بررسی مقایسه‌ای محتوای رزمارینیک اسید و سالویانولیک اسیدهای A و B در ۴ گونه مریم‌گلی (*Salvia* L.) خودروی ایران

مرضیه فتوت[۱]، طیبه رجبیان[۱*]، عذرا صبورا[۲]، مسعود رنجبر[۳] و رقیه السادات اجتهد[۴]

[۱] تهران، دانشگاه شاهد، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

[۲] تهران، دانشگاه الزهرا، دانشکده علوم زیستی، گروه علوم گیاهی

[۳] همدان، دانشگاه بوعلی سینا، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

[۴] کاشان، دانشگاه کاشان، دانشکده شیمی، گروه زیست‌فناوری

تاریخ دریافت: ۹۲/۹/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۱/۲

چکیده

مریم‌گلی (*Salvia* L.)، یکی از بزرگ‌ترین جنس‌های تیره نعناعیان (Lamiaceae) با ۵۸ گونه در ایران است. روغن‌های اسانسی، ترپنوئیدها، مشتقات اسیدهای فنلی و فلاونوئیدها، متابولیت‌های ثانوی اصلی گونه‌های مریم‌گلی را تشکیل می‌دهند و خواص دارویی این گیاهان به طور عمده مربوط به فعالیت‌های پاداکسایشی این ترکیبات می‌باشد. در این پژوهش، برخی اسیدهای فنلی (رزمارینیک اسید، سالویانولیک اسیدهای A و B)، در برگ و ریشه ۴ گونه مریم‌گلی خودروی ایران برای اولین بار به روش HPLC جداسازی و سنجش شدند. بر طبق نتایج حاصل، *S. verticillata* با بیشترین مقدار رزمارینیک اسید در برگ و ریشه (به ترتیب ۰/۸۸±۴۱/۵۳ و ۰/۱۹±۵/۹۹ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک)، به عنوان غنی‌ترین منبع این اسید فنلی شناسایی شد. مقدار سالویانولیک اسید B از ۴/۹۵±۲۶/۸۹ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک در برگ *S. officinalis*، تا ۹/۲۰±۵۹/۰۳ میلی‌گرم برگرم وزن خشک در برگ *S. nemorosa*، متغیر بود. همچنین بیش‌ترین محتوای سالویانولیک اسید B (۳/۱۲±۱۰/۶۸ میلی‌گرم برگرم وزن خشک) در ریشه *S. nemorosa* برآورد شد. برگ *S. officinalis* و ریشه *S. nemorosa* به ترتیب با ۰/۷۷±۴/۵۵ و ۰/۱۰±۰/۶۷ میلی‌گرم برگرم وزن خشک، بیش‌ترین محتوای سالویانولیک اسید A را به خود اختصاص دادند. نتایج نشان داد که برگ‌ها نسبت به ریشه‌ها از اسیدهای فنلی غنی‌تر بودند و در بین آن‌ها سالویانولیک اسید B بیشترین مقدار را تشکیل می‌دهد؛ رزمارینیک اسید و سالویانولیک اسید A در مراتب بعدی قرار داشتند. نتایج این مطالعه نشان داد که *S. verticillata* و *S. nemorosa* با توان بالای تولید و ذخیره‌سازی اسیدهای فنلی می‌توانند به عنوان گونه‌های شاخص برای مصارف دارویی معرفی شوند.

واژه های کلیدی: اسیدهای فنلی، رزمارینیک اسید، سالویانولیک اسید A، سالویانولیک اسید B، مریم‌گلی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۵۱۲۱۲۲۴۴-۰۲۱، پست الکترونیکی: rajabian@shahed.ac.ir

مقدمه

مریم‌گلی (*Salvia* L.)، یکی از بزرگ‌ترین جنس‌های تیره نعناعیان (Lamiaceae)، شامل حدود ۹۰۰ گونه علفی، بوته‌ای، چند ساله، به ندرت یک ساله یا دو ساله می‌باشد، که اغلب به شدت معطرهستند و در مناطق گرم و معتدل جهان رشد می‌کنند (۶ و ۱۶). اعضای این جنس در منطقه مدیترانه، جنوب شرق آسیا و آمریکای مرکزی انتشار دارند (۱۹). ۵۸ گونه از این جنس درمناطق مختلف ایران یافت شده است که از این تعداد ۱۷ گونه بومی می‌باشند (۶،

۱۶و۲۰).

کلمه *Salvia* از واژه یونانی"Salvere" به معنی شفادهنده یا شفابخش مشتق شده است و به کاربردهای دارویی چندگانه گیاهان این تیره اشاره دارد (۶و۷). شهرت گونه-های مریم‌گلی به علت خواص دارویی آن‌ها می‌باشد و در طب سنتی برای درمان سرماخوردگی، جراحت‌ها و عفونت‌های پوستی، سردرد، کم‌خونی مغزی، اختلال حافظه و همچنین هپاتیت استفاده می‌شوند (۱۹). بسیاری از گونه‌های مریم‌گلی به عنوان چای گیاهی و طعم‌دهنده غذا، همچنین در صنایع آرایشی، عطر سازی و دارویی استفاده می‌شوند (۳).

