

بررسی تنوع الگوهای فلاونوئیدی در ۵ گونه از جنس *Stachys* در ایران

نواز خرازیان*، مزگان محمدی و لیلا شبانی

شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۹۳/۲/۲۷

تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۰/۲۱

چکیده

جنس *Stachys* L. (Lamioideae، Lamiaceae) با داشتن ویژگی‌های دارویی متعدد یکی از بزرگترین جنس‌های این تیره محسوب می‌گردد. بدلیل وجود گونه‌های بسیار مشابه، تنوع ریخت‌شناسی بالا و دورگه‌گیریهای متعدد در این جنس، تاکسونومی این جنس بسیار پیچیده است. از این‌رو هدف از این تحقیق بررسی تنوع الگوهای فلاونوئیدی، تعیین کلاس فلاونوئیدی و آشکارسازی موقعیت تاکسونومیکی ۵ گونه و ۳ زیرگونه متعلق به ۴ بخش می‌باشد. بدین‌منظور، فلاونوئید برگ با استفاده از حلال متانول و روش کروماتوگرافی لایه نازک استخراج شد. به‌منظور تعیین کلاس فلاونوئیدی نیز از کروماتوگرافی ستونی و سفادکس استفاده شد. همچنین، تنوع الگوهای فلاونوئیدی و موقعیت تاکسونومیکی گونه‌ها و جمعیت‌ها با استفاده از تحلیل خوشه‌ای مطالعه گردید. نتایج حاصل از تحلیل خوشه‌ای نشان می‌دهد که بیشترین تنوع فلاونوئیدی در *St. lavandulifolia* Vahl. مشاهده می‌گردد. علاوه بر این، تعداد ۶ کلاس فلاونوئیدی شناسایی شد که اغلب آنها فلاون هستند و الگوهای تغییرات فلاونوئیدی نیز از نوع هیدروکسیلاسیون، متوکسیلاسیون و گلوکوزیلاسیون می‌باشند. شایان ذکر است که *St. setifera* subsp. *daenesis* بدلیل حضور پنج نوع فلاون و یک نوع فلاونول از دو زیرگونه *setifera* و *iranica* متمایز می‌شود. بر پایه نتایج حاصل از این مطالعه، ترکیبات فلاونوئیدی در تعیین موقعیت گونه‌های متعلق به جنس *Stachys* کارآمد معرفی می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: فلاونوئید، تنوع، *Stachys*، Lamiaceae

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۸۳۲۳۲۴۴۱۹، پست الکترونیکی: nkharazian@gmail.com

مقدمه

جنس در صنعت داروسازی و درمان بیماری‌ها کاربرد فراوانی دارد. به‌طوری‌که در درمان بیماری‌های قلبی-عروقی، تورم، زخم معده، اسکروزیس و سرماخوردگی استفاده می‌شود و حاوی مقادیر قابل توجهی از ترکیبات ضد اکسیدانت و ضد باکتریال است (۱۷، ۱۹، ۲۳، ۳۲).

بر پایه مطالعات تاکسونومیکی، گزارش‌هایی در زمینه‌های مختلفی مانند تاکسونومی، ریز ریخت‌شناسی دانه گرده، فندقه، تریکوم، مطالعات بر روی آنزیم‌ها (ایزوزیم)، توالیهای Internal Transcribed Spacer (ITS) هسته‌ای و تشریح ارائه شده است که در تمایز برخی از تاکسون‌های این جنس کارآمد معرفی می‌شوند (۴۵-۵۱). در سطوح

جنس *Stachys* یکی از بزرگترین جنس‌های تیره Lamiaceae محسوب می‌گردد که در سرتاسر جهان حدود ۳۰۰ گونه دارد، به‌طوری‌که تعداد گونه‌های این جنس در ایران بیش از ۳۴ گونه می‌باشد (۱۴، ۴۲). مرکز اصلی تنوع این جنس در نواحی جنوب و شرق آناتولی، قفقاز، شمال غرب ایران، شمال عراق و نواحی بالکان گزارش شده است و اغلب در نواحی گرم مدیترانه‌ای و جنوب غرب آسیا توزیع یافته‌اند (۸، ۱۴). شکل رویشی در برخی از گونه‌های این جنس یکساله، دوساله، چند ساله، بوته‌ای یا نیمه بوته‌ای هستند که گاهی در نواحی صخره‌ای و استپ‌های کوهستانی رشد می‌کنند (۸، ۲۹). بعلاوه وجود ترکیبات ثانویه قابل توجه در جنس *Stachys* این

موجود در بین زیر گونه های *St. swainsonii* Benth. آشکار گردید که مرتبط با فلاونوئیدهای متمایز کننده در بین این تاکسونها بود (۵۵).

با توجه به اینکه جنس *Stachys* از لحاظ ریخت‌شناسی تنوع بالایی را در ناحیه زاگرس ایران آشکار می‌کند، و همچنین بدلیل حضور چند شکلیهای متعدد ریخت‌شناسی در سطوح درون گونه ای، شباهتهای ریخت‌شناسی قابل توجه در بین گونه ها و زیر گونه های این جنس و دورگه گیری فراوان در سطوح درون گونه ای و با توجه به اینکه در زمینه تعیین ترکیبات فلاونوئیدی و تنوع الگوهای این ترکیبات در ایران گزارشهای اندکی در دسترس است، از این رو اهداف زیر در این مطالعه مورد توجه می باشد: (۱) تعیین کلاسهای فلاونوئیدی در هریک از اعضای متعلق به هریک از بخشها بمنظور تعیین روابط بین گونه های متعلق به هر بخش، معرفی نوع کلاس برای هریک از بخشها و گزارشی جدید از حضور نوع کلاسهای فلاونوئیدی موجود در گونه ها، (۲) بررسی تنوع الگوهای این ترکیبات در بین جمعیتها و گونه ها بمنظور آشکار کردن اختلافات موجود در بین گونه ها و ارائه گزارشی از الگوهای تنوع زیستی (فلاونوئیدی) در منطقه زاگرس و (۳) تعیین موقعیت تاکسونومیکی اعضای متعلق به بخشها در ناحیه زاگرس مرکزی ایران. لازم بذکر است که برخی از کلاسهای فلاونوئیدی و کلیه الگوهای تنوع در این مطالعه برای اولین بار از ایران گزارش می گردد. ۴ بخش مورد مطالعه در این تحقیق شامل: (۱) بخش (*St. inflata* Benth.) *Ambleia*، (۲) بخش *Zietenia* (*St. lavandilifolia*)، (۳) بخش *Eriostomum* (*St. cretica* L.) و *St. spectabilis* Choisy، (۴) بخش *Setifolia* (*St. setifera* A. C. Mey. ex DC.)، (۵) *St. setifera* subsp. *daenesis*، (۶) *St. setifera* subsp. *iranica* می باشد.

مواد و روشها

فراگونه ای، گونه های جنس *Stachys* تشابه ریخت‌شناسی بالا همراه با تنوع ریخت‌شناسی و پلی مورفیسمی بالایی را نشان می دهند (۴۶، ۴۷). بر این اساس، این جنس به‌عنوان یک جنس کمپلکس محسوب می گردد و تشخیص گونه های خویشاوند براحتی امکان پذیر نمی باشد و نظرات متفاوتی پیرامون طبقه بندی در این جنس ارائه شده است (۸، ۱۸، ۵۵). بر این اساس، در برخی از بخشها تمایز و تشخیص تاکسونهای گونه ای و فرا گونه ای بسیار مشکل می باشد (۱۸). بر پایه مطالعات فیتوشیمی، اغلب گزارشهای موجود در این جنس بر روی ترکیبات ثانویه ای نظیر روغنهای فرار، تریترپنوئیدها، اسیدهای چرب و ترکیبات فنولی متمرکز شده است (۲، ۳، ۱۰، ۳۱). ترکیبات روغن فرار و اسیدهای چرب توسط Radulovic و همکاران (۲۰۰۶ و ۲۰۰۷) در گونه های انحصاری جنس *Stachys* در نواحی بالکان مورد بررسی قرار گرفت و چنین نتیجه گیری شد که اسیدهای چرب نشانگرهای مناسبی در سیستماتیک این جنس می باشند (۴۰، ۴۱). علاوه بر این، وجود ترکیبات روغن فرار در برخی از گونه‌های جنس *Stachys* در ایران نیز گزارش شده است (۲۲، ۴۳، ۴۴). ترکیبات فلاونوئیدی نیز در چندین گونه از جنس *Stachys* مورد بررسی قرار گرفته است، به‌طوری‌که Skaltsa و همکاران (۲۰۰۷) و Kotsos و همکاران (۲۰۰۷) ترکیباتی مانند فلاونوئید آلوزید و استاخیسپینوزید را از *St. spinosa* L. جداسازی کردند (۲۶، ۵۵). Ahmad و همکاران (۲۰۰۶) نیز ترکیباتی مانند فلاونوئید گلوکوزید و سایر مشتقات آن را در *St. parviflora* Benth. شناسایی کردند (۴). همچنین در برخی از گونه های جنس *Stachys* فلاون گلیکوزید، فلاون گلوکوزید، هیدروکسی فلاونوئیدهای متیله شده و آگلی کون فلاونوئیدها همراه با جایگزین‌های گلوکوزیدی، گلوکوپیرانوزیدی و آلوزید گلوکوزیدی معرفی شدند (۶، ۷، ۱۳، ۱۵، ۱۶، ۲۵، ۲۷، ۲۸، ۳۴، ۳۸). پیرامون ارزیابیهای کموتاکسونومیکی در سطوح فراگونه، چند شکلیهای

در این مطالعه ۲۲ جمعیت متعلق به ۵ گونه و ۳ زیر گونه از رویشگاه‌های طبیعی ناحیه زاگرس مرکزی ایران جمع‌آوری شد (جدول ۱). سپس هریک از گونه‌ها با استفاده از فلور ایرانیکا (۴۳) و فلور ایران (۱) بدقت شناسایی و نامگذاری شدند. نمونه‌های اصلی هریک از گونه‌ها در هرباریوم دانشگاه شهرکرد موجود می‌باشد.

