مقایسه روش‌های میکرو استخراج فاز جامد فضای فوقانی (HS-SPME) و تقطیر آب (HD) برای تعیین اسانس موجود در گیاه لاله واژگون (*Fritillaria imperialis*)

شهرزاد سادات سید صالح[1]، سیمین عربی[2]*، فاطمه عشوری[1]

۱- گروه شیمی و فناوری اسانس، دانشکده شیمی دارویی، واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲- گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد صفادشت، تهران، ایران
* آدرس مکاتبه: تهران، صفادشت، میدان نبی اکرم (ص)، بلوار الغدیر، دانشگاه آزاد اسلامی واحد صفادشت
تلفن و نمابر: ۶۵۴۳۵۵۱۶ (۰۲۱)
پست الکترونیک: siminarabi1354@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۶/۷/۱۵ **تاریخ تصویب:** ۹۶/۱۰/۱۸

چکیده

مقدمه: لاله واژگون (*Fritillaria imperialis*) گیاهی در معرض انقراض است که حاوی آلکالوییدهای دارویی است که در کاهش فشار خون و کاهش تپش قلب مؤثر است.

هدف: مقایسه روش‌های میکرو استخراج فاز جامد فضای فوقانی (HS-SPME) و تقطیر آب (HD) بر ترکیبات شیمیایی اسانس گیاه لاله واژگون (*Fritillaria imperialis*).

روش بررسی: بررسی کیفی و کمّی ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس‌های استخراج شده از بخش‌های هوایی گیاه لاله واژگون (*Fritillaria imperialis*) به روش‌های میکرو استخراج فاز جامد فضای فوقانی و تقطیر آب با استفاده از کروماتوگرافی گازی- طیف‌سنجی جرمی (GC-MS).

نتایج: ۲۴ ترکیب با تکنیک تقطیر با آب در اسانس شناسایی شد که ۸۶/۶۱٪ اسانس این گیاه را تشکیل می‌دادند و مهم‌ترین آنها شامل آلفا- بیزابولول اکسید A (۲۸/۲٪)، کامفور (۱۲/۸۶٪)، کامازولن (۱۱/۸٪)، ترانس-توجون (۱۰/۹٪)، آلفا- بیزابولون اکسید A (۱۰/۳٪)، دلتا-۳-کارن (۶/۹٪) و آلفا-پینن (۵/۶۵٪) بودند. ۲۱ ترکیب با تکنیک HS-SPME، در اسانس شناسایی شد که ۹۴/۹۳٪ اسانس را تشکیل می‌دادند و عمده‌ترین آنها شامل آلفا- بیزابولول اکسید A (۳۵/۲٪)، کامفور(۹/۵۴٪)، کامازولن (۱۸/۳٪)، ترانس- توجون (۷/۸۹٪)، آلفا- بیزابولون اکسید A (۱۱/۸٪)، دلتا-۳-کارن (۶/۵٪) و آلفا-پینن (۵/۷٪) بودند.

نتیجه‌گیری: در هر دو روش، عمده‌ترین ترکیبات شناسایی شده سزکوئی‌ترپن‌های اکسیژن‌دار بودند، در حالی‌که اثری از سزکوئی ترپن‌های هیدروکربنی مشاهده نشد.

گل‌واژگان: لاله واژگون (*Fritillaria imperialis*)، تقطیر با آب، کروماتوگرافی گازی- طیف‌سنج جرمی، میکرو استخراج با فاز جامد فضای فوقانی (HS-SPME)