ترپنوئیدها (دی و تری‌ترپنوئیدها) و فلاونوئیدها از اجزای اصلی متابولیت‌های ثانوی گونه‌های مریم‌گلی می‌باشند (۲و۱۵). اسیدهای فنلی و مشتقات آن‌ها درتمامی گونه‌ها وجود دارند و در فعالیت‌های زیستی متعددی شرکت می کنند (۲۴). کافئیک اسید در بیوشیمی تیره نعناعیان نقش محوری دارد و در گونه‌های مریم‌گلی، واحد سازنده انواع متابولیت‌های فنلی از مونومرهای ساده تا انواع فراورده‌های الیگومری می‌باشد. رزمارینیک اسید فراوان‌ترین دیمر کافئیک اسید و مهمترین ترکیب فنلی است که فعالیت پاد-اکسایشی گونه‌های مریم‌گلی را به طور عمده به علت وجود این ترکیب می‌دانند. شکل‌های تری‌مر و ترامر کافئیک اسید به علت داشتن خصوصیات منحصر به فرد زیستی از اهمیت دارویی قابل توجهی برخوردار هستند. تری‌مرهای مشتق شده از کافئیک اسید، بزرگترین گروه متابولیت‌های ثانوی را در مریم‌گلی تشکیل می‌دهند و سالویانولیک اسید A با خواص پاداکسایشی، پادتوموری و حفاظت ازغشاهای زیستی، در این گروه جای دارد. سالویانولیک اسید B که دیمری از رزمارینیک اسید و ترامری از کافئیک اسید می‌باشد، اغلب به صورت نمکهای آمونیوم، پتاسیم و منیزیم یافت می‌شود(۱۲و۱۴). این مشتقات کافئیک اسید فراوان‌ترین ترکیبات آب‌دوست گونه‌های مریم‌گلی هستند (شکل۱) که دارای فعالیت‌های زیستی متنوعی شامل: پاداکسایشی، پادپلاکتی، پادتوموری و پادویروسی می باشند (۱۵). مقدار تولید این ترکیبات در اندام‌های هوایی به طورگسترده‌ای به عوامل ژنتیکی و شرایط محیطی وابسته است (۲).

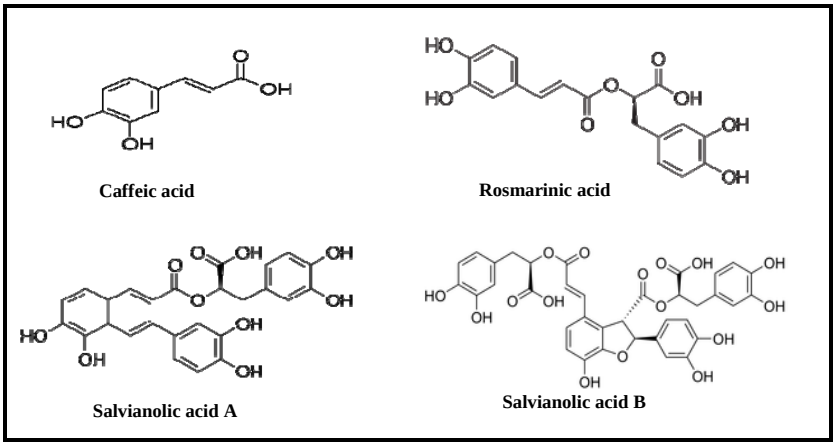
براساس اطلاعات موجود، به‌طورعمده مطالعات برروی محل سنتز و مسیرهای بیوسنتزی (مسیر شیکیمیک اسید و مسیر فنیل‌پروپانووئیدها) اسیدهای فنلی محدود به ریشه‌ها، برگ‌ها، ساقه‌ها و ریشه‌های مویین *S. miltiorrhiza* می باشند (۲۲). همچنین تعداد معدودی از گزارش‌ها نیز بر روی تولید رزمارینیک اسید در اندام‌های نوپدید (نوشاخه و نوریشه‌های باززایی شده)، کالوس و کشت‌های تعلیقی سلولی *S. officinalis* ارائه شده‌اند (۱۸). مسیر بیوسنتزی رزمارینیک اسید در گونه‌ای از حسن‌یوسف (*Coleus blumei*) از تیره نعناعیان مورد مطالعه قرارگرفته است و بررسی‌ها نیز نشان داده-اند که تمامی اندام‌ها در شرایط کشت *in vitro* توان سنتز و ذخیره این اسید فنلی را دارند و مقدار تولید آن می‌تواند تحت تاثیر عواملی چون گونه، مرحله نموی و سن، نوع اندام، رده سلولی و شرایط کشت تغییر نماید (۸).

با توجه به گزارش‌های موجود در مورد وجود ترکیبات دارویی ارزشمند و اهمیت و مصارف متعدد آن‌ها در پزشکی و صنایع غذایی، بهداشتی و آرایشی و با توجه به انتشار گسترده‌ی گونه‌های مریم‌گلی در ایران و محدود بودن اطلاعات در ارتباط با آن‌ها، هدف اصلی این پژوهش، شناسایی واندازه‌گیری برخی ترکیبات فنلی دارویی در تعدادی از گونه‌های خودروی مریم‌گلی ایران تعیین شد.

مواد و روشها

نمونه‌های گیاهی و آماده سازی آنها: نمونه‌های گیاهی از مناطق مختلف ایران و در زمان گلدهی کامل (تابستان ۱۳۹۱) جمع آوری و یک نمونه هرباریومی از هر گونه در هرباریوم مرکزی دانشگاه همدان (BASUH) نگهداری شد.

در جدول ۱ مشخصات مربوط به گونه‌های مورد مطالعه ذکر شده است. اندام‌های برگ و ریشه از نمونه‌های گیاهی جداسازی و در دمای اتاق خشک شدند، سپس تا زمان انجام آزمایش در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگهداری شدند.



شکل۱- ساختار شیمیایی کافئیک اسید و برخی مشتقات آن (۱۴).

استخراج ترکیبات فنلی از نمونه‌ها: نمونه‌های پودر شده برگ و ریشه (۱گرم) به طور مجزا در متانول (۲×۱۰ میلی-لیتر) برای مدت ۲۴ ساعت، در دمای اتاق و در تاریکی خیسانده شدند. سپس حلال هر یک از عصاره‌ها بعد از فیلتر شدن در شرایط خلاء و دردمای۴۰ درجه سانتی‌گراد تبخیر شد. عصاره‌های خشک شده تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگهداری شدند (۱۷).