جدول ۱- فهرست گونه‌ها و جمعیت‌های جمع‌آوری شده جنس *Stachys* از رویشگاه‌های طبیعی زاگرس مرکزی در ایران

گونه و جمعیت	محل جمع‌آوری	ارتفاع محل از سطح دریا (متر)
۲۲ <i>St. lavandulifolia</i>	چهار محال و بختیاری- کوه جهان‌بین، تنگ خراجی، کوه زنگیان	۱۹۷۵
۲۴ <i>St. lavandulifolia</i>	کهگیلویه و بویر احمد- ۲۰ کیلومتری یاسوج	۲۰۳۶
۶۰ <i>St. lavandulifolia</i>	اصفهان- فریدن، دامنه	۲۱۷۵
۹۳ <i>St. lavandulifolia</i>	چهار محال و بختیاری- شلمزار، کوه یومری	۱۹۹۳
۱۴۹ <i>St. lavandulifolia</i>	اصفهان- ونک سمیرم، چشمه ناز	۲۰۳۰
۱۷۵ <i>St. lavandulifolia</i>	کهگیلویه و بویر احمد- آبشار سی سخت	۲۴۳۸
۱۰۳ <i>St. inflata</i>	چهار محال و بختیاری- گردنه گل سفید	۱۶۳۸
۱۳۳ <i>St. inflata</i>	اصفهان- روستای ورق، بسمت سمیرم	۲۳۰۳
۱۶۲ <i>St. inflata</i>	کهگیلویه و بویر احمد- یاسوج	۲۰۲۰
۲۶۲ <i>St. inflata</i>	اصفهان- ۵ کیلومتری دالان کوه	۱۹۴۵
۱۴۱ <i>St. setifera</i> subsp. <i>setifera</i>	اصفهان- ونک سمیرم، چشمه ناز	۱۹۶۰
۲۶۷ <i>St. setifera</i> subsp. <i>setifera</i>	چهار محال و بختیاری- بلداجی، کوه چیرو	۱۸۷۱
۲۸۴ <i>St. setifera</i> subsp. <i>setifera</i>	کهگیلویه و بویر احمد- آبشار سی سخت	۱۹۷۱

ادامه جدول ۱-

گونه و جمعیت	محل جمع‌آوری	ارتفاع محل از سطح دریا (متر)
۲۰۵ <i>St. setifera</i> subsp. <i>daensis</i>	چهار محال و بختیاری- تنگ چهارز گون، سبزه کوه	۲۰۲۰
۲۷۲ <i>St. setifera</i> subsp. <i>daensis</i>	اصفهان- فریدن، کوه دامنه	۱۸۳۹
۲۸۱ <i>St. setifera</i> subsp. <i>daensis</i>	کهگیلویه و بویر احمد- سی سخت، کوه گل	۱۸۸۵
۲۵۰ <i>St. cretica</i>	چهار محال و بختیاری- چغاخور، گهرو	۱۸۵۸
۲۸۰ <i>St. cretica</i>	کهگیلویه و بویر احمد- سی سخت، کوه گل	۱۸۸۵
۲۸۲ <i>St. spectabilis</i>	کهگیلویه و بویر احمد- سی سخت، بعد از اقامتگاه کوه گل	۱۸۸۲
۲۸۳ <i>St. spectabilis</i>	کهگیلویه و بویر احمد- یاسوج، کوه میشی	۲۰۱۲
۲۸۵ <i>St. spectabilis</i>	چهار محال و بختیاری- آب ملخ، مال خلیفه	۲۰۴۸
۲۴۹ <i>St. setifera</i> subsp. <i>iranica</i>	چهار محال و بختیاری- چغاخور، گهرو	۱۸۲۹

استخراج فلاونوئید: ۱۰/۵ گرم از برگ‌های خشک شده هریک از جمعیتها و گونه‌ها وزن شد، سپس برگها با استفاده از هاون چینی کاملاً پودر شده و محلول فلاونوئید با استفاده از متانول خالص (۱۵۰ میلی لیتر) و دمای ۶۰

کلریدریک، استات سدیم، استات سدیم/ اسید بوریک و بر پایه طیف سنج ماوراءبنفش (UV-vis (Ultraviolet visible) در ۳۶۶ نانومتر مورد بررسی قرار گرفتند (۳۶). به منظور تعیین تنوع الگوهای فلاونوئیدی در هریک از جمعیتها و تعیین موقعیت تاکسونومیکی گونه ها، آنالیزهای آماری با بهره گیری از وجود و عدم وجود لکه های کروماتوگرام، آنالیز خوشه ای با ضریب فاصله اقلیدسی و روش Ward و نرم افزار SPSS v. 20.0 مورد بررسی قرار گرفت. همچنین میزان تغییرات Rf (Retension factor) برای هریک از گونه ها محاسبه شد (میزان مهاجرت لکه/ میزان مهاجرت حلال Rf=). کلیه مراحل آزمایش در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد انجام شده است.

نتایج

نتایج حاصل از الگوهای کروماتوگرافی لایه نازک چنین نشان می دهد که در فاز آلی لکه های رنگی متفاوتی در هریک از گونه ها پدیدار می گردد. تغییرات لکه ها برای هریک از گونه ها در جدول ۲ مشخص شده است. در برخی از گونه ها تغییرات رنگ و ایجاد رنگ جدید بعد از عمل اسپری نیز مشاهده شد که این رنگها اغلب زرد، آبی، نارنجی و یا بدون تغییر بودند (جدول ۲). مقادیر Rf نیز برای هریک از لکه ها در هریک از گونه ها مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۳). نتایج حاکی از این است که حداکثر مقدار Rf در *St. cretica* (۱/۹) و کمترین مقدار آن در *St. lavandulifolia* (۰/۵۱) مشاهده می گردد (جدول ۳). همچنین، تعداد لکه های ایجاد شده در هریک از گونه ها به شرح زیر می باشند: در جمعیتهای متعلق به *St. lavandulifolia* ۲۷ لکه، در جمعیتهای *St. inflata* ۱۷ لکه، در جمعیتهای *St. cretica* ۱۳ لکه، در جمعیتهای متعلق به *St. spectabilis* ۱۷ لکه و در جمعیتهای متعلق به *St. setifera* زیر گونه های *setifera iranica* و *daensis* به ترتیب ۴، ۱۳ و ۹ لکه مشاهده شد.

درجه سانتیگراد و بمدت ۳۰ دقیقه جداسازی گردید. به منظور حذف متانول از محلول بدست آمده، تقطیر در خلاء (Rotary Evaporator Eyala, Japan) با دمای ۷۰ درجه سانتیگراد انجام شد (۳۶). با استفاده از محلول ۱- بوتانول، خالص سازی فلاونوئید از سایر ترکیبات مانند کاروتنوئید انجام شد و بعد برای تشکیل لکه های فلاونوئیدی از سیلیکاژل MERK (۱۵ گرم و ۶۷/۵ میلی لیتر آب مقطر) و کروماتوگرافی لایه نازک (ضخامت ۳ میکرون و ابعاد ۲۰ در ۲۰ سانتی متر مربع) در فاز آلی حاوی بوتانول- اسید استیک- آب (۱:۱:۳) استفاده گردید (۴۲). به طوری که محلول سیلیکاژل با استفاده از دستگاه TLC Plate Coater, CAMAG بر روی تیغه های شیشه ای (۲۰ × ۲۰) پخش شد و تیغه ها در ریز هود خشک گردید، سپس عصاره فلاونوئید با استفاده از لوله موئینه در سطح صفحات کروماتوگرام کاشته شدند. در نهایت با قرار دادن صفحات ذکر شده در فاز آلی، لکه ها به تفکیک مهاجرت کرده و مسیر این لکه ها مشاهده و ثبت شد. لکه های تشکیل شده در کروماتوگرام نیز با استفاده از اسید سولفوریک ۵ درصد و متانول، و اسید کلریدریک ۵ درصد و متانول در زیر اشعه ماوراءبنفش با طول موج ۳۶۶ نانومتر رؤیت گردیدند. خالص سازی ترکیبات فلاونوئیدی هریک از گونه ها با استفاده از کروماتوگرافی ستونی با سفادکس Sigma LH20 انجام شد و فرکنشها بطور جداگانه و با استفاده از شیب غلظت متانول (۲۰٪، ۴۰٪، ۶۰٪، ۸۰٪، ۱۰۰٪) و استون خالص و با حجم ۵۰ میلی لیتر جداسازی شدند. به طوری که با تزریق یک میلی لیتر محلول فلاونوئید در سطح ستون سفادکس، به همراه شیب غلظت متانول در سطح ستون و با استفاده از قیف دکانتور، فراکشنها بطور کامل جداسازی شدند. این فراکشنها نیز با استفاده از کروماتوگرافی یک بعدی خالص سازی شدند و تعیین ترکیبات فلاونوئیدی بر مبنای غلظتهای متفاوت متانول (۲۰٪، ۴۰٪، ۶۰٪، ۸۰٪، ۱۰۰٪) و عوامل شیفت‌دهنده مانند کلرید آلومینیوم، کلرید آلومینیوم/اسید

بر پایه الگوهای کروماتوگرام، حضور و عدم حضور هریک از لکه‌ها برای هریک از ۵ گونه و ۳ زیر گونه جنس *Stachys* محاسبه شد. این داده‌ها برای نمایش تغییرات

جدول ۲- حضور لکه‌های کروماتوگرام در بین گونه‌های جنس *Stachys* قبل و بعد از اعمال اسپری. a: لکه‌هایی که بعد از اعمال اسپری ایجاد شده‌اند. شماره‌ها به ترتیب: ۱: بنفش، ۲: آبی، ۳: آبی روشن، ۴: سبز، ۵: قهوه‌ای، ۶: زرد، ۷: زرد روشن، ۸: زرد تیره، ۹: نارنجی، ۱۰: نارنجی تیره، ۱۱: قرمز.

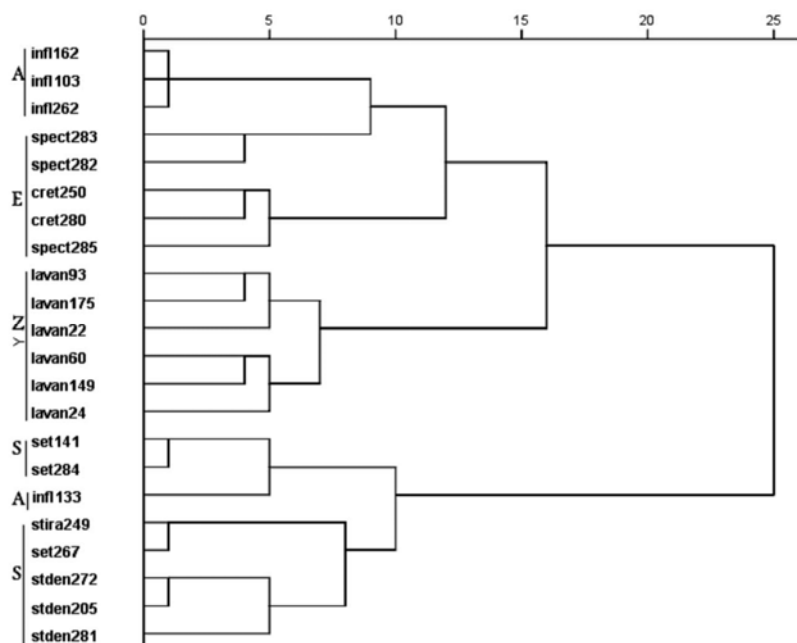
گونه و جمعیت	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱
<i>St. lavandulifolia</i>		+				+	+	+			
۱۰۳ <i>St. inflata</i>	+	+			+				a+		+
۲۵۰ <i>St. cretica</i>		+	+		+			+			
۲۸۲ <i>St. spectabilis</i>	+	a+				+	+	+			
۲۴۹ <i>St. setifera</i> subsp. <i>iranica</i>						+			a+		+
۱۴۱ <i>St. setifera</i> subsp. <i>setifera</i>								+	a+		+
۲۰۵ <i>St. setifera</i> subsp. <i>daensis</i>							+		a+	a+	