www.SID.ir

مقدمه

لاله واژگون با نام علمی *Fritillaria imperialis* گیاهی است از خانواده Liliaceae و به دلیل قطرات شهد که در پایه گلبرگ‌های آن جمع می‌شود به اشک مریم معروف می‌باشد. این گیاه یکی از زیباترین گیاهان منطقه زاگرس است که در ارتفاعات ۲۰۰۰ متری از سطح دریا رشد می‌کند. لاله‌ی واژگون گیاهی چندساله و دارای پیاز است که پتانسیل بالایی جهت استفاده به عنوان گیاه زینتی و دارویی دارا می‌باشد و هر ساله مشتاقان را در سراسر دنیا به سمت خود جذب می‌کند [۱]. چندین گونه این جنس بومی قبرس و ترکیه است و ۱۴ گونه، بومی ایران می‌باشد. در ایران جمعیت‌های وحشی لاله‌ی واژگون به دلیل عدم وجود قوانین حفاظتی مناسب، چرای دام، و مبارزه با آفات در معرض شدید خطر نابودی و انقراض قرار گرفته است. بیش از ۲۰۰۰ سال است که لاله واژگون به عنوان یک داروی خلط‌آور و ضدسرفه در طب سنتی چین مورد استفاده قرار می‌گیرد [۳، ۲]. این گل برای مهار تجمع پلاکت خون و درمان بیماری‌هایی همچون گلودرد، سرفه، آسم، برونشیت، سل، غدد لنفاوی گردن، غدد تومور و سوزش ادرار نیز مفید است. پیاز این گیاه به علت وجود موادی با نام آلکالوئیدهای ایمپریسین و فرتیسین به عنوان مسکن درد نیز شناخته می‌شود. از جمله ترکیبات شیمیایی که در این گل وجود دارند می‌توان به آلکالوئیدها، ساپونین‌ها، ترپنوئیدها، استروئیدها، اسید سوکسنیک، تیمیدین و آدنوزین اشاره نمود [۵، ۴]. روش مناسب استخراج اسانس از گیاهان با توجه به گونه، اندام گیاه، نوع ماده مؤثر (آلکالوییید، فلاونوئید، ترپن‌ها، قندها) و درنهایت درجه خلوص محصول نهایی انتخاب می می‌شود. متداول‌ترین روش استخراج اسانس گیاهان، تقطیر مستقیم بافت‌های گیاه، با آب یا بخار آب است. با توجه به دمای بالا و طولانی مدت بودن زمان حرارت‌دهی جهت دستیابی به دمای لازم به منظور تبخیر ترکیبات فرّار، بسیاری از ترکیبات از جمله آلکالوئیدها، ترپنوئیدها، استرها و ترکیبات غیراشباع از دست می‌روند و ضمناً انرژی و زمان زیادی تلف می‌شود [۶]. همچنین با توجه به آلودگی‌های زیست محیطی ناشی از حضور باقیمانده حلال در روش‌های استخراج مبتنی بر استفاده از حلال، ابداع روش‌های نوین و راهکارهای جدید دوستدار محیط زیست جهت استخراج اسانس گیاهان امری ضروری است. از جمله این روش‌ها، می‌توان به روش میکرو استخراج فاز جامد فضای فوقانی (Head Space- Solid Phase Micro-Extraction (HS-SPME)) اشاره کرد که جهت استخراج و تجزیه‌ی مواد فرّار در نمونه‌های بیولوژیکی و مواد غذایی با استفاده از کروماتوگرافی به کار می‌رود [۷]. میکرو استخراج فاز جامد یک روش استخراج است که اولین بار توسط پاولیزین (Powliszyn) و همکارانش ارائه شد و بسیاری از مشکلات موجود در زمینه تهیه نمونه را برطرف نمود. در روش SPME استخراج و تغلیظ نمونه به طور همزمان صورت گرفته، عاری از حلال بوده و برای آنالیز توسط آن، مقدار کمی از نمونه کفایت می‌کند [۸]. در این تکنیک، استخراج فرآیندی است که در آن اجزاء نمونه بین فاز آبی یا فضای فوقانی آن و یک فاز ساکن (پوشش روی فیبر گنجانده شده در یک سرنگ) تا رسیدن به حالت تعادل، تقسیم می‌شود. بعد از نمونه‌برداری، فیبر به داخل سرنگ کشیده شده و سپس به دستگاه تجزیه‌ای منتقل می‌شود. سپس، واجذبی آنالیت‌ها با وارد کردن فیبر در داخل محفظه تزریق یک دستگاه کروماتوگراف گازی برای مدتی معین، صورت می‌گیرد [۹].