جدول۱- نام، ویژگی‌های جغرافیایی محل جمع‌آوری و شماره هرباریومی گونه‌های مورد مطالعه مریم‌گلی ایران.

نام گونه	محل جمع آوری	مشخصات جغرافیایی	ارتفاع از سطح دریا (متر)	میانگین دمای سالیانه (درجه سانتی‌گراد)	میانگین بارش سالیانه (میلی‌متر)	میانگین رطوبت سالیانه (٪)	شماره هرباریومی
***S. officinalis* L.**	استان خراسان رضوی: مشهد، جاده سرخس، تنگلشور	N: ۳۶° ۱۴′ ۱۷/۹۳″ E: ۵۹° ۴۰′ ۲۵/۴۸″	۹۳۷/۵	۲۸	۲۵۰-۳۰۰	۵۰-۵۵	BASU۳۳۹۹۵
***S. sclarea* L.**	استان خراسان شمالی: رئین	N:۳۷° ۲۳′ ۱۱/۶۶″ E: ۵۷° ۲′ ۳۷/۳۲″	۱۸۸۹	۲۵	۳۰۰-۳۵۰	۶۰-۶۵	BASU۳۲۹۶۵
***S. verticillata* L.**	استان قزوین: الموت شرقی، بعداز روستای جولادک	N: ۳۶° ۲۲′۱۹″ E: ۵۰° ۳۲′۱۰″	۲۲۰۰	۲۴	۳۸۰-۴۰۰	۶۰-۶۵	BASU۳۳۹۹۶
***S. nemorosa* L.**	استان قزوین: شهرستان طارم، جنگل علی‌آباد	N: ۳۶° ۲۶′ ۱″ E: ۴۹° ۹′ ۵۳″	۱۹۴۰	۲۴	۲۸۰-۳۱۰	۶۰-۶۵	BASU۳۳۹۹۷

آماده‌سازی محلول‌های استاندارد: محلول‌های ذخیره نمونه‌های استاندارد رزمارینیک اسید (آلدریچ)، سالویانولیک اسید B و سالویانولیک اسید A (سیگما) در اتانول خالص تهیه و برای رسم منحنی استاندارد در محدوده‌ای از غلظت‌های مناسب رقیق شدند؛ سپس به دستگاه HPLC تزریق و سطح زیر منحنی قله جذبی هر نمونه در طول موج ۲۸۰ نانومتر تعیین گردید. منحنی استاندارد مربوط به هر اسید فنلی بر اساس غلظت محلول-های استاندارد و سطح زیر قله آن‌ها رسم و از معادله حاصل، برای سنجش مقدار اسیدهای فنلی در نمونه‌های

مورد مطالعه استفاده شد (مشخصات مربوط به منحنی‌های استاندارد اسیدهای فنلی مورد مطالعه در جدول ۲ نشان داده شده است).

جدول۲- مشخصات مربوط به منحنی‌های استاندارد تهیه شده برای سه اسید فنلی مورد مطالعه.

نام اسید فنلی	غلظت محلول ذخیره (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	محدوده غلظت مورد استفاده (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	معادله منحنی استاندارد	ضریب رگرسیون (r^2)
رزمارینیک اسید	۱	۰-۱۰۰	y = ۴۱۶۰۶x	۰/۹۹۶
سالویانولیک اسید B	۱	۰-۱۰۰۰	y = ۵۳۷/۵۸x	۰/۹۸۸
سالویانولیک اسید A	۰/۹	۰-۸۰	y = ۱۹۴۹۷x	۰/۹۹۶

تفکیک اجزای فنلی به روش HPLC: مقدار اسیدهای فنلی با روش HPLC سنجیده شد. بدین منظور از دستگاه HPLC مدل Smartline (Kenuer ، آلمان) مجهز به پمپ-های چهارگانه و ستون فاز معکوس Eurospher-100 C18 (۱۲۵mm ×۴ mm) با اندازه ذرات (۵µm) و یک آشکارساز UV-VIS(مدل D-14163) استفاده شد. داده‌ها با نرم افزار ChromGate (ویرایش ۳/۱) پردازش شدند. تمامی حلال-های مورد استفاده در این روش مخصوص HPLC بودند. برای شستشوی ستون از یک برنامه زمانی با شیب خطی استفاده شد. فاز متحرک شامل دو سیستم آب اسیدی شده با استیک اسید ۲٪ (حلال A) و استونیتریل(حلال B) بود. ابتدا شستشوی ستون با نسبت ۹۰:۱۰ (v/v) از دو حلال B: A آغاز شد، سپس این نسبت در دقیقه ۱۵ به صورت خطی به ۷۵:۲۵ (v/v) تغییر یافت. بعد از آن نسبت حلال A تا دقیقه ۴۰ به ۲۰٪ کاهش یافت و در دقیقه ۴۵ به صفر رسید. این نسبت تا دقیقه ۵۰ ثابت ماند و در ۵ دقیقه پایانی، حجم فاز متحرک A به طور خطی به ۹۰٪ افزایش یافت. آشکارسازی نمونه‌ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر و با جریان عبوری یک میلی‌لیتر بر دقیقه انجام شد و حجم هر تزریق ۲۰میکرولیتر (۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره) بود. هر نمونه با ۳ بار تکرار به دستگاه تزریق شد.