جدول ۳- مقادیر Rf هریک از لکه‌ها در بین گونه‌های جنس *Stachys* در مرحله آلی

گونه و جمعیت	Rf
<i>St. lavandulifolia</i>	$= 1.0, 0.16 = 9, 0.10 = 8, 0.18 = 7, 0.69 = 6, 0.54 = 5, 0.16 = 4, 0.10 = 3, 0.18 = 2, 0.54 = 1$ $= 1.0, 0.99 = 18, 0.81 = 17, 0.66 = 16, 0.52 = 15, 0.16 = 14, 0.13 = 13, 0.18 = 12, 0.64 = 11, 0.56 = 10, 0.16 = 9, 0.13 = 8, 0.93 = 7, 0.83 = 6, 0.69 = 5, 0.62 = 4, 0.51 = 3, 0.16 = 2, 0.16 = 1$ $0.84 = 26, 0.13 = 25, 0.93 = 24, 0.83 = 23, 0.69 = 22, 0.62 = 21, 0.51 = 20, 0.16 = 19, 0.16 = 18, 0.15 = 17, 0.15 = 16, 0.15 = 15, 0.15 = 14, 0.15 = 13, 0.15 = 12, 0.15 = 11, 0.15 = 10, 0.15 = 9, 0.15 = 8, 0.15 = 7, 0.15 = 6, 0.15 = 5, 0.15 = 4, 0.15 = 3, 0.15 = 2, 0.15 = 1$
<i>St. inflata</i>	$= 1.0, 0.65 = 9, 0.94 = 8, 0.18 = 7, 0.75 = 6, 0.62 = 5, 0.94 = 4, 0.18 = 3, 0.71 = 2, 0.62 = 1$ $0.99 = 17, 0.91 = 16, 0.72 = 15, 0.63 = 14, 0.57 = 13, 0.12 = 12, 0.94 = 11, 0.75 = 10, 0.65 = 9, 0.65 = 8, 0.65 = 7, 0.65 = 6, 0.65 = 5, 0.65 = 4, 0.65 = 3, 0.65 = 2, 0.65 = 1$
<i>St. cretica</i>	$= 1.0, 0.16 = 11, 0.14 = 10, 0.12 = 9, 0.11 = 8, 0.17 = 7, 0.16 = 6, 0.16 = 5, 0.14 = 4, 0.12 = 3, 0.11 = 2, 0.10 = 1$ $0.16 = 11, 0.14 = 10, 0.12 = 9, 0.11 = 8, 0.17 = 7, 0.16 = 6, 0.16 = 5, 0.14 = 4, 0.12 = 3, 0.11 = 2, 0.10 = 1$ $0.16 = 11, 0.14 = 10, 0.12 = 9, 0.11 = 8, 0.17 = 7, 0.16 = 6, 0.16 = 5, 0.14 = 4, 0.12 = 3, 0.11 = 2, 0.10 = 1$
<i>St. spectabilis</i>	$= 1.0, 0.18 = 9, 0.77 = 8, 0.71 = 7, 0.64 = 6, 0.15 = 5, 0.18 = 4, 0.18 = 3, 0.77 = 2, 0.66 = 1$ $0.18 = 9, 0.77 = 8, 0.71 = 7, 0.64 = 6, 0.15 = 5, 0.18 = 4, 0.18 = 3, 0.77 = 2, 0.66 = 1$ $0.18 = 9, 0.77 = 8, 0.71 = 7, 0.64 = 6, 0.15 = 5, 0.18 = 4, 0.18 = 3, 0.77 = 2, 0.66 = 1$
<i>St. setifera</i> subsp. <i>iranica</i>	$0.10 = 4, 0.95 = 3, 0.18 = 2, 0.18 = 1$
<i>St. setifera</i> subsp. <i>setifera</i>	$= 1.0, 0.98 = 9, 0.92 = 8, 0.18 = 7, 0.18 = 6, 0.99 = 5, 0.92 = 4, 0.18 = 3, 0.18 = 2, 0.18 = 1$ $0.98 = 13, 0.92 = 12, 0.18 = 11, 0.18 = 10, 0.18 = 9, 0.18 = 8, 0.18 = 7, 0.18 = 6, 0.18 = 5, 0.18 = 4, 0.18 = 3, 0.18 = 2, 0.18 = 1$
<i>St. setifera</i> subsp. <i>daensis</i>	$0.16 = 9, 0.91 = 8, 0.18 = 7, 0.98 = 6, 0.92 = 5, 0.18 = 4, 0.99 = 3, 0.94 = 2, 0.18 = 1$

۲۸۵، ۲۸۳ *St. spectabilis*، ۲۸۰، ۲۵۰ *St. cretica*، ۲۸۵ و ۲۸۲، ۲۸۳ *St. inflata*، ۱۰۳، ۲۶۲، ۱۶۲. بر پایه این نتایج، گونه *St. inflata*، *St. setifera* subsp. *setifera*، *St. setifera* subsp. *daensis* و *St. spectabilis* هریک دو گونه و *St. lavandulifolia* ۴ گروه را تشکیل می‌دهند. شایان ذکر است که *St. setifera* subsp. *daensis* از دو زیر گونه دیگر این گونه کاملاً متمایز شده است، همچنین، حداکثر میزان تنوع در بین جمعیت‌های *St. lavandulifolia* مشاهده شد (شکل ۱).

تحلیل خوشه‌ای با استفاده از این داده‌ها نیز مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاصل از این تحلیل نشان داد که دو گروه تشکیل شده است، گروه ۱: این گروه شامل دو زیر گروه است که به ترتیب شامل گروه الف) *St. inflata*، ۱۳۳، *St. setifera* subsp. *setifera*، ۲۸۴، ۱۴۱ و گروه ب) *St. setifera* subsp. *setifera*، ۲۶۷، *St. setifera* subsp. *iranica*، ۲۴۹ و *St. setifera* subsp. *daensis*، ۲۷۲، ۲۰۵، ۲۸۱ می‌باشد. گروه ۲: این گروه نیز دو زیر گروه را دربرمی‌گیرد، گروه ج) *St. lavandulifolia*، ۲۴، ۱۴۹، ۶۰، ۲۲، ۱۷۵، ۹۳ و گروه د) *St. spectabilis*



شکل ۱- دندروگرام حاصل از آنالیز خوشه‌ای بر اساس حضور و عدم حضور لکه‌های فلاونوئیدی در بین گونه‌های متعلق به ۴ بخش از جنس *Stachys*: Infl: *St. inflata*, lavan: *St. lavandulifolia*, spect: *St. spectabilis*, cret: *St. cretica*, set: subsp. *setifera*, stir: subsp. *iranica*, stdaen: subsp. *Stachys daensis*, A: *Amblesia*, E: *Eriostomum*, Z: *Zietenia*, S: *Setifolia*

setifera ۱۱ ترکیب در *St. setifera* subsp. *daensis* و ۹ ترکیب در *St. setifera* subsp. *iranica* در بین گونه‌های مورد مطالعه، ۳ ایزوفلاون، ۳ فلاونون، ۲ دی‌هیدروفلانول، ۴ فلاونول و ۲۱ فلاون شناسایی شده است (جدول ۴). بالاترین کلاس فلاونوئیدی در بین ۵ گونه و ۳ زیر گونه جنس *Stachys* فلاونها و کمترین آنها دی‌هیدروفلانولها می‌باشد (جدول ۴). ترکیبات مشاهده شده در *St. lavandulifolia* ایزوفلاونها و فلاونها و در *St. inflata* اغلب از نوع ایزوفلاونها، فلاونها و فلاون آگلیکونها می‌باشد. در *St. cretica* ایزوفلاونها و در *St. spectabilis* فلاون آگلی کونها، فلاونونها، فلاونولها و فلاونها، در *St. setifera* subsp. *setifera* دی‌هیدروفلانولها و فلاونها، در *St. setifera* subsp. *daensis* فلاونولها و فلاونها و در *St. setifera* subsp. *iranica* دی‌هیدروفلانولها و فلاونولها شناسایی شده اند (جدول ۴).

بر پایه تغییرات الگوهای فلاونوئیدی، اغلب جایگزینی‌ها از نوع جایگزینی‌های هیدروکسیلاسیون، متوکسیلاسیون در موقعیت‌های متفاوت و سایر جایگزینی‌هایی مانند گلوکوپیرانوزیلاسیون، گلوکوزیلاسیون، گلوکوروئیداسیون، روتینوزیلاسیون، رامنگلوکوزیلاسیون و رامنوزیلاسیون می‌باشد.

بر اساس داده‌های حاصل از کروماتوگرافی ستونی و میزان طیف جذبی بدست آمده از هریک از فراکشنهای فلاونوئیدی، در بین گونه‌های جنس *Stachys* ۶ کلاس فلاونوئیدی شامل ایزوفلاون، فلاونون، دی‌هیدروفلانول، فلاونول، فلاون و فلاون آگلیکون تشخیص داده شد که برای اولین بار از ایران گزارش می‌شود. تعداد ترکیبات شناسایی شده در هریک از گونه‌ها نیز به شرح مقابل می‌باشد: ۸ ترکیب در *St. lavandulifolia*، ۴ ترکیب در *St. inflata*، ۱۱ ترکیب در *St. cretica*، ۹ ترکیب در *St. spectabilis*، ۱۲ ترکیب در *St. setifera* subsp.