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه گیاهی

گیاه لاله واژگون (*Fritillaria imperialis*) در فروردین ماه ۱۳۹۶ از منطقه لرستان (ارتفاعات اشترانکوه) جمع‌آوری شد و در هرباریوم مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور در تهران شناسایی شد (شماره سند ۸۹۶۳۱). نمونه گیاهی پس از انتقال به آزمایشگاه، در سایه و به دور از نور مستقیم خورشید خشک شد. سپس بخش‌های هوایی خشک شده گیاه با آسیاب برقی خُرد و جهت استحصال اجزاء فرّار مورد استفاده قرار گرفت.

Archive of SID
www.SID.ir

استخراج اسانس به روش تقطیر با آب

مقدار ۱۰۰ گرم از اندام هوایی گیاه خشک شده، خُرد و در دستگاه کلونجر به مدت ۳/۵ ساعت اسانس‌گیری شد. عمل آبگیری از روغن‌های اسانسی حاصل، بوسیله سدیم سولفات بدون آب (Na_2SO_4) صورت پذیرفت. اسانس به دست آمده تا هنگام آنالیز درون ظرف سربسته تاریک و در یخچال نگهداری شد.

استخراج اسانس به روش میکرواستخراج فاز جامد فضای فوقانی (HS-SPME)

استخراج اسانس به روش میکرو استخراج فاز جامد فضای فوقانی با استفاده از حداقل وزن نمونه جامد خرد شده (۰/۵ گرم) و بدون استفاده از هر گونه حلال آلی انجام شد. در این تکنیک مقدار ۰/۵ گرم گیاه خشک در ویالی قرار داده شد و دمای ویال بین ۶۰ تا ۷۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد (شرایط دمایی در حالت بهینه قرار می‌گیرد تا بخارات موجود در اسانس گیاه در فضای بالای سطح جامد به حالت اشباع در آیند). فیبر مورد استفاده از جنس پلی متیل سیلوکسان به ضخامت ۱۰۰ میکرومتر به همراه مجموعه کامل SPME تهیه شد. سپس فیبر ریز استخراج فاز جامد، از طریق سوراخ کردن سپتوم، وارد فضای فوقانی ظرف حاوی نمونه شد. پس از اتمام استخراج، با انتقال فیبر به داخل سرنگ SPME، نمونه از داخل ظرف نگهدارنده خارج شد و ترکیبات جذب شده روی فیبر از طریق واجذب حرارتی، بلافاصله به دستگاه GC-MS تزریق شده تا جداسازی و شناسایی ترکیبات صورت پذیرد [۱۰].

جداسازی و شناسایی اجزا

برای تفکیک و شناسایی مواد موجود در اسانس این گیاه، از دستگاه کروماتوگرافی گازی و کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی استفاده شد. شناسایی اجزای اسانس با استفاده از بانک اطلاعاتی جرمی، زمان بازداری و اندیس بازداری کواتس مندرج در منابع علمی، مطالعه طیف‌های جرمی هر یک از اجزای اسانس و مقایسه آنها با طیف‌های مرجع انجام شد [۱۱]. همچنین، بررسی‌های تکمیلی با تطبیق الگوهای شکافتگی طیف‌های جرمی و اندیس‌های کواتس مبتنی بر تجربیات قبلی صورت گرفت [۱۲]. به منظور شناسایی طیف‌ها و محاسبه اندیس بازداری آنها، مخلوطی از آلکان‌های خطی از (C_8 -C_{20}) با غلظت ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر در نرمال هگزان در شرایط مشابه دستگاهی به سیستم تزریق شدند و اندیس کواتس هر ترکیب محاسبه شد. درصد نسبی ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس با توجه به سطح زیر پیک آن در کروماتوگرام GC به روش نرمال کردن سطح و نادیده گرفتن ضرایب محاسبه شد.