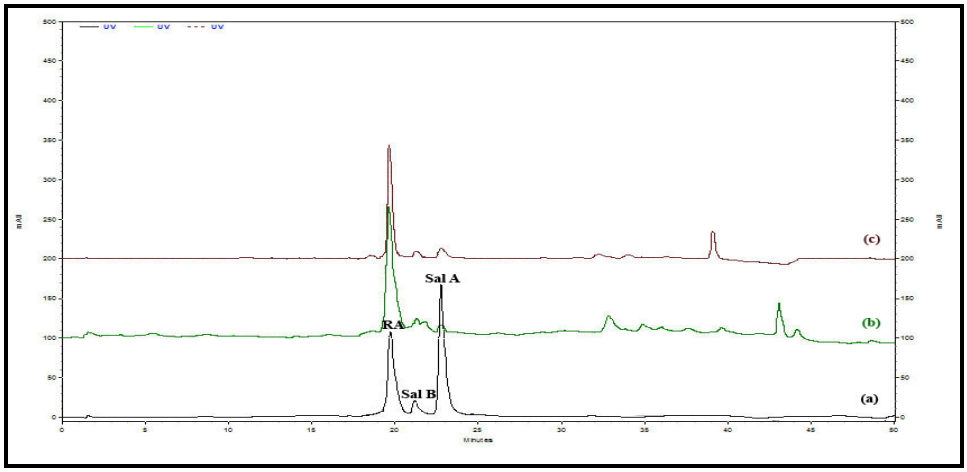
تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: برای تعیین معنی‌دار بودن تفاوت بین میانگین‌ها، ابتدا داده‌ها به کمک آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) توسط نرم افزار SPSS (ویرایش۱۷) تجزیه و تحلیل شدند؛ سپس میانگین‌ها با کمک آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه و گروه‌بندی و تفاوت بین آن‌ها در سطح$P<۰/۰۵$ تعیین شد. نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel رسم شدند.

نتایج

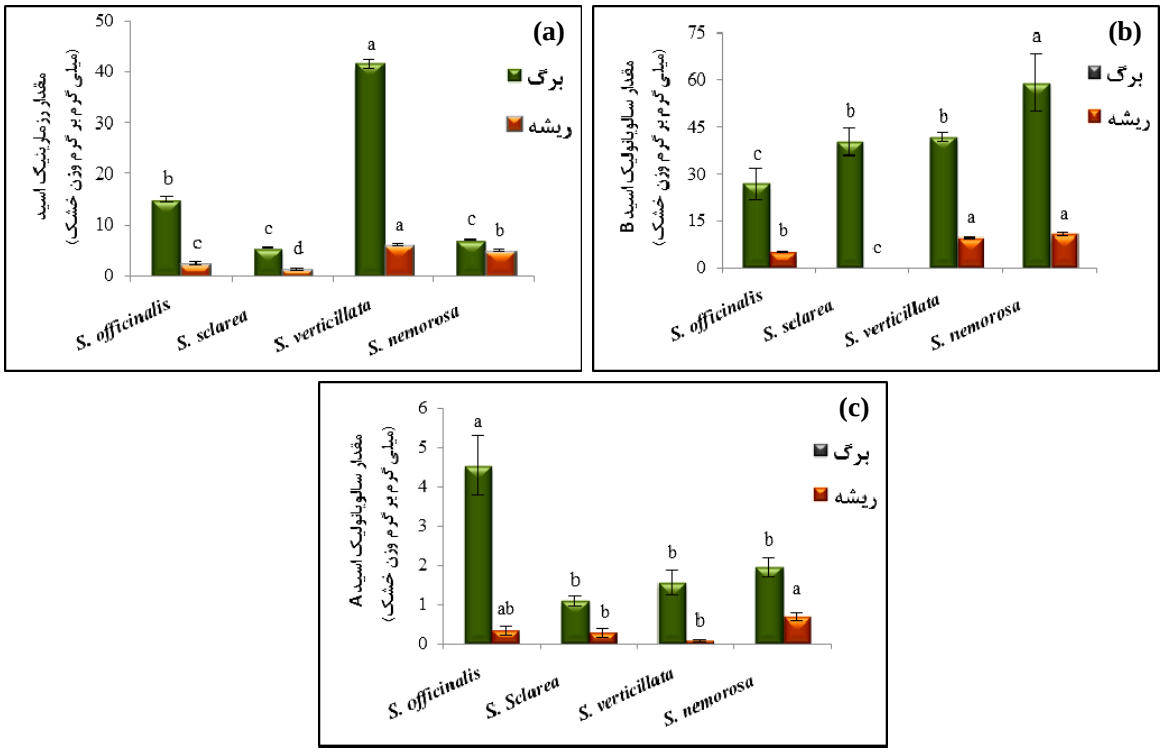
اسیدهای فنلی رزمارینیک اسید، سالویانولیک اسید A و سالویانولیک اسید B به روش HPLC در اندام‌های ریشه و برگ چهار گونه مریم‌گلی شناسایی و تعیین مقدار شدند. همان طور که در شکل ۲a نشان داده شده است، کروماتوگرام اسیدهای فنلی استاندارد، ۳ قله مشخص با زمان‌های بازداری ۱۹/۷۲، ۲۱/۱۸ و ۲۲/۷۵ دقیقه را آشکار ساختند که به ترتیب مربوط به رزمارینیک اسید، سالویانولیک اسید B و سالویانولیک اسید A بودند. همچنین آنالیز کیفی عصاره‌های اتانولی اندام‌های گونه‌های مورد مطالعه به روش HPLC حضور این ترکیبات فنلی را در آن‌ها تائید نمود. HPLC کروماتوگرام‌های عصاره اتانولی برگ *S. sclarea* و ریشه *S. nemorosa* به عنوان نمونه در شکل‌های ۲b و ۲c نشان داده شده‌اند (شکل۲).

نتایج حاصل از تعیین محتوای رزمارینیک اسید و سالویانولیک اسیدهای A و B، تفاوت معنی‌داری را در

محتوای این اسیدهای فنلی در دو اندام برگ و ریشه‌ی چهار گونه مریم‌گلی مورد مطالعه نشان داد (شکل ۳).