جدول ۴- کلاسهای فلاونوئیدی تعیین شده در بین گونه‌های جنس *Stachys* با استفاده از داده‌های طیف جذبی اشعه ماوراءبنفش (نانومتر) بر اساس باند یک در عوامل شیفت‌دهنده متانول، کلرید آلومینیوم، کلرید آلومینیوم/اسید کلریدریک، استات سدیم، استات سدیم/اسید بوریک

Daens.	Iran.	Set.	Spect.	Cret.	Infl.	Lavan.	گونه و ترکیب
-	+	-	+	+	+	+	ایزوفلاون ۱
-	+	-	-	-	-	+	ایزوفلاون ۲
-	-	-	-	+	-	-	ایزوفلاون ۳
+	+	-	-	+	-	-	فلاونون ۱
+	+	-	-	-	-	-	فلاونون ۲
-	-	+	-	-	-	-	فلاونون ۳
-	-	+	+	-	-	-	دی هیدروفلانول ۱
-	+	-	-	+	-	-	دی هیدروفلانول ۲
-	+	+	-	-	-	-	فلاونول ۱
-	-	-	-	+	-	-	فلاونول ۲
+	-	-	-	-	-	-	فلاونول ۳
+	-	+	-	-	-	-	فلاونول ۴
+	+	+	+	+	+	+	فلاون ۱
-	-	-	-	+	-	-	فلاون ۲
-	-	-	+	-	-	-	فلاون ۳
-	-	-	-	+	+	+	فلاون ۴
-	+	+	-	+	-	+	فلاون ۵
-	-	+	-	-	-	-	فلاون ۶

ادامه جدول ۴-

+	-	-	-	-	-	-	فلاون ۷
+	-	+	-	+	-	-	فلاون آگلیکون ۸
-	-	-	+	-	+	-	فلاون آگلیکون ۹
-	-	-	+	-	-	-	فلاون آگلی کون ۱۰
-	-	-	+	-	-	-	فلاون ۱۱
+	-	-	+	-	-	-	فلاون ۱۲
-	-	-	+	-	-	-	فلاون ۱۳
-	-	+	-	-	-	+	فلاون ۱۴
-	+	-	-	-	-	+	فلاون ۱۵
+	-	-	-	-	-	+	فلاون ۱۶
-	-	-	-	+	-	-	فلاون ۱۷
+	-	+	-	-	-	-	فلاون ۱۸
		+					فلاون ۱۹
+	-	-	-	-	-	-	فلاون ۲۰
-	-	+	-	-	-	-	فلاون ۲۱

طول موجها به ترتیب عوامل شیفت‌دهنده در هر کلاس فلاونوئیدی شامل ایزوفلاون ۱: ۲۸۴، ۲۸۵، ۲۷۴، ۳۵۲، ایزوفلاون ۲: ۳۲۳، ۳۶۳، ۳۳۶، ۳۴۳، ۳۳۵، ایزوفلاون ۳: ۳۰۱، ۳۰۰، ۳۰۱، ۳۰۴، ۳۰۲، فلاونون ۱: ۳۱۷، ۳۱۲، ۳۱۰، ۳۱۴، ۳۱۳، فلاونون ۲: ۳۲۶، ۳۸۳، ۳۷۹، ۳۲۸، ۳۲۶، فلاونون ۳: ۳۱۲، ۳۱۱، ۳۱۱، ۳۱۱، ۳۱۲، ۳۱۲، دی‌هیدروفلانول: ۳۳۲، ۳۸۳، ۳۷۹، ۳۲۹، ۳۳۸، دی‌هیدروفلانول: ۳۱۰، ۳۴۹، ۳۰۸، ۳۳۴، ۳۱۴، فلاونول ۱: ۳۴۳، ۳۹۶، ۴۰۲، ۳۹۶، ۳۴۰، فلاونول ۲: ۳۹۳، ۳۹۱، ۳۶۴، ۳۳۲، فلاونول ۳: ۳۶۰، ۳۹۶، ۴۰۲، ۳۹۶، ۳۸۰، فلاون ۱: ۳۶۴، ۳۶۶، ۳۹۵، ۲۷۴، ۲۸۷، فلاون ۲: ۳۳۹، ۳۳۶، ۳۳۶، ۳۳۵، ۳۹۸، ۴۰۳، ۳۳۶، ۳۳۹، فلاون ۳: ۳۵۰، ۳۸۵، ۳۴۱، ۳۳۴، فلاون ۴: ۳۵۵، ۳۸۹، ۳۸۱، ۳۸۹، ۳۳۰، فلاون ۵: ۳۲۳، ۳۷۵، ۳۴۶، ۳۶۰، ۳۳۳، فلاون ۶: ۴۰۷، ۳۳۲، ۴۰۸، ۳۹۰، ۳۳۶، فلاون ۷: ۳۳۸، ۳۳۸، ۳۴۰، ۳۳۴، ۳۳۵، فلاون آگلیکون ۸: ۳۳۲، فلاون آگلیکون ۹: ۳۲۷، ۳۲۷، ۳۲۷، ۳۲۷، ۳۲۷، ۳۲۷، فلاون آگلی کون ۱۰: ۳۲۵، ۳۴۷، ۳۴۵، ۳۴۷، ۳۲۷، ۳۲۷، فلاون آگلی کون ۱۱: ۳۳۶، ۳۶۵، ۳۲۹، ۳۷۸، ۴۱۲، فلاون ۱۲: ۳۲۸، ۳۲۴، ۳۸۱، ۳۸۱، ۳۲۴، فلاون ۱۳: ۳۴۰، ۳۸۷، ۳۸۲، ۳۸۶، ۳۳۳، فلاون ۱۴: ۳۱۱، ۳۸۰، ۳۸۱، ۳۵۹، ۳۱۵، فلاون ۱۵: ۳۸۷، ۳۳۶، ۳۳۹، ۳۶۹، ۳۸۷، فلاون ۱۶: ۳۶۰، ۳۳۳، ۳۶۰، ۴۵۸، ۴۰۹، ۳۳۳، فلاون ۱۷: ۳۷۰، ۳۸۹، ۴۲۴، ۳۴۸، فلاون ۱۸: ۴۳۰، ۳۸۴، ۳۸۵، ۴۲۶، ۳۴۹، فلاون ۱۹: ۴۰۰، ۳۶۵، ۳۶۷، ۳۴۸، فلاون ۲۰: ۳۷۵، ۳۲۵، ۳۳۰، ۳۵۶، ۳۷۸، فلاون ۲۱: ۳۲۶، ۳۲۷، ۳۴۰، ۳۸۲، ۳۸۳.

بحث

می‌دهد. در مطالعات فیلوژنی بر مبنای توالیهای ژن ITS هسته ای، جمعیت‌های متعلق به *St. spectabilis* در ترکیه تنها یک گروه را تشکیل داده اند (۱۴) که مطابق با نتایج حاصل از الگوهای فلاونوئیدی در این مطالعه نمی‌باشد. بر پایه ویژگیهای تشریحی در بخش *Salmaki*, *Eriostomum* و همکاران (۲۰۰۹ و ۲۰۱۱) این بخش را یک گروه یکنواخت معرفی می‌کنند و این یکنواختی در پوشش سطوح رویشی نیز متمرکز است (۴۹، ۵۰). با وجود این، *Salmaki* و همکاران (۲۰۰۸) با مطالعه بر روی دانه گرده در این بخش نشان دادند که *St. spectabilis* دارای ویژگیهای متنوع در تزئینات سطح دانه گرده می‌باشد و از لحاظ شیارهای سطح فندقه نیز متفاوت است (۴۶)، همچنین با استفاده از توالیهای ژنی ITS در بین گونه‌های *Stachys* در ترکیه مشخص شد که زیرگونه‌های متعلق به گونه *St. cretica* دو کلاد در مجاور یکدیگر، ولی متمایز را تشکیل می‌دهند که با نتایج الگوهای فلاونوئیدی در این مطالعه مطابقت می‌کند (۱۴). شایان ذکر است که *St. cretica* مورد بررسی در این مطالعه از لحاظ شکل برگ، تراکم کرک در سطوح برگ و ساقه با سایر نمونه‌های تیپ متفاوت بود. *Salmaki* و همکاران (۲۰۱۳) با بهره‌گیری از توالیهای ITS هسته ای و روش فیلوژنتیکی دو گروه مجزا را برای این دو گونه معرفی کردند که با نتایج این مطالعه هماهنگی دارد (۵۲). قابل ذکر است که *St. spectabilis* و *St. cretica* از نظر ریخت‌شناسی

نتایج حاصل از تنوع الگوهای فلاونوئیدی در گونه‌های جنس *Stachys* در این مطالعه می‌تواند حاکی از تغییرات درون گونه ای و الگوی پراکنش جغرافیایی در گونه‌های متعلق به این جنس باشد (۵۵). بر مبنای نتایج حاصل، الگوهای فلاونوئیدی در جداسازی تاکسونهای متعلق به ۴ بخش جنس *Stachys* و حل مشکلات این جنس کارآمد معرفی می‌گردد. بر این اساس، موقعیت کموتاکسونومیک اعضای هر یک از بخشها بطور جداگانه و به شرح زیر ارائه شده است:

بخش *Eriostomum*: نتایج حاصل از تحلیل خوشه ای بیانگر این است که در بخش *Eriostomum* تنها *St. spectabilis* دارای دو گروه متفاوت است، به طوری که یکی از جمعیتها (شماره ۲۸۵) نامشابه‌ترین گروه را نسبت به سایر جمعیتها نشان می‌دهد. حضور و عدم حضور برخی از لکه‌ها در کروماتوگرام تأییدی بر این اختلاف است (جدول ۲). در حالی که در جمعیتهای *St. cretica* تنوع الگوهای فلاونوئیدی مشاهده نشد. این اختلاف در ویژگیهای ریخت‌شناسی نیز منعکس شده است، به طوری که *St. spectabilis* با شماره جمعیت ۲۸۵ در ویژگیهایی مانند شکل برگ، شکل حاشیه برگ، پوشش محور گل آذینی، شکل کاسبرگ و طول دندانهای کاسبرگ اختلاف ریخت‌شناسی را با سایر جمعیتها نشان

نیست (۴۹). در حالی که با استناد بر ویژگی‌های مربوط به تزئینات دانه گرده *St. setifera* subsp. *daensis* و *St. setifera* subsp. *iranica* از یکدیگر مجزا می‌شوند (۴۶). جمزاد (۱۳۹۱) نیز تفکیک این سه زیر گونه را مشکل می‌داند، به طوری که نمونه‌های بینا بینی نیز در این گونه گزارش شده است (۱). در نتایج این مطالعه، الگوهای فلاونوئیدی قادر به جداسازی زیر گونه‌های *St. setifera* بودند. همچنین نوع کلاس فلاونوئیدی در بین زیر گونه‌ها حاکی از وجود تمایز بین *St. setifera* subsp. *daensis* از دو زیر گونه دیگر می‌باشد.