مشخصات و برنامه حرارتی دستگاه‌های کروماتوگرافی گازی و کروماتوگرافی گازی- طیف‌سنج جرمی

جهت بررسی کمی و کیفی ساختار اسانس‌ها و مراحل بهینه‌سازی روش استخراج پیشنهادی، کروماتوگرافی گازی مدل HP-6890 با طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۲۵۰ میکرومتر و ضخامت لایه داخلی ۰/۲۵ میکرومتر استفاده شد. برنامه حرارتی به کار رفته، شامل خیز تدریجی دمایی ۵۰ تا ۲۶۰ درجه با روند افزایش ۵ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه و نگهداری ستون در ۲۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه صورت پذیرفت. دمای اتاقک تزریق ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد، دمای رابط ۲۶۰ درجه سانتی‌گراد و گاز حامل هلیوم با سرعت یک میلی‌لیتر در دقیقه در طول فاز ساکن جریان داشت. شرایط کروماتوگرافی در GC-MS مشابه شرایط کروماتوگرافی گازی بود. در عین حال، به عنوان آشکارساز از آشکارساز جرمی مدل HP-5973 شامل تجزیه‌گر جرمی از نوع چهارقطبی (کوادرپول) مجهز به یک منبع یون ساز برخورد الکترون (EI) با انرژی یونش ۷۰ الکترون ولت و دمای ۲۳۰ درجه سانتی‌گراد استفاده شد.

نتایج

در این تحقیق اسانس گیاه لاله واژگون *Fritillaria imperialis*، از نظر اجزا و ترکیب درصد آنها و همچنین ساختار هر جزء مورد بررسی قرار گرفتند. در این تجزیه اسانس بخش هوایی گیاه بوسیله تکنیک‌های تقطیر با آب

Archive of SID
www.SID.ir

(HD) و میکرو استخراج فاز جامد فضای فوقانی (HS-SPME) به دست آمد و نتایج حاصل از روش‌های فوق مورد مقایسه و بررسی قرار گرفت. در اسانس‌گیری از اندام هوایی گیاه *Fritillaria imperialis*، به روش تقطیر با آب و میکرو استخراج فاز جامد فضای فوقانی به ترتیب ۲۴ و ۲۱ ترکیب برای نمونه گیاهی که در مجموع ۹۳/۱٪ و ۹۹/۳٪ از کل ترکیبات اسانس را تشکیل می‌دادند، شناسایی شدند.

تجزیه شیمیایی اسانس حاصل از تکنیک تقطیر با آب

جهت استخراج اسانس از روش تقطیر با آب و دستگاه کلونجر استفاده شد. بدین‌ترتیب که مقدار ۱۰۰ گرم از اندام هوایی گیاه خشک شده، خُرد و در دستگاه کلونجر به مدت ۳/۵ ساعت اسانس‌گیری شد. اسانس حاصل به علت فرّار بود، همراه بخار آب تقطیر و در لوله جمع‌آوری کننده کلونجر جمع جمع‌آوری شد. با توجه به اینکه چگالی اسانس کمتر از چگالی آب است، بنابراین اسانس استخراج شده روی فاز آبی قرار گرفته و به راحتی توسط شیر تخلیه جداسازی شد. از آنجایی که اسانس‌ها نسبت به نور، اکسیژن و دما حساس می‌باشند و دچار تغییر و تحول می‌شوند، لذا بلافاصله اسانس استخراج شده به یک شیشه تیره و دربسته منتقل و تا زمان تزریق در یخچال نگهداری شد. شناسایی ترکیبات سازنده با اسانس با استفاده از کروماتوگراف GC-MS (مدل TRACE MS) با ستون HP-5MS به طول ۶۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر کوپل شده با طیف‌سنج جرمی انجام شد. دمای اولیه ستون ۶۰ درجه سانتی‌گراد که به مدت ۲ دقیقه در این دما ماند و سپس با سرعت ۳ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه به دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد رسید و ۲ دقیقه در این دما ماند، سپس با سرعت ۵ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه به دمای ۲۱۰ درجه سانتی‌گراد رسیده و ۱ دقیقه در این دما مانده و در ادامه با سرعت ۱۰ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه به دمای ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد رسید. گاز حامل هلیوم بود که با سرعت ml/min ۱ جریان داشت. ولتاژ یونیزاسیون دستگاه طیف‌سنج جرمی ev ۷۰ بود. نوع و میزان هر یک از ترکیبات سازنده اسانس پس از تجزیه و تحلیل کروماتوگرام گازی مشخص شد و نتایج حاصل در جدول شماره ۱ ارائه شد. همچنین کروماتوگرام GC-MS ترکیبات اسانس گیاه *F. imperialis* به روش تقطیر با آب در شکل شماره ۱ نشان داده شده است. در این نمودار ستون افقی زمان بازداری (Retention time) و ستون عمودی فراوانی آن را نشان می‌دهد.