شکل۲- HPLC کروماتوگرام‌های محلول‌های اتانولی اسیدهای فنلی استاندارد(a)، عصاره اتانولی برگ *S. sclarea* (b) و عصاره اتانولی ریشه *S. nemorosa* (c)، رزمارینیک اسید (RA)، سالویانولیک اسید B (Sal B) و سالویانولیک اسید A (Sal A).



شکل۳- نمودار حاصل از مقایسه میانگین محتوای ۳ اسید فنلی رزمارینیک اسید (a)، سالویانولیک اسید B (b) و سالویانولیک اسید A (c) در برگ و ریشه چهار گونه مریم‌گلی مورد مطالعه. حروف غیرمشابه در مورد هر اندام نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح احتمال $P< ۰/۰۵$ می‌باشد.

بر طبق نتایج حاصل بیش‌ترین میزان رزمارینیک اسید به مقدار۰/۸۸±۴۱/۵۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک در برگ-های گونه *S. verticillata* برآورد شد و بعد از آن گونه *S. officinalis* با ۰/۳±۱۵/۰۲ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک قرار داشت. کمترین مقدار رزمارینیک اسید در برگ *S. sclarea* (۰/۱۲±۵/۴۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) بدست آمد که تفاوت معنی‌داری با مقدار بدست آمده برای این اسید فنلی در برگ *S. nemorosa* نداشت.

همچنین میانگین محتوای این اسید فنلی در ریشه گونه‌های مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری نشان داد، به طوری که ریشه‌های *S. verticillata* و *S. nemorosa* به ترتیب با ۰/۱۹±۵/۹۹ و۰/۱۴±۴/۹۲ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک، حاوی بیش‌ترین میزان رزمارینیک اسید بودند. هرچند، ریشه‌های *S. officinalis* (۰/۲۵±۲/۳۱ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) و *S. sclarea* (۰/۲۱±۱/۳۸ میلی‌گرم برگرم وزن خشک) حاوی مقادیر کمتری از این اسید فنلی بودند.

نتایج حاصل از بررسی مقدار سالویانولیک اسید B در دو اندام گونه‌های مریم‌گلی نشان داد که برگ‌ها نسبت به ریشه‌ها از این اسید فنلی غنی‌تر می‌باشند. مقدار این ترکیب فنلی از ۹/۲۰±۵۹/۰۳ میلی‌گرم برگرم وزن خشک در برگ *S. nemorosa* تا ۴/۹۵±۲۶/۸۹ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک در برگ *S. officinalis* متغیر بود. برگ گونه-های *S. sclarea* (۴/۴۷± ۴۰/۲۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) و *S. verticillata* (۱/۵۹±۴۱/۷۱ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) از نظر محتوای این اسید فنلی تفاوت معنی-داری را نشان ندادند (شکل ۳). بیش‌ترین مقدار سالویانولیک اسید B در ریشه *S. nemorosa* (۳/۱۲±۱۰/۶۸ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) سنجش شد که تفاوت معنی‌داری را با مقدار این اسید فنلی در ریشه *S. verticillata* (۲/۵۵±۹/۵۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) نشان نداد. این ترکیب در ریشه *S. sclarea* شناسایی نشد.

محتوای سالویانولیک اسید A نسبت به سایر ترکیبات فنلی در اندام‌های مورد مطالعه کمتر بود. در برگ‌ها، بیش‌ترین میزان این اسید فنلی در *S. officinalis* (۰/۷۷±۴/۵۵ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) گزارش شد اما بین میانگین های محتوای سالویانولیک اسید A برگ سایر گونه‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۳b).

بر اساس نتایج حاصل، به استثنای ریشه *S. nemorosa* که حاوی مقدار نسبتا قابل توجهی از سالویانولیک اسید A (۰/۱ ± ۰/۶۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) بود، محتوای این اسید فنلی در ریشه ۳ گونه دیگر اندک بوده و تفاوت معنی‌داری بین مقادیر برآورد شده، مشاهده نشد.

بحث

با توجه به اهمیت دارویی اسیدهای فنلی رزمارینیک اسید، سالویانولیک اسید A و سالویانولیک اسید B، در پژوهش حاضر مقدار این ترکیبات فنلی در ۳ گونه‌ی خودروی مریم‌گلی در مقایسه با گونه‌ی دارویی(*S. officinalis*) مورد مطالعه قرار گرفت. بر طبق نتایج حاصل از آنالیز نمونه‌ها به روش HPLC، حضور هر سه اسید فنلی در تمام نمونه‌های مورد مطالعه تائید شد و مقادیرآن‌ها در دو اندام برگ و ریشه در بین گونه‌های مختلف تفاوت معنی-داری را نشان داد. سالویانولیک اسید B با بیش‌ترین محتوا، فراوان‌ترین اسید فنلی را در نمونه‌های مورد مطالعه تشکیل می‌داد و رزمارینیک اسید و سالویانولیک اسید A به ترتیب در مراتب بعدی قرار داشتند. همچنین برگ‌ها نسبت به ریشه‌ها از نظر مقدار این اسیدهای فنلی غنی‌تر بودند.

براساس اطلاعات ما و مروری بر گزارش‌های موجود (۱، ۱۵، ۲۱ و ۲۵)، محتوای رزمارینیک اسید در اندام‌های هوایی و برگ‌ها در گونه مریم‌گلی دارویی با توجه به نوع عصاره تهیه شده و محل جمع‌آوری نمونه‌ها، بین ۵/۵ تا ۳۹/۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برآورد شده است. در پژوهش حاضر، مقدار رزمارینیک اسید در برگ این گونه

مریم‌گلی (۰/۵۳±۱۵/۰۲میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) با مقادیر گزارش شده در مطالعات فوق قابل مقایسه بود، اما محتوای این اسید فنلی در ریشه‌ها (۰/۲۵±۲/۳۱ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) تقریبا ۴ برابر کمتر از مقدار گزارش شده در ریشه *S. officinalis* (۰/۳۶±۸/۱۸ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) مورد مطالعه توسط Grzegorczyk و همکاران بود (۹). مقدار این اسید فنلی در ریشه این گونه دارویی در مطالعه حاضر قابل مقایسه با مقدار گزارش شده (۳/۳۵ میلی گرم بر گرم وزن خشک) در گزارش Min-Hui و همکاران می‌باشد (۱۵).