بخش *Ambleia* و *Zietenia* : در بخش *Ambleia*

جمعیت‌های متعلق به *St. inflata* با شماره ۱۳۳ از سایر جمعیت‌های متعلق به این گونه مجزا شده است و این تنوع در الگوهای فلاونوئیدی نیز به چشم می‌خورد. این تنوع در ویژگی‌های ریخت‌شناسی جمعیت‌های این گونه در صفاتی مانند شکل برگ، طول دندانه کاسبرگ، رنگ کاسبرگ، طول کاسبرگ، شکل براکت و طول براکت مشاهده شده است. Samaki و همکاران (۲۰۱۲) نیز حضور تغییرات ریخت‌شناسی در نوع کرکهای ساقه، شکل و ابعاد کاسبرگ و دندانه‌های کاسبرگ را در زیر گونه‌های این گونه معرفی کردند (۵۱). در تحلیل خوشه‌ای بخش *St. lavandulifolia*، *Zietenia* تنوع الگوهای فلاونوئیدی قابل ملاحظه‌ای را در بین جمعیت‌ها بنمایش می‌گذارد و ۴ گروه را تشکیل می‌دهد و در عین حال از *St. inflata* نیز کاملاً مجزا شده است. Salmaki و همکاران (۲۰۰۸) با بهره‌گیری از دانه گرده و فندقه *St. lavandulifolia* را یک بخش مونوتیپیک معرفی می‌کنند (۴۶، ۴۷). Salmaki و همکاران (۲۰۰۸ و ۲۰۱۱) بر این عقیده‌اند که گونه‌های متعلق به بخش *Ambleia* یک گروه مستقل را تشکیل می‌دهد ولی در الگوهای تزئینات فندقه ویژگی منحصر بفردی را نشان نمی‌دهند (۴۶، ۴۷، ۴۸). با وجود دورگه‌گیری‌های متعدد در بین *St. lavandulifolia* و *St. inflata* (۵۰)، این دو گونه از یکدیگر مجزا شده‌اند و

تاکسون‌های بسیار مشابهی می‌باشند. Salmaki و همکاران (۲۰۰۸) با بهره‌گیری از تزئینات سطح فندقه این دو گونه را متفاوت از یکدیگر گزارش کردند (۴۷). جدا بودن این دو گونه در این بخش نیز توسط Bhattacharjee (۱۹۸۰) به اثبات رسیده است، به طوری که در این بخش دو زیر بخش *Creticae* و *Spectabilis* معرفی شده است (۸). با وجود اینکه اغلب گونه‌ها دارای صفات یکنواخت یا هوموژن هستند ولی در عین حال نیز تنوع ریخت‌شناسی بالایی در بین برخی از جمعیت‌های آن مشاهده می‌گردد که با نتایج حاصل از مطالعات توالی یابی ژنهای هسته‌ای و فیلوژنی این دو گونه مطابقت می‌کند (۱۴).

بخش *Setifolia* : تحلیل خوشه‌ای در بخش *ستیفولیا* نشان

دهنده مجزا بودن *St. setifera* subsp. *daensis* از دو زیر گونه دیگر *setifera* و *iranica* است. الگوهای کروماتوگرام در جمعیت‌های *St. setifera* subsp. *daensis* متفاوت از دو زیر گونه دیگر می‌باشد. در حالی که الگوهای کروماتوگرام در زیر گونه‌های *iranica* و *setifera* مشابه‌اند، حتی در بین زیر گونه‌های *setifera* نیز چندین خوشه متفاوت تشکیل شده است. Salmaki و همکاران (۲۰۱۲) در مطالعه تاکسونومی بر روی این جنس *St. setifera* subsp. *daensis* و *St. setifera* subsp. *iranica* را مترادف با *St. setifera* قرار دادند (۵۱). همچنین Salmaki و همکاران (۲۰۰۸، ۲۰۰۹) وجود شباهت‌های سطح فندقه، تریکوم و ویژگی‌های تشریحی برگ را در این سه زیر گونه گزارش کردند (۴۷، ۴۹، ۵۰). آنان اذعان کردند که ویژگی‌های سطح فندقه برای تعیین روابط فیلوژنی در این جنس و در گونه‌های خویشاوندی که تغییرات زیادی دارند حائز اهمیت نمی‌باشد، زیرا این سه زیر گونه را از یکدیگر متمایز نساخته است. Salmaki و همکاران (۲۰۰۹) در مطالعه دیگر بر روی تریکوم‌های این بخش نشان دادند که این ویژگی قادر به تفکیک تاکسون‌ها در سطوح فراگونه‌ای نمی‌باشد، به طوری که قادر به جداسازی این سه زیر گونه

هیدروکسی-۳-۸،۷،۶-ترامتوکسی فلاون، ۴-۵-دی هیدروکسی-۳-۸،۷،۶-ترا متوکسی فلاون، ۵-هیدروکسی-۴،۳،۱-پنتا متوکسی فلاون و ۵-هیدروکسی-۴،۳،۸،۷،۶-پنتامتوکسی فلاون اشاره کرد که اغلب در گونه‌هایی مانند *St. tibetica* Vatke، *St. aegyptiaca* Pers.، *St. bombycina* schtschegleevii Sosn. ex Grossh.، *St. bizantina* و *St. neglecta* Klok. ex Kossko. Boiss. C. Koch. شناسایی شده‌اند. به‌طوری‌که با استفاده از روش‌های ذکر شده در بالا طیف‌های جذبی متانولی مختلفی در متوکسی فلاونها مانند ۳۱۱-۴۳۰ نانومتر و برای ترکیبات فلاونوئیدی مذکور ۳۰۱-۳۹۶ نانومتر گزارش شده است (۲۵، ۳۳، ۳۶، ۵۳). این یافته‌ها بشدت در توافق با نتایج حاصل از داده‌های طیف جذبی بر پایه طیف سنج UV-vis در کلاس‌های فلاونوئیدی مانند فلاونها، ایزوفلاونها، فلاونولها، دی‌هیدروفلاونولها و فلاونونها در این مطالعه می‌باشد. به‌طوری‌که در پنج نوع از عوامل شیفت‌دهنده در این مطالعه محدوده‌ای از کلاس‌های فلاونوئیدی مانند فلاونها، فلاون گلوکوزیدها، فلاونهای متیله شده و فلاونونها مشاهده شدند. در ترکیبات مختلف فلاونها به‌مراه متانول و محدوده band I، طیف‌های جذبی ۳۱۱-۴۳۰ نانومتر می‌باشد. همچنین، فلاون گلوکوزیدها با طیف‌های جذبی ۳۲۸-۳۵۰ نانومتر، فلاونهای متیله شده با طیف‌های جذبی ۳۳۰-۴۰۳ نانومتر، ایزوفلاونها با طیف‌های جذبی ۳۰۱-۳۵۳، فلاونولها با طیف‌های جذبی ۳۴۰-۳۹۶، دی‌هیدروفلاونولها با طیف‌های جذبی ۳۱۰-۳۳۲ نانومتر و فلاونونها با طیف‌های جذبی ۳۱۲-۳۲۶ نانومتر شناسایی شدند. طیف‌های جذبی همراه با سایر عوامل شیفت‌دهنده در جدول ۴ ذکر شده است.

Komissarenko و همکاران (۱۹۷۹)، Lenherr و همکاران (۱۹۸۴)، El-Ansari و همکاران (۱۹۹۵ و ۱۹۹۹)، Meremeti و همکاران (۲۰۰۴) و Serrilli و همکاران (۲۰۰۵) با بهره‌گیری از کروماتوگرافی لایه نازک، و با استفاده از نمودارهای استاندارد که توسط Markham

الگوهای فلاونوئیدی متفاوتی را بنمایش گذاشته‌اند. با استفاده از توالی‌های هسته‌ای ITS نیز مشخص شد که اعضای این دو بخش گروه‌های متفاوتی را نشان می‌دهند (۵۲).

بر پایه طیف‌های جذبی حاصل از هر یک از فراکشن‌های فلاونوئیدی، تعداد ۶ کلاس فلاونوئیدی در بین گونه‌های متعلق به چهار بخش از جنس *Stachys* شناسایی شده است، به‌طوری‌که ۳ ایزوفلاون، ۴ فلاونول، ۳ فلاونون، دو دی‌هیدروفلاونول و ۲۱ فلاون تشخیص داده شدند. در واقع فلاونها با فراوانی بالاتری نسبت به سایر کلاس‌های فلاونوئیدی در ۵ گونه و ۳ زیر گونه این جنس مشاهده شده است.

بررسی نوع ترکیبات فلاونوئیدی توسط محققان چنین نشان می‌دهد که ترکیبات فلاونوئیدی مانند آپی ژنین، لوتولین و فلاونوئید گلی کوزیدها از شاخص‌ترین ترکیبات شناخته شده در اعضای تیره Lamiaceae و به‌ویژه در جنس *Stachys* می‌باشند، به‌طوری‌که El-Ansari و همکاران (۱۹۹۱ و ۱۹۹۵) با بهره‌گیری از روش NMR (Nuclear Magnetic Resonance) طیف‌های جذبی را گزارش کردند که این طیف‌ها با طیف جذبی کلاس‌های فلاونوئیدی مانند فلاون گلوکوزیدهای شناسایی شده در این مطالعه مطابق می‌کند (۱۵، ۱۶). بر اساس نوع ترکیبات فلاونوئیدی در گونه‌های جنس *Stachys*، تعدادی از مشتقات فلاونوئیدی شامل انواع فلاونها، فلاون گلوکوزیدها و همچنین انواع دیگری از متوکسی فلاونها توسط برخی از محققان و با بهره‌گیری از روش NMR گزارش شدند (۶، ۱۵، ۱۶). از متداولترین ترکیبات فلاونوئیدی که با استفاده از روش‌های کروماتوگرافی ستونی، HPLC (High Performance Liquid Chromatography) و NMR شناسایی شده‌اند می‌توان به ترکیباتی مانند آپی ژنین-۷-۰-گلوکوزید، ایزواسکوتلارین، گزانتومیکرول، ویسین-۲ (آپی ژنین-۸،۶-دی‌سی-گلوکوزید)، ۴-۵-دی هیدروکسی-۳-۸،۷،۶-ترامتوکسی فلاون، ۴-۳،۱-تری

Markham (۱۹۸۲) و Rahman (۲۰۰۵)، بنظر می‌رسد که ترکیباتی مانند بایکالئین، هسپریدین، لوتئولین و مشتقات آن و پندولتین در ترکیبات حاصل وجود داشته باشد (۱۵، ۱۶، ۲۴، ۲۸، ۳۶، ۳۸، ۴۲، ۵۳، ۵۵، ۵۷، ۶۰).

