuterana Boiss. grown in Iran. *Natural product research*, 22(6):516-520.

8. Fazel Nabavi, S., Ebrahimzadeh, M. A., Mohammad Nabavi, S. and Eslami, B. 2010. Antioxidant activity of flower, stem and leaf extracts of Ferula gummosa Boiss. *Grasas y aceites*, 61(3):244-50.

9.Kamatou, G., Makunga, N., Ramogola, W. and Viljoen, A. 2008. South African Salvia species: a review of biological activities and phytochemistry. *Journal of ethnopharmacology*, 119(3):664-72.

10.Lagouri, V. and Boskou, D. 1996. Nutrient antioxidants in oregano. *International journal of food sciences and nutrition*, 47(6):493-7.

11.Li, L-N. 1998. Biologically active components from traditional Chinese medicines. *Pure and applied chemistry*, 70(3):547-54.

12. Mirza, M. and Sefidkon, F. 1999. Essential oil composition of two Salvia species from Iran, Salvia nemorosa L. and Salvia reuterana Boiss. *Flavour and fragrance journal*, 14(4): 230-232.

13. Nabavi, S. F., Habtemariam, S., Sureda, A. and Nabavi, S. M. 2012. *Ferula gummosa Boiss as a rich source of natural antioxidants with numerous therapeutic uses - A short review.*Medicinal Plants as Antioxidant Agents: Understanding Their Mechanism of Action and Therapeutic Efficacy. Research Signpost, Kerala, India, pp. 15-26.

14. Panahi, Y., Ghanei, M., Hajiakhoondi, A., Ahmadi-Koulaei, S. and Delnavazi, M.R. 2020. Free Radical Scavenging Principles of Salvia reuterana Boiss. Aerial Parts, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*,19(2): 283-290.

15.Prior, R. L., Wu, X. and Schaich, K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10):4290-302.

16.Ravipati, A. S., Zhang, L., Koyyalamudi, S. R., Jeong, S. C., Reddy, N., Bartlett, J., et al. 2012. Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected Chinese medicinal plants and their relation with antioxidant content. *BMC complementary and alternative medicine*,12(1):173.

17. Roya, K. and Fatemeh, G. 2013. Screening of total phenol and flavonoid content, antioxidant and antibacterial activities of the methanolic extracts of three Silene species from Iran. *Intl J Agri Crop Sci,* 5 (3): 305-312.

18. Safaei Ghomia, J., Masoomia, R., Jookar Kashia, F. and Hossein Batooli, H. 2012. In vitro Bioactivity of Essential Oils and Methanol Extracts of Salvia reuterana from Iran, *Natural Product Communications*, 7(5):651 – 654.

19.Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J. A. and Saura-Calixto, F.1999. Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. *Food Research International*, 32(6):407-12.

20.Singleton, V. and Rossi, J. A.1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-hosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture,* 16(3): 144-58.

21.Tenore, G. C., Ciampaglia, R., Arnold, N. A., Piozzi, F., Napolitano, F., Rigano, D., et al. 2011. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oil of Salvia lanigera from Cyprus. *Food and Chemical Toxicology,*49(1):238-43.

22. Zhang, Y. , Li, X. and Wang, Z. 2010. Antioxidant activities of leaf extract of Salvia miltiorrhiza Bunge and related phenolic constituents. *Food and Chemical Toxicology*, 48(10):2656-62.

23.Zhao, G-R., Xiang, Z-J., Ye, T-X., Yuan, Y-J. and Guo, Z-X. 2006. Antioxidant activities of Salvia miltiorrhiza and Panax notoginseng. *Food Chemistry*,99(4):767-74.

24. Zhao, H., Fan, W., Dong, J., Lu, J., Chen, J., Shan, L., et al. 2008. Evaluation of antioxidant activities and total phenolic contents of typical malting barley varieties. *Food Chemistry*,107(1):296-304.

(Original Research Paper)

Identification of Chemical Compounds in the Essential Oil of *Salvia reuterana Bioss.* and Evaluation of Antioxidant Properties and the Aamount of Phenols and Flavonoids in the Whole Plant Extract

Mohammad Hassan Mohammadi[1*] , Behnam Mahdavi[2] , Hashem Akhlaghi Feiz Abad[1] , Hadis Farmanbar Jafar Abadi[2]

1-Department of Chemistry, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran.
2- Department of Chemistry, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Iran.

Received:01/05/2021 Accepted:03/10/2021

Abstract

Isfahan sage with the scientific name of *Salvia reuterana* belongs to the genus Labiatae and has a wide distribution in Iran. The genus Salvia is one of the important genera of the genus Labiatae. Because of the carcinogenic effects of synthetic antioxidants on the market, researchers are keen to replace them with natural compounds that have similar properties. Antioxidant compounds such as phenolic acids, polyphenols and flavonoids inhibit free radicals such as hydroperoxides and thus prevent the oxidative mechanism that leads to erosive diseases. In this study, antioxidant and antimicrobial activity of aerial parts of Isfahan sage by five tests including free radical scavenging activity (DPPH), iron ion chelating (FIC), determination of total phenolic content (TPC), total flavonoid content (TFC) and antimicrobial test (DD assay) were evaluated. For this purpose, different parts of Isfahan sage plant including flowers and leaves were collected from Sabzevar in May 2014. The samples were dried, powdered and soaked in methanol solvent, and the crude extract was fractionated with n-hexane, water and ethyl acetate solvents, respectively. The water fraction of the flower in RSA (DPPH) test showed the highest activity with values of 6.35 ± 0.29 µ g / mL.The ethyl acetate part of the leaf had the highest TFC with 176.76 ± 1.51 mg RU / g and the aqueous ethyl acetate part of the flower had the highest TPC with 76.5 2 ± 2.07 and 68.95 ± 2 2.07 mgGEA / g. Antimicrobial test of ethyl acetate extract of leaves and flowers showed significant antimicrobial activity against *Citrobacter frurdii* and Pseudomonas *aeruginosa*, while little activity was observed against *Serratio* (-).

Keywords:Isfahan Sage, Antioxidant Activity, Antimicrobial Activity, Free Radical Acavenging.

[*]Corresponding Author: mhmohamady@iaus.ac.ir