در تجزیه شیمیایی اسانس حاصل از اندام هوایی گیاه *F. imperialis* با تکنیک تقطیر با آب، ۲۴ ترکیب شناسایی شد که عمده‌ترین آنها در جدول شماره ۱ آمده است و در کل ۸۶/۶۱ ٪ اسانس به دست آمده از اندام هوایی گیاه را تشکیل می‌دهند. حدود ۵۳/۸۲٪ از ترکیبات شناسایی شده را مونوترپن مونوترپن‌ها تشکیل می‌دهند که از این میزان، ۲۶/۲۷٪ شامل مونوترپن‌های اکسیژن‌دار و ۲۷/۵۵٪ مونوترپن‌های هیدروکربنی می‌باشد. در حالی‌که تنها ۳۹/۲۸٪ را سزکوئی‌ترپن‌ها شامل می می‌شوند که محتوی سزکوئی‌ترپن‌های اکسیژن‌دار می‌باشند (جدول شماره ۲).

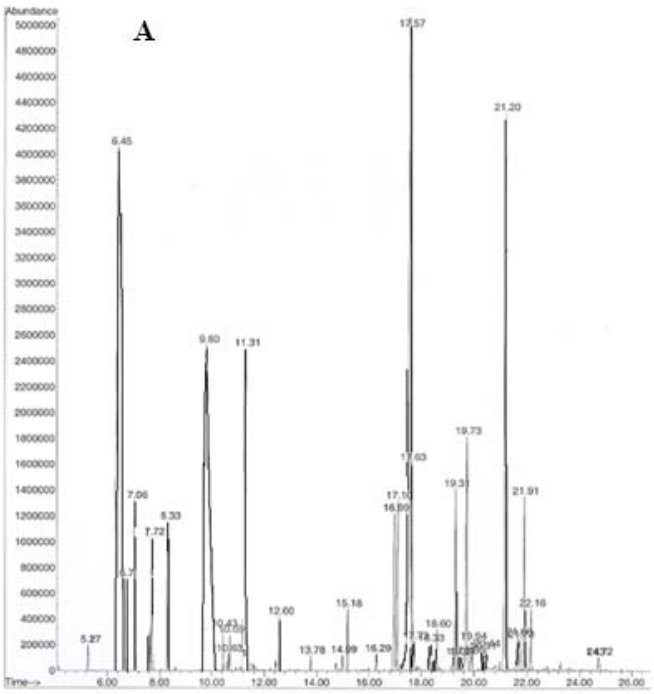
جدول شماره ۱- ترکیبات شناسایی شده در اسانس گیاه *F. imperialis* به روش تقطیر با آب (HD)

ردیف	ترکیبات	شاخص بازداری	درصد اجزا
۱	n-Nonane	۸۹۹	۰/۱۶
۲	α-Thujene	۹۳۱	۰/۲۸
۳	α-Pinene	۹۳۹	۵/۶۵
۴	Camphene	۹۴۷	۰/۵۶
۵	Sabinene	۹۷۳	۰/۷
۶	β-Pinene	۹۸۰	۰/۴۱
۷	δ-3-Carene	۱۰۰۹	۶/۹
۸	α -Terpinene	۱۰۱۸	۰/۲