در نتایج حاصل از این مطالعه، کلاسهای فلاونوئیدی دیگری در طیفهای جذبی متانول و باند یک مانند فلاونوئیدی با ۲۷۴ و ۳۲۳ نانومتر، پنتامتوکسی فلاون با ۳۴۰ نانومتر، تری هیدروکسی تترامتوکسی فلاون با ۳۳۰ و ۳۳۹ نانومتر، دی هیدروکسی فلاون با ۳۲۵ نانومتر و ایزوفلاونوئیدی با ۲۷۴ نانومتر مشاهده شد. این داده‌ها با ترکیبات حاصل از سایر تحقیقات مانند پومیفرین (ایزوفلاون)، نوروگونین (فلاون)، هیدروکسی فلاونها و متوکسی فلاونها که بر روی جنس *Stachys* و جنسهای وابسته به تیره *Lamiaceae* و با بهره‌گیری از روشهای NMR، HPLC، کروماتوگرافی لایه نازک و استانداردهای ارائه شده توسط Markham (۱۹۸۲) گزارش شده است، مطابقت می‌کند، به طوری که طیف جذبی متانولی ۲۷۴-۳۴۰ نانومتر گزارش شده است (۳۰، ۳۱، ۳۶، ۳۸، ۴۲، ۵۴، ۵۷، ۵۸، ۵۹). کلاسهای فلاونوئیدی جدیدی که در این جنس مشاهده گردید شامل ۲ ایزوفلاون با ۵ عامل شیفیت دهنده متانول، کلرید آلومینیوم، کلرید آلومینیوم/اسیدکلریدریک، استات سدیم، استات سدیم/اسیدبوریک و طیفهای جذبی ۳۲۳، ۳۶۳، ۳۳۶، ۳۳۵، ۳۴۳ نانومتر (ایزوفلاون ۲) و ۳۰۱، ۳۰۰، ۳۰۱، ۳۰۴، ۳۰۲ نانومتر (ایزوفلاون ۳)، یک فلاونول با طول موجهای ۳۴۰، ۳۹۳، ۳۹۱، ۳۶۴ و ۳۳۲ نانومتر (فلاونول ۲)، ۲ فلاونون با طول موجهای ۳۱۷، ۳۱۲، ۳۱۰، ۳۱۴، ۳۱۳ نانومتر (فلاون ۱) و ۳۱۲، ۳۱۱، ۳۱۱، ۳۳۵ و ۳۱۲ نانومتر (فلاونون ۳)، یک دی هیدروفلاونول با طول موجهای ۳۱۰، ۳۱۴، ۳۰۸، ۳۴۹، ۳۴۴ و ۳۱۴ نانومتر (دی هیدروفلاونول ۲) و یک فلاون با طول موجهای ۳۲۶، ۳۲۷، ۳۴۰، ۳۸۲، ۳۸۳ نانومتر (فلاون ۲۱) شناسایی شدند که برای اولین بار برای این جنس در ایران گزارش

(۱۹۸۲) ارائه شده است فلاونوئید آگلیکونهایمانند ۴-*o*-متیل ایزواسکوتلارین، اسکوتلارین، ایزواسکوتلارین و ایزواسکوتلارین-۷-*o*-بتا-دی-گلوکوپیرانوزید را در *St. recta* L.، *St. baldaccii* (May) Hand.-Mazz، *St. corsica* Pers. و *St. inflata* طیف جذبی متانولی ۳۲۳-۳۳۴ نانومتر می‌باشند (۱۵، ۱۶، ۲۴، ۲۸، ۳۶، ۳۸، ۵۳). حضور فلاونوئید آگلی کون و جایگزینی گلوکوپیرانوزید در *St. inflata* حاصل از این تحقیق از شواهد مذکور پیروی می‌کند. همچنین، Tomas-Barberan (۱۹۷۰)، Zinchenko و همکاران (۱۹۹۲)، Meremeti و همکاران (۲۰۰۴) و Skaltsa و همکاران (۲۰۰۷) ترکیبات فلاونوئیدی مانند هسپریدین (فلاونون)، لوتئولین-۷-*o*-بتا-گلوکوزید، (فلاون)، بایکالئین (فلاون) و پندولتین (فلاونول) را در *St. neglecta* Klok. ex Kossko.، *St. swainsonii* و *St. sylvatica* L.، *St. ionica* Halácsy و *St. palustris* L. و در محدوده طیفهای جذبی متانولی ۳۲۳-۴۳۰ نانومتر گزارش کردند که با کلاسهای فلاونوئیدی مانند فلاونون، فلاون و فلاونول در این مطالعه هماهنگی نشان می‌دهد (۳۶، ۳۸، ۵۵، ۵۶، ۶۰). با توجه به توضیحات ارائه شده، بنظر می‌رسد که آپی ژنین و مشتقات آن در ترکیبات فلاونوئیدی مانند فلاونوئیدی گزارش شده در این تحقیق وجود داشته باشد. در این تحقیق حضور فلاونوئید آگلی کونها با طیفهای جذبی ۳۲۵-۳۳۲ نانومتر همراه با متانول و باند یک، با مطالعات سایر محققان بر روی ترکیبات فلاونوئیدی در این جنس هماهنگی نشان می‌دهد. در طیفهای جذبی باند یک و متانول فلاونوئیدی با طول موج ۳۲۳ نانومتر و طول موجهای ۳۷۰-۴۳۰ نانومتر، فلاونوئیدی با طول موج ۳۲۶ نانومتر و فلاونوئیدی با طول موج ۳۹۶ نانومتر با نتایج ترکیبات ارائه شده در تحقیقات اخیر هماهنگی نشان می‌دهد. با توجه به طول موجهای حاصل از ترکیبات بدست آمده در این تحقیق و با استفاده از استانداردهای ارائه شده توسط

Vázquez و همکاران (۲۰۱۲) نیز مشتقاتی از این نوع فلاون را در تیره Lamiaceae و با استفاده از روش‌های LC/MS (Liquid Chromatography/Mass Spectrometry) و HPLC گزارش کردند، به طوری که این ترکیب دارای طیف جذبی متانولی ۳۲۸ نانومتر است (۲۰)، ۳۶، ۳۷. Chemesova (۱۹۹۳) ترکیب فلاونی مانند کرایزین را در جنس *Scutellaria* L. و با استفاده از کروماتوگرافی ستونی شناسایی کرد (۱۱) که در این مطالعه نیز فلاون ۱۴ در گونه های *St. lavandulifolia* و *St. setifera* subsp. *setifera* حاکی از وجود این ترکیب می باشد و طیف جذبی آن ۳۱۱ نانومتر گزارش شده است (۳۶). علاوه بر این، حضور مشتقات فلاونول گالانژین و دی هیدروفلاونول انگلتین نیز توسط Poly (۲۰۰۳) در تیره Lamiaceae و با طیف جذبی متانولی ۳۴۰ و ۳۳۲ نانومتر گزارش شده است (۳۹) که مطابق با ترکیبات بدست آمده مانند فلاونول ۲ و دی هیدروفلاونول ۱ در این تحقیق و به ترتیب در گونه های *St. cretica*، *St. setifera* subsp. *setifera* و *St. spectabilis* می باشد. حضور نوعی فلاونون مانند ساکورانین و مشتقات آن نیز توسط Foo و Lu (۲۰۰۲) و در تیره Lamiaceae با طیف جذبی متانولی ۳۱۷ نانومتر گزارش شده است (۳۱) که در این تحقیق فلاونون ۱ در گونه های *St. cretica*، *St. setifera* subsp. *daensis* و *St. setifera* subsp. *setifera* ایران تأییدی بر حضور این ترکیب می باشد.

بر اساس یافته های حاصل از فراکشنهای بدست آمده و طیف جذبی اشعه ماوراء بنفش، بنظر می رسد که تمایلی بسمت الگوهای اکسیداسیون مانند هیدروکسیلاسیون، متوکسیلاسیون و الگوهای مانند گلوکوزیلاسیون، گلوکوپیرانوزیلاسیون، روتینوزیلاسیون، گلوکورونیداسیون، رامونگلوکوزیلاسیون و رامونوزیلاسیون در موقعیتهای مختلف برقرار باشد. اغلب این جایگزینی ها مطابق با سایر نتایج حاصل در جنس *Stachys* و جنسهای دیگر تیره لایاسه با استفاده از روشهای مختلفی مانند کروماتوگرافی

می گردد. با وجود این، بررسیهای فیتوشیمیایی بیشتری برای شناسایی این ترکیبات طبیعی لازم است. با توجه به تنوع کلاسه‌های فلاونوئیدی در جنس *Stachys* چنین استنباط می گردد که تمایز ترکیبات شیمیایی مرتبط با الگوهای متنوع ترکیبات فلاونوئیدی و توزیع جغرافیایی تاکسونها باشد، به طوری که دهقان و همکاران (۱۳۹۳) و رجبیان و همکاران (۱۳۹۳) طول و عرض جغرافیایی، ارتفاع از سطح دریا و شرایط اقلیمی را به عنوان عوامل دخیل در تمایز این ترکیبات معرفی می کنند (۲، ۳، ۳۸).

از فلاونول هایی مانند ایزورامنتین، می توان به تحقیق Tomas-Barberan و همکاران (۱۹۹۲) بر روی فلاونوئیدهای تعدادی از جنسهای تیره Lamiaceae اشاره کرد که با استفاده از روشهای کروماتوگرافی لایه نازک و HPLC در جنس *Stachys* این ترکیب را شناسایی کردند، به طوری که حاوی طیف جذبی متانولی ۳۶۰ نانومتر است (۵۶). قابل ذکر است که در *St. setifera* subsp. *daensis* حضور فلاونول ۳ در این تحقیق نیز تأییدی بر وجود این ترکیب می باشد. همچنین Skaltsa و همکاران (۲۰۰۷) نیز بوجود این نوع فلاونول در زیر گونه های *St. swainsonii* و با بهره گیری از روشهای مختلفی مانند کروماتوگرافی لایه نازک و HPLC پی بردند (۵۵). در این مطالعه، فلاونولهای دیگری نیز مانند فلاونول ۴ و در *St. setifera* subsp. *setifera* و *St. setifera* subsp. *daensis* شناسایی شدند که مطابق با نظرات Tomas-Barberan و همکاران (۱۹۹۲) بر روی تیره Lamiaceae و با طیف جذبی متانولی ۳۵۴ می باشد (۵۶)، به طوری که این نوع فلاونول از مشتقات کمپفرول محسوب می گردد. Marin و همکاران (۲۰۰۱) حضور مشتقات فلاونی مانند آکاستین را در دو جنس از تیره Lamiaceae شناسایی کردند که با نتایج حاصل از این مطالعه هماهنگی نشان می دهد (۳۵). در این تحقیق، فلاون ۱۲ در گونه های *St. spectabilis* و *St. setifera* subsp. *daensis* این امر را تأیید می کند، همچنین Hossein و همکاران (۲۰۱۰) و Martínez-

استخلافهایی مانند ۷-۰-روتینوزیل، ۷-۰-گلوکوروبونید، ۷-۰-بتا-گلوکوروبونید، ۳-۰-بتا-گلوکوروبونید، ۳-۰-بتا-گلوکوپیرانوزیل و ۴-۰-بتا-گلوکوپیرانوزیل مشاهده شده است که در دو زیر گونه دیگر *St. setifera* متعلق به این بخش وجود ندارد. این سه زیر گونه در الگوهای اکسیداسیون مانند متوکسیلاسیون و هیدروکسیلاسیون نیز اختلاف نشان می‌دهند. در این بخش اغلب ترکیباتی مانند فلاونون ۱ و ۲، فلاونول ۱ و فلاونهای ۱، ۵ و ۱۸ وجود دارد. قابل ذکر است که ترکیبات فلاونوئیدی متفاوتی در موقعیتهای تاکسونومیکی متفاوت مشاهده می‌گردد (۵۵). علاوه بر این، جنس *Stachys* از لحاظ ترکیبات شیمیایی تنوع بسیار بالایی را نشان می‌دهد که وابسته به حضور چند شکلیهای متعدد ریخت‌شناسی و مراحل مختلف نمو است (۱۰).