مقدار رزمارینیک اسید در برگ‌های جمعیت *S. sclarea* ایران در پژوهش حاضر، تقریبا ۷ برابر کمتر از مقدار گزارش شده برای این اسید فنلی در نمونه مورد مطالعه توسط Bandoniene وهمکاران (۱/۹±۴۱/۱ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) بود (۱). در حالی‌که محتوای رزمارینیک اسید برگ گونه فوق در پژوهش حاضر با مقدار گزارش شده (۳/۹۰ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) برای برگ نمونه‌ی کشت شده توسط Janicsák و همکاران (۱۱) در یک مزرعه آزمایشگاهی در مجارستان، به روش چگالی سنجی با کروماتوگرافی لایه نازک قابل مقایسه بود.

با توجه به نتایج مطالعه حاضر، محتوای رزمارینیک اسید در برگ‌های جمعیت *S. verticillata* جمع‌آوری شده از استان قزوین (۰/۸۸±۴۱/۵۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) تفاوت معنی‌داری را با مقادیر گزارش شده برای این اسید فنلی در دو زیرگونه‌ی *S. verticillata* رویش یافته در ترکیه (۰/۸۹±۲۸/۷ و ۱/۶۷±۲۴/۱ میکروگرم بر میلی‌گرم وزن خشک) نشان داد (۲۳).

بر طبق یافته‌های این پژوهش، محتوای رزمارینیک اسید در برگ *S. nemorosa* (۰/۱۳±۷/۰۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) تفاوت معنی‌داری را با محتوای این اسید فنلی (۲/۶۹ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در گزارش Coisin و همکاران (۴) بر روی جمعیتی از این گونه در رومانی نشان داد.

در مجموع بین گونه‌های مورد مطالعه در این پژوهش، *S. verticillata* با بیش‌ترین محتوای رزمارینیک اسید در برگ (۲/۵ تا ۸ برابر) و ریشه (بیش از دو برابر)، نسبت به سایر گونه‌ها تفاوت معنی‌داری را نشان داد.

تعداد گزارش‌های منتشر شده در مورد سالویانولیک اسیدها در گونه‌های مریم‌گلی اندک بوده و اغلب محدود به گونه‌ی *S. miltiorrhiza* می‌باشد. در پژوهشی که در سال ۲۰۰۸ توسط یک تیم تحقیقاتی چینی صورت گرفت، محتوای ۹ اسید فنلی درچند گونه مریم‌گلی موجود در چین سنجش شد (۱۵). بر خلاف نتایج این گروه که موید عدم حضور سالویانولیک اسیدها در *S. officinalis* بود، حضور این ترکیبات فنلی در برگ و ریشه این گونه مریم‌گلی در پژوهش پیش‌رو تائید شد. همچنین براساس نتایج محققان فوق، *S. bowleyana* غنی‌ترین گونه در بین گونه‌های مورد مطالعه از نظر محتوای سالویانولیک اسیدB (مقدار۸۲/۵۲ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک ریشه) معرفی شد. در حالی‌که در بین گونه‌های مورد مطالعه در این پژوهش شاخص‌ترین گونه از نظر محتوای این اسید فنلی، *S. nemorosa* (۹/۲۰±۵۹/۰۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برگ) بود. در فارماکوپه‌های دارویی چین (۲۰۰۵ و ۲۰۱۰)، محتوای سالویانولیک اسید B به عنوان نشانگر و شاخص برای تعیین کیفیت ریشه *S. miltiorrhiza* (Danshen) معرفی شده است و ریشه‌هایی که محتوای این اسید فنلی در آن‌ها کمتر از ۳٪ وزن خشک نباشد، برای مصارف دارویی مناسب می‌باشند(۵، ۱۰ و۱۳).

براساس نتایج Min-Hui و همکاران (۱۵) حضور سالویانولیک اسید A تنها محدود به ریشه *S. miltiorrhiza* بود، همچنین براساس مشاهدات این محققان اسیدهای فنلی به طور عمده در ریشه‌ی گونه‌های مریم‌گلی وجود داشتند. در صورتی که تمام گونه‌های

مریم‌گلی مورد مطالعه در پژوهش حاضر واجد سالویانولیک اسید A بودند و بیشترین مقدار آن در ریشه‌ی *S. nemorosa* (۰/۶۷±۰/۱ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) گزارش شد. بین محتوای سالویانولیک اسید A در برگ *S. officinalis* (۳ تا ۴ برابر بیشتر) و ریشه *S. nemorosa* (تقریبا ۲ تا ۹ برابر بیشتر) با مقادیر این اسید فنلی در سایر گونه‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده شد. علاوه براین، برگ گونه‌های مریم‌گلی ایرانی نسبت به ریشه‌ها از نظر محتوای اسیدهای فنلی غنی‌تر بودند.

همچنین ارتباط بین عوامل محیطی (ارتفاع از سطح دریا، میانگین دما، بارش و رطوبت سالیانه) مناطق جمع‌آوری گونه‌های مریم‌گلی و محتوای سه اسید فنلی در ریشه و برگ آنها مورد مطالعه قرار گرفت و همبستگی معنی‌داری بین تغییرات در محتوای آن‌ها و این عوامل مشاهده نشد. لذا به نظر می‌رسد که تفاوت‌های مشاهده شده بین میانگین محتوای اسیدهای فنلی در این پژوهش بیشتر ناشی از تفاوت‌های ژنتیکی بین گونه‌های مورد مطالعه باشند.