Archive of SID
www.SID.ir

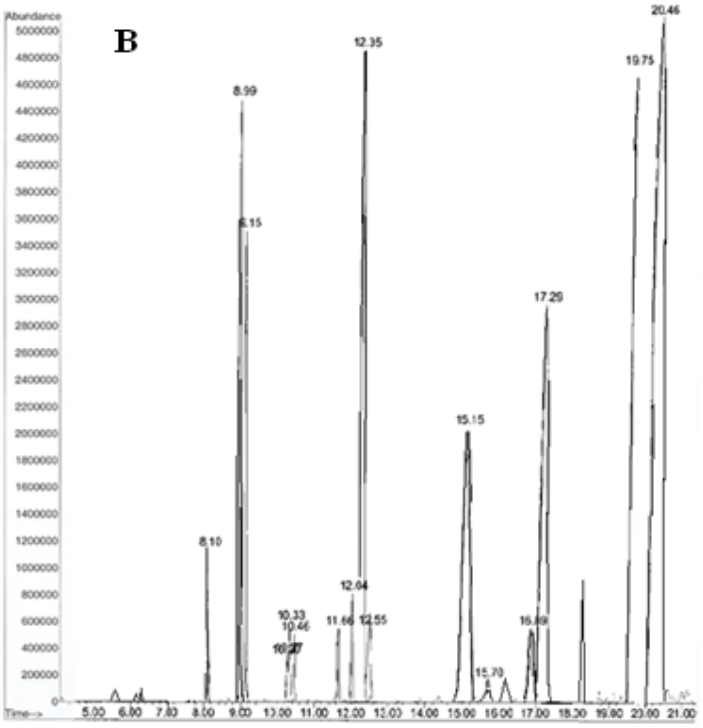
ادامه جدول شماره ۱-

ردیف	ترکیبات	شاخص بازداری	درصد اجزا
۹	1,8-Cineol	۱۰۳۳	۰/۸۲
۱۰	(E)- β-Ocimene	۱۰۵۰	۰/۳
۱۱	(Z)-Sabinene hydrate	۱۰۶۸	۰/۲۲
۱۲	α –Terpinolene	۱۰۸۴	۰/۳۷
۱۳	Linalool	۱۰۹۸	۰/۳۴
۱۴	cis-Thujone	۱۱۰۲	۰/۴
۱۵	Trans-Thujone	۱۱۱۴	۱۰/۹
۱۶	Camphor	۱۱۴۷	۱۲/۸۶
۱۷	3-Thujanol	۱۱۶۶	۰/۳۸
۱۸	Bornyle acetate	۱۲۵۵	۰/۲۴
۱۹	α-Terpinyl acetate	۱۳۴۹	۰/۳۳
۲۰	α-Bisabolol oxide B	۱۶۵۵	۰/۴۸
۲۱	β- Bisabolol	۱۶۷۱	۰/۳
۲۲	α-Bisabolone oxide A	۱۶۸۲	۱۰/۳
۲۳	Chamazulene	۱۷۲۵	۱۱/۸
۲۴	α-Bisabolol oxide A	۱۷۴۴	۲۸/۲
جمع			**۹۳/۱**



شکل شماره ۱-

Archive of SID
www.SID.ir



شکل شماره ۱- کروماتوگرام گازی ترکیبات روغن اسانسی گیاه *Fritillaria officinalis* به روش HS-SPME (B) HD (A)

جدول شماره ۲- نوع و دسته‌بندی ترکیبات ترپنوئیدی شناسایی شده در اسانس گیاه *F. imperialis* به روش HD

ترکیب‌های ترپنوئیدی	درصد (غلظت)
مونوترپن‌های هیدروکربنی	۲۷/۵۵
مونوترپن‌های اکسیژن‌دار	۲۶/۲۷
سزکوئی‌ترپن‌های هیدروکربنی	---
سزکوئی‌ترپن‌های اکسیژن‌دار	۳۹/۲۸

تجزیه شیمیایی اسانس حاصل از تکنیک میکرو استخراج از فضای فوقانی فاز جامد

در این تکنیک مقدار ۰/۵ گرم گیاه خشک در ویالی قرار داده شد و دمای ویال بین ۶۰ تا ۷۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد (شرایط دمایی در حالت بهینه قرار می‌گیرد تا بخارات موجود در اسانس گیاه در فضای بالای سطح جامد به حالت اشباع در آیند). سپس سرنگ SPME در فضای فوقانی ظرف با درب پوشیده قرار داده می‌شود و مواد موجود در بخارات گیاه بوسیله پوشش فیبر موجود در سوزن دستگاه جذب می‌شود. پس از زمان کافی و اشباع شدن فیبر از ترکیبات فرّار به طور مستقیم در بخش ورودی دستگاه GC-MS قرار می می‌گیرد و در