نتیجه‌گیری

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی از این تحقیق، کلاسهای فلاونوئیدی در جنس *Stachys* تنوع زیادی را در ناحیه زاگرس مرکزی ایران نشان می‌دهد. علاوه بر این، تمایز ترکیبات شیمیایی مرتبط با ساختار شیمیایی متغیر و سازگارهای مختلف در تاکسونها می‌باشد. بر اساس نتایج حاصل از تحلیل خوشه‌ای چنین نتیجه‌گیری می‌گردد که به این گونه کاملاً تفکیک شده است، همچنین با وجود شباهتهای ریخت‌شناسی و ویژگیهای حدواسط میان *St. spectabilis* و *St. cretica* این دو گونه از یکدیگر تفکیک شده‌اند و در نهایت اینکه *St. lavandulifolia* بالاترین تعداد گروه را در این تحلیل به نمایش می‌گذارد. شایان ذکر است که در این تحقیق الگوهای اکسیداسیون مانند هیدروکسیلاسیون، متوکسیلاسیون و گلی کوزیلاسیون از ویژگیهای اختصاصی در جنس *Stachys* محسوب می‌شوند و حضور این تغییرات در تاکسونومی این جنس حائز اهمیت می‌باشد. علاوه بر این، در این

ستونی، NMR و HPLC می‌باشد (۵، ۹، ۱۲، ۱۶، ۲۱، ۲۴، ۲۶، ۲۸، ۳۰، ۳۱، ۴۲، ۵۳، ۵۵، ۵۷، ۵۸). قابل ذکر است که الگوهای تری هیدروکسیلاسیون در موقعیتهای ۵ و ۴ در *St. spectabilis* مطابق با نتایج حاصل از Derkach و همکاران (۱۹۸۰) با استفاده از کروماتوگرافی کاغذی و ستونی بر روی همین گونه می‌باشد (۱۳). علاوه بر این، الگوهای ۴-۰-بتا-گلوکوپیرانوزیل و ۲-۰-رامنوزیل از جمله الگوهای جایگزینی جدید در این جنس هستند. شایان ذکر است که بیشتر جایگزینی‌ها از نوع هیدروکسیلاسیونها در موقعیتهای ۵، ۶، ۷، ۸، ۳ و ۴ و متوکسیلاسیون در موقعیت ۴ می‌باشد.

در کلیه بخشهای مورد مطالعه در این تحقیق و در طیفهای جذبی متانول، دو ترکیب فلاون ۱ و ایزوفلاون ۱ با طول موجهای ۳۵۳ و ۳۶۴ نانومتر مشترک هستند. در بخش *Ambleia* و *Zietenia* گونه‌های *St. lavandulifolia* و *St. inflata* وجه اشتراکی از لحاظ هیدروکسیلاسیون در موقعیتهای ۵، ۷، ۸، ۳، ۴ و متوکسیلاسیون در موقعیت ۴ مشاهده می‌گردد که احتمالاً بعلت وجود گونه‌های حدواسط می‌باشد (۱). در *St. lavandulifolia* ایزوفلاون ۲ و فلاونهای ۱۴، ۱۵ و ۱۶ مشاهده می‌گردد ولی در *St. inflata* فلاون ۵ و آگلیکون ۹ وجود دارد (جدول ۴). در اعضای بخش *Eriostomum* اختلافات اکثراً متعلق به جایگزینی‌های هیدروکسیلاسیون در موقعیتهای ۳، ۶، ۵، ۳ و متوکسیلاسیون در موقعیتهای ۷، ۸ و ۳ می‌باشد. اختلاف بین دو گونه *St. cretica* و *St. spectabilis* بدلیل حضور کلاسهای فلاونوئیدی مانند ایزوفلاون ۳، فلاونون ۱، دی هیدروفلاونول ۱ و ۲، فلاونول ۲، فلاون ۲، ۳، ۴، ۵، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۷ و فلاون آگلی کون ۸، ۹ و ۱۰ می‌باشد. در بخش *Setifolia* وجه اشتراک دو زیر گونه *setifera* و *iranica* مربوط به فلاونول ۱ و فلاون ۵ می‌باشد و علت اختلاف زیر گونه *daensis* با سایر زیر گونه‌های این بخش مربوط به حضور فلاونهای ۷، ۱۲، ۱۶، ۱۷ و ۲۰ و فلاونول ۳ است. همچنین در این زیر گونه

نویسندگان مقاله از مسئولان محترم تحصیلات تکمیلی و معاونت پژوهشی دانشگاه شهرکرد کمال تشکر را دارند.

رابطه روش کروماتوگرافی لایه نازک مبتنی بر فلاونوئیدها مفید و کاربردی معرفی می‌گردد.

سپاسگزاری

منابع

- ۱- جمزاد، ز. ۱۳۹۱. تیره‌ی لامیاسه. ویراستاران: اسدی، م، معصومی، ع. ا. و مظفریان، و. فلور ایران، موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، ۷۶، ۱۶۲-۲۳۲.
- ۲- دهقان، ز. سفیدکن، ف. امامی، م. و کلوندی، ر. ۱۳۹۳. تأثیر شرایط اقلیمی بر بازده و کیفیت اسانس *Ziziphora clinopodioides* subsp. *rigida* در رویشگاههای مختلف استان همدان. مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران)، ۲۷: ۶۱-۷۱.
- ۳- رجبیان، ط.، رحمانی، ن.، سلیمی، ا. و شهیری طبرستانی، ف. ۱۳۹۳. بررسی اجزای شیمیایی روغن اسانسی میوه چهار جمعیت خودروی گلپرگانی ایران (*Heracleum gorganicum* Rech. f). مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران)، ۲۷: ۸۲-۹۰.
- 4- Ahmad, V.U., Arshad, S., Bader, S., Ahmed, A., Iqbal, S. and Tareen, R.B. 2006. New phenethyl alcohol glycosides from *Stachys parviflora*. Journal of Asian Natural Products Research, 8:105-111.
- 5- Ahmad, V.U., Arshad, S., Bader, S., Iqbal, S., Khan, A., Khan, S.S., Hussain, J., Tareen, R.B. and Ahmed, A. 2008. New terpenoids from *Stachys parviflora* Benth. Magnetic Resonance in Chemistry, 46: 986-989.
- 6- Asnaashari, S., Delazar, A., Alipour, S.S., Nahar, L., Williams, A.S., Pasdaran, A., Mojarab, M., Fathi Azad, F. and Sarker, S.D. 2010. Chemical composition, free-radical-scavenging and insecticidal activities of the aerial parts of *Stachys byzantine*. Archives of Biological Sciences Belgrade, 62: 653-662.
- 7- Bankovaa, V., Koeva-Todorovskab, J., Stambolijskab, T., Ignatova-Grocevab, M.D., Todorovaa, D. and Popova, S. 1999. Polyphenols in *Stachys* and *Betonica* Species (Lamiaceae). Zeitschrift für Naturforschung, 54c: 876-880.
- 8- Bhattacharjee, R. 1980. Taxonomic studies in *Stachys* part II: a new infrageneric classification of *Stachys* L. Notes from the Royal Botanic Garden Edinburgh, 38: 65-96.
- 9- Bilusic Vundac, V., Males, Z., Plazibat, M., Golja, P. and Cetina-Cizmek, B. 2005. HPTLC determination of flavonoids and phenolic acids in some Croatian *Stachys* taxa. Journal of planar chromatography, 18: 269-273.
- 10- Cavar, S., Maksimovic, M. and Solic, M.E. 2010. Comparison of essential oil composition of *Stachys menthifolia* Vis. from two natural habitats in Croatia. Biologica Nyssana, 1: 99-103.
- 11- Chemesova, I.I. 1993. The flavonoid aglycones of *Scutellaria* species. Lamiales News Letter, 2: 2.
- 12- Delazar, A., Celik, S., Gokturk, R.S., Unal, O., Nahar, L. and Sarker, S.D. 2005. Two acylated flavonoid glycosides from *Stachys bombycina*, and their free radical scavenging activity. Pharmazie, 60: 878-80.
- 13- Derkach, A.I., Komissarenko, N.F., Gordienko, V.G., Sheremet, I.P., Kovalem, I.P. and Pakaln, D.A. 1980. Flavonoids from *Stachys spectabilis*. Chemistry of Natural Compounds, 16: 128-130.
- 14- Dundar, E., Akcicek, E., Dirmenci, T. and Akgun, S. 2013. Phylogenetic analysis of the genus *Stachys* sect. *Eriostomum* (Lamiaceae) in Turkey based on nuclear ribosomal ITS sequences. Turkish Journal of Botany, 37: 14-23.
- 15- El-Ansari, M.A., Abdalla, B.M.F., Saleh, N.A.M. and Quere, J.L.L. 1991. Flavonoid constituents of *Stachys aegyptiaca*. Phytochemistry, 30: 1169-1173.
- 16- El-Ansari, M.A., Nawwar, M.A. and Saleh, N.A.M. 1995. Stachysetin a diapigenin-7-glucoside-p,p'-dihydroxy-truxinate from *Stachys aegyptiaca*. Phytochemistry, 40: 1543-1548.
- 17- Erdogan, E., Akcicek, E., Selvi, S. and Tumen, G. 2011. Comparative morphological and ecological studies of two *Stachys* species (sect. *Eriostomum*, subsect. *Germanicae*) grown in