نتیجه‌گیری

در پژوهش انجام شده حضورسالویانولیک اسیدهای A و Bو رزمارینیک اسید برای اولین بار در تعدادی از گونه‌های مریم‌گلی خودروی ایران تایید و مقادیر آن‌ها مورد سنجش قرار گرفت. نتایج نشان داد که برگ‌ها نسبت به ریشه‌ها از این ترکیبات غنی‌تر بودند و در بین این سه اسید فنلی، سالویانولیک اسید B بیشترین مقدار را تشکیل می‌داد و رزمارینیک اسید و سالویانولیک اسید A در مراتب بعدی قرار می‌گرفتند. با توجه به نتایج بدست آمده به نظر می رسد که محل اصلی سنتز و ذخیره سازی این اسیدهای فنلی در برگ‌ها باشد، چراکه برگ گونه‌های مورد مطالعه نسبت به اندام ریشه حاوی اسیدهای فنلی بیش‌تری بودند. اما برای اظهار نظر قطعی در این زمینه، نیاز به تحقیقات و مطالعات بیش‌تری می‌باشد. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که علاوه بر گونه دارویی *S. officinalis*، گونه‌های خودرویی چون *S. verticillata* و *S. nemorosa*، با توان بالای تولید و ذخیره‌سازی اسیدهای فنلی رزمارینیک اسید و سالویانولیک اسیدهای A و B می‌توانند به عنوان گونه-های شاخص که قابلیت اهلی شدن در مقیاس صنعتی و مصارف دارویی را دارند، معرفی شوند.

درمجموع طبق نتایج حاصل از این پژوهش و با توجه به تعداد، تنوع و انتشار جمعیت‌های مختلف گونه‌های خودروی مریم‌گلی در ایران، انجام تحقیقات بیش‌تر در زمینه‌های فیتوشیمی، بیوشیمی، فیزیولوژی، ژنتیک و مولکولی به منظور افزایش محتوای متابولیت‌های دارویی و اهلی کردن این گیاهان، پیشنهاد می‌شود. همچنین، از آنجایی که کمیت و کیفیت متابولیت‌های ثانوی از جمله ترکیبات فنلی در گیاهان می‌تواند تحت تاثیر عوامل درونی و محیطی از جمله ژنتیک، شرایط آب و هوایی و جغرافیایی زیستگاه قرار گیرد، بررسی جمعیت‌های مختلف گونه‌های مریم‌گلی در مناطق مختلف به منظور دست یافتن به بهترین منابع طبیعی این ترکیبات، امری ضروری به نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

نگارندگان این مقاله لازم می دانند تا مراتب قدردانی و سپاس خود را از کلیه مسئولین و همکاران محترم در دانشکده علوم پایه دانشگاه شاهد به جهت مساعدت و فراهم آوردن امکانات لازم برای انجام این پژوهش، اعلام دارند.

منابع

1- Bandoniene, D., Murkovic, M. and Venskutonis, P. R., 2005, Determination of rosmarinic acid in sage and borage leaves by high-performance liquid chromatography with different detection methods. Journal of Chromatographic Science, 43(7): 372-376.

2- Başkan, S., Öztekin, N. and Erim, F. B., 2007, Determination of carnosic acid and rosmarinic

acid in sage by capillary electrophoresis. Food Chemistry, 101: 1748-1752.

3- Bettaieb, I., Zakhama, N., Aidi Wannes, W., Kchouk, M.E. and Marzouk, B., 2009, Water deficit effects on *Salvia officinalis* fatty acids and essential oils composition. Scientia Horticulturae, 120: 271-275.

4- Coisin, M., Necula, R., Grigoraş, V., Gille, E., Rosenhech, E., and Magdalena Zamfirache, M., 2012, Phytochemical evaluation of some *Salvia* species from Romanian flora. Scientific Annals of Alexandru Ioan Cuza University of Iasi. New Series, Section 2. Vegetal Biology, 58(1):35-44.

5- Dong, J., Wan, G., and Liang, Z., 2010, Accumulation of salicylic acid-induced phenolic compounds and raised activities of secondary metabolic and antioxidative enzymes in *Salvia miltiorrhiza* cell culture. Journal of Biotechnology, 148: 99-104.

6- Ebrahimabadi, A. H., Mazoochi, A., JookarKashi, F., Djafari-Bidgoli, Z. and Batooli H., 2010, Essential oil composition and antioxidant and antimicrobial properties of the aerial parts of *Salvia eremophila* Boiss. from Iran. Food and Chemical Toxicology, 48:1371-1376.

7- Gören, A.C., Kilic, T., Dirmenci, T. and Bilsel, G., 2006, Chemotaxonomic evaluation of Turkish species of *Salvia*: Fatty acid compositions of seed oils. Biochemical Systematics and Ecology, 34:160-164.

8- Grzegorczyk, I., Bilichowski, I., Mikiciuk-Olasik, E. and Wysokińska, H., 2005, *In vitro* cultures of *Salvia officinalis* L. as a source of antioxidant compounds. Acta Societatis Botanicorum Poloniae, 74(1): 17-21.

9- Grzegorczyk, I., Matkowski, A. and H., Wysokińska, 2007, Antioxidant activity of extracts from *in vitro* cultures of *Salvia officinalis* L. Food Chemistry, 104: 536-541.

10- He, C-E., Wei, J., Jin, Y., and Chen, S., 2010, Bioactive components of the roots of *Salvia miltiorrhiza*: Changes related to harvest time and germplasm line. Industrial Crops and Products, 32: 313-317.