- Turkey. *African Journal of Biotechnology*, 10: 17990-17996.
- 18- Falciani, L. 1997. Systematic revision of *Stachys* sect. *Eriostemum* (Hoffmans and Limk) Dumort. in *Italy. Lagasalia*, 19: 187-238.
- 19- Gohari, A.R., Ebrahimi, H., Saeidnia, S., Foruzani, M., Ebrahimi, P. and Ajani, Y. 2011. Flavones and flavone glycosides from *Salvia macrosiphon* Boiss. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 10: 247-251.
- 20- Hossain, M.B., Rai, D.K., Brunton, N.P., Martin-Diana, A.B. and Barry-Ryan, C. 2010. Characterization of phenolics composition in Lamiaceae spices by LC-ESI-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 10576-10581.
- 21- Hsu, Y.L., Uen, Y.H., Chen, Y.I., Liang, H.L. and Kuo, P.L. 2009. Tricetin a dietary flavonoid inhibits proliferation of human breast den carcinoma MCF-7 cells by blocking cell cycle progression and inducing apoptosis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 8688-8695.
- 22- Khanavi, M., Hadjiakhoondi, A., Gholamreza, A., Amanzadeh, Y., Rustaiyan, A. and Shafiee, A. 2004. Comparison of the volatile composition of *Stachys persica* Gmel. and *Stachys byzantina* C. Koch. oils obtained by hydrodistillation and steam distillation. *Zeitschrift für Naturforschung*, 59c: 463-467.
- 23- Kochieva, E.Z., Ryzhova, N.N., Legkobit, M.P. and Khadeeva, N.V. 2006. RAPD and ISSR analyses of species and populations of the genus *Stachys*. *Russian Journal of Genetics*, 42: 723-727.
- 24- Komissarenko, N.F., Derkach, A.I., Sheremet, I.P., Kovalev, I.P., Gordienko, V.G. and Pakaln, D.A. 1979. Flavonoids of *Stachys inflata*. *Chemistry of Natural Compounds*, 14: 445-446.
- 25- Kostyuchenko, O.I., Komissarenko, N.F., Kovalev, I.P., Derkach, A.I. and Gordienko, V.G. 1982a. Acetylspectabiflaside from *Stachys atherocalyx*. *Khimija Prirodnykh Soyedineniy*, 97: 187-189.
- 26- Kotsos, M.P., Aligiannis, N. and Mitakou, S. 2007. A new flavonoid diglycoside and triterpenoids from *Stachys spinosa* L. (Lamiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 35: 381- 385.
- 27- Kumar, D., Bhat, Z.A., Kumar, V. and Shah, M.Y. 2012. Flavonoid glycoside from the roots of *Stachys tibetica* and its effect on anxiety. *International Journal of Natural Products Sciences*, 1: 136.
- 28- Lenherr, A., Meier, B. and Sticher, O. 1984b. Modern HPLC as a tool for chemotaxonomical investigations: iridoid glucosides and acetylated flavonoids in the group of *Stachys recta*. *Planta Medica*, 50: 403-409.
- 29- Lindqvist, Ch. and Albert, V.A. 2002. Origin of the Hawaiian endemic mints within north American *Stachys* (Lamiaceae). *American Journal of Botany*, 89: 1709-1724.
- 30- Liu, G., Ma, J., Chen, Y., Tian, Q., Shen, Y., Wang, X., Chen, B. and Yao, S. 2009. Investigation of flavonoid profile of *Scutellaria bacalensis* Georgi by high performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 12: 164809-4814.
- 31- Lu, Y. and Foo, L.Y. 2002. Polyphenolic in *Salvia*. *Phytochemistry*, 59: 117-140.
- 32- Maksimovic, M., Vidic, D., Milos, M., Solic, M.E., Abadzic, S. and Siljak-Yakovlev, S. 2007. Effect of the environmental conditions on essential oil profile in two Dinaric *Salvia* species: *S. brachyodon* Vandas and *S. officinalis* L. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35: 473-478.
- 33- Maleki-Dizaji, N., Nazemiyeh, H., Maddah, N., Mehmani, F. and Garjani, A. 2008. Screening of extracts and fractions from aerial parts of *Stachys schtschegleevii* Sosn. for anti-inflammatory activities. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21: 338-343.
- 34- Marin, P.D., Grayer, R.J., Grujic-Jovanovic, S., Kite, G.C. and Veitch, N.C. 2004. Glycosides of tricetin methyl ethers as chemosystematic markers in *Stachys* subgenus *Betonica*. *Phytochemistry*, 65: 1247-1253.
- 35- Marin, P.D., Greyer, R.J., Veitch, N.C., Kite, G.C. and Harborne, J.B. 2001. Acacatin glycosides as taxonomic markers in *Calamintha* and *Micromeria*. *Phytochemistry*, 58: 943-947.
- 36- Markham, K.R. 1982. *Techniques of Flavonoid Identification*, Academic Press, New York, 113 p.
- 37- Martinez-Vazquez, M., Estrada-Reyes, R., Martinez-Laurrabaquiob, A., Lopez-Rubalcavac, C. and Heinzed, G. 2012. Neuropharmacological study of *Dracocephalum moldavica* L. (Lamiaceae) in mice: Sedative effect and chemical analysis of an aqueous extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 141: 908-917.

- 38- Meremeti, A., Karioti, A., Skaltsa, H., Heilmann, J. and Sticher, O. 2004. Secondary metabolites from *Stachys ionica*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32: 139–151.
- 39- Polya, G. 2003. *Biochemical Targets of Plant Bioactive Compounds*, Taylor Francis, London, 847 p.
- 40- Radulovic, N., Lazarevic, J., Stojanovic, G. and Palic, R. 2006. Chemotaxonomically significant 2-ethyl substituted fatty acids from *Stachys milanii* Petrovic (Lamiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 34: 341-344.
- 41- Radulovic, N., Lazarevic, J., Ristic, N. and Palic, R. 2007. Chemotaxonomic significance of the volatiles in the genus *Stachys* (Lamiaceae): Essential oil composition of four Balkan *Stachys* species. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35: 196-208.
- 42- Rahman, A. 2005. *Studies In Natural Products Chemistry* (vol. 30), Elsevier, 849 p.
- 43- Rechinger, K.H. 1982. *Stachys*. In: Rechinger, K.H. (ed.). *Flora Iranica* (vol. 150), Akademische Druck-und Verlagsanstalt, Austria, Graz, pp. 354–396.
- 44- Rustaiyan, A., Masoudi, Sh., Ameri, N., Samiee, K. and Monfared, A. 2006. Volatile constituents of *Ballota aucheri* Boiss., *Stachys benthamiana* Boiss. and *Perovskia abrotanoides* Karel. growing wild in Iran. *Journal of Essential Oil Research*, 18: 218-221.
- 45- Safaei-Ghomi, J., Bamoniri, A., Hatami, A. and Batooli, H. 2007. Composition of the essential oil of *Stachys acerosa* growing in central Iran. *Chemistry of Natural Compounds*, 43: 37-39.
- 46- Salmaki, Y., Jamzad, Z., Zarre, S. and Brauchler, C. 2008. Pollen morphology of *Stachys* (Lamiaceae) in Iran and its systematic implication. *Flora*, 203: 627–639.
- 47- Salmaki, Y., Zarre, S. and Jamzad, Z. 2008. Nutlet morphology of *Stachys* (Lamiaceae) in Iran and its systematic implication. *Feddes Repertorium*, 119: 631–645.
- 48- Salmaki, Y., Zarre, S., Jamzad, Z. and Matinzadeh, M. 2009a. Circumscription of taxa in the chasmophilous Iranian *Stachys* species (Lamiaceae: sect. *Fragilicaulis*, subsect. *Fragiles*) inferred from isoenzyme variation patterns. *Biochemical Systematics and Ecology*, 36: 907–914.
- 49- Salmaki, Y., Zarre, S., Jamzad, Z. and Brauchler, C. 2009b. Trichome micromorphology of Iranian *Stachys* (Lamiaceae) with emphasis on its systematic implication. *Flora*, 204: 371–381.
- 50- Salmaki, Y., Zarre, S., Lindqvist, C., Heubl, G. and Brauchler, C. 2011. Comparative leaf anatomy of *Stachys* (Lamiaceae: Lamioideae) in Iran with a discussion on its sub generic classification. *Plant Systematics and Evolution*, 294: 109–125.
- 51- Salmaki, Y., Zarre, S., Govaerts, R. and Brauchler, C. 2012. A taxonomic revision of the genus *Stachys* (Lamiaceae: Lamioideae) in Iran. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 170: 573–617.
- 52- Salmaki, Y., Zarre, S., Ryding, O., Lindqvist, Ch., Brauchler, C., Heubl, G., Barber, J. and Bendiksby, M. 2013. Molecular phylogeny of tribe Stachydeae (Lamiaceae subfamily Lamioideae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 69: 535-551.
- 53- Serrilli, A.M., Ramunno, A., Piccioni, F., Serafini, M. and Ballero, M. 2005. Flavonoids and iridoids from *Stachys corsica*. *Natural Product Research*, 19: 561-565.
- 54- Shirsat, R., Suradkar, S. and Koche, D. 2012. Some Phenolic Compounds of *Salvia Plebeia* R. BR. *Biosciences Discovery*, 3: 61-63.
- 55- Skaltsa, H., Georgakopoulos, P., Lazari, D., Karioti, A., Heilmann, J., Sticher, O. and Constantinidis, Th. 2007. Flavonoids as chemotaxonomic markers in the polymorphic *Stachys swainsonii* (Lamiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 35: 317-320.
- 56- Tomas-Barberan, F.A., Gi, M.I., Ferreres, F. and Tomas-Lorente, F. 1992. Flavonoid *p*-coumaroylglucosides and 8-hydroxyflavone allosylglucosides in some Labiatae, *Phytochemistry*, 31: 3097–3102.
- 57- Tomas-Lorente, F., Ferreres, F., Tomas-Barberan, F.A., Rivera, D. and Obon, C. 1988. Some flavonoids and the diterpene borjatriol from some Spanish *Siden'tis* species. *Biochemical Systematics and Ecology*, 16: 33-42.
- 58- Ulubelen, A. and Topcu, G. 1992. Abietane diterpenoids from *Salvia pomifera*, *Phytochemistry*, 31: 3949-3951.
- 59- Wozniak, D., Lamer-Zarawska, E. and Mathkowski, A. 2004. Antimutagenic and antiradical properties of flavones from the roots of *Scutellaria baicalensis*. *Food/Nahrung*, 48: 9-12.

- 60- Zinchenko, T.V. 1970a. Flavonoid glycosides of *Stachys neglecta*. Farmatsevtichnyi zhurnal, 25: 81–82.

The study of flavonoid patterns diversity in five *Stachys* species in Iran

Kharazian N., Mohammadi M. and Shabani L.

Biology Dept., Faculty of Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, I.R. of Iran

Abstract

Stachys L. (Lamiaceae family, Lamioideae sub family) genus with enormous medicinal properties is one of the largest genera of this family. Due to the similarity among the species, high morphological diversity and several hybridizations, the taxonomy of this genus is greatly complicated. Consequently, the aim of this research is to study the flavonoid diversity, identify the flavonoid class and determine the taxonomical position of five species and three subspecies belonging to four sections. Therefore, the leaf flavonoid was extracted by methanol solvent and thin layer chromatography. In order to determine the flavonoid class, column chromatography and cephadex was used. As well, the diversity of flavonoid patterns and the taxonomic position of species and accessions were studied using cluster analysis. The results of cluster analysis showed that the highest flavonoid diversity was observed in *St. lavandulifolia* Vahl. Moreover, six flavonoid classes were identified which mostly included flavone and the variations of flavonoid patterns were hydroxylation, methoxylation and glucosylation. Obviously, *St. setifera* subsp. *daenensis* was separated from *St. setifera* subsp. *setifera* and *St. setifera* subsp. *iranica* using five kinds of flavones and a kind of flavonol. Based on the results of this study, the flavonoid compounds are useful to determine the position of *Stachys* species.

Key words: flavonoid, diversity, *Stachys*, Lamiaceae