11- Janicsák, G., Máthá, I., Miklóssy-Vári V. and Blunden, G., 1999, Comparative studies of the rosmarinic and caffeic acid contents of Lamiaceae species. Biochemical Systematics and Ecology, 27: 733-738.

12- Kamatou, G. P. P., Makunga, N. P., Ramogola, W. P. N. and Viljoen, A. M., 2008, South African *Salvia* species: A review of biological activities and phytochemistry. Journal of Ethnopharmacology, 119: 664-672.

13- Li, X-B., Wang, W., Zhou, G-J., Li, Y., Xie, X-M., and Zhou, T-S., 2012, Production of salvianolic acid B in roots of *Salvia miltiorrhiza* (Danshen) during the post-harvest drying process. Molecules, 17: 2388-2407.

14- Lu, Y. and Foo, L.Y., 2002, Polyphenolics of *Salvia*-a review. Phytochemistry, 59: 117–140.

15- Min-Hui, L., Jian-Min, C., Yong, P. and Pei-Gen, X., 2008, Distribution of phenolic acids in Chinese *Salvia* plants. World Science and Technology, 10(5): 46-52.

16- Mozaffarian, V., 1996, Dictionary of Iranian plant names. Farhang Moaser, Tehran, p. 477.

17. Öztürk, M., Duru, M.E., Ince, B., Harmandar, M. and Topçu, G., 2010, A new rapid spectrophotometric method to determine the rosmarinic acid level in plant extracts. Food Chemistry, 123:1352-1356.

18- Petersen, M., 2013, Rosmarinic acid: New aspects. Phytochemistry Reviews, 12:207-227.

19- Rauter, A. P., Dias, C., Martins, A., Branco, I., Neng, N. R., Nogueira, J. M., Goulart, M., Silva, F. V. M., Justino, J., Trevitt, C. and Waltho, J. P., 2012, Non-toxic *Salvia sclareoides* Brot. extracts as a source of functional food ingredients: Phenolic profile, antioxidant activity and prion binding properties. Food Chemistry, 132: 1930-1935.

20- Sepehry Javan, Z., Rahmani, F. and Heidari, R., 2012, Assessment of genetic variation of genus *Salvia* by RAPD and ISSR markers. Australian Journal of Crop Science, 6(6): 1068-1073.

21- Shekarchi, M., Hajimehdipoor, H., Saeidnia, S., Gohari, A. R. and Hamedani, M. P., 2012, Comparative study of rosmarinic acid content in some plants of Labiate family. Pharmacognosy Magazine, 8(29): 37-41.

22- Zhao S.J, Zhang J.J, Yang L, Wang Z.T and Hu Z.B., 2011, Determination and biosynthesis of multiple salvianolic acids in hairy roots of *Salvia miltiorrhiza*. Acta Pharmaceutica Sinica, 46 (11): 1352-1356.

23- Tepe, B., Eminagaoglu, O., Akpulat, H. A. and Aydin, E., 2007, Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia verticillata* (L.) subsp. *verticillata* and *S. verticillata* (L.) subsp. *amasiaca* (Freyn & Bornm.) Bornm. Food Chemistry, 100: 985-989.

24- Wang, D., Song, Y., Chen, Y., Yao, W., Li, Z., Liu, W., Yue, S. and Wang, Z., 2013, Metabolic

pools of phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* are enhanced by co-expression of *Antirrhinum majus Delila* and *Rosea1* transcription factors. Biochemical Engineering Journal, 74:115-120.

25- Wang, H., Provan, G. J., and Helliwell, K., 2004, Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC. Food Chemistry, 87: 307-311.

Comparative Analysis of Rosmarinic Acid and Salvianolic Acids A and B Contents in Four Wild Growing *Salvia* Species from Iran

Fotovvat M.[1], Radjabian T.[1], Saboora A.[2], Ranjbar M.[3] and Sadat Ejtahed R.S.[4]

[1] Biology Dept., Faculty of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, I.R. of Iran

[2] Plant Sciences Dept., Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, I.R. of Iran

[3] Biology Dept., Herbarium Division, Bu-Ali Sina University, Hamedan, I.R. of Iran

[4] Biotechnology Dept., Faculty of Chemistry, University of Kashan, Kashan, I.R. of Iran

Abstract

Salvia L. with about 58 species is a large genus of Lamiaceae in Iran. Essential oils, terpenoids, derivatives of phenolic acids and flavonoids are the main secondary metabolite constituents in *Salvia* species. Pharmaceutical properties of the *Salvia* plants are mainly due to antioxidant activities of their metabolites. In this project, for the first time some phenolic compounds (rosmarinic acid, salvianolic acids A and B) in the leaves and roots of four wild *Salvia* species from Iran were isolated and measured by HPLC method. Based on our results, leaves and roots of *S. verticillata* were the richest sources of rosmarinic acid (41.53±0.88 and 5.99±0.19 mg/g DW, respectively). Salvianolic acid B varied from 26.89±4.95 mg/g DW in the leaves of *S. officinalis* to 59.03±9.20 mg/g DW in the leaves of *S. nemorosa*. Also, the highest content (10.68±3.12 mg/g DW) of this phenolic compound was determined in the roots of *S. nemorosa.* The leaves of *S. officinalis* and the roots of *S. nemorosa* with values of 4.55±0.77 and 0.67±0.1 mg/g DW presented the highest contents of salvianolic acid A. The results showed that the leaves were rich in phenolic acids and among them, salvianolic acid B was the most abundant constituent and rosmarinic acid and salvianolic acid A were in the next place. In conclusion, our results suggested that some Iranian wild species such as *S. verticillata* and *S. nemorosa* with high capacity of production and storage of phenolic acids can be introduced as potent natural sources for medicinal purposes.

Key words: Phenolic acids, Rosmarinic acid, *Salvia* L., Salvianolic acid A, Salvianolic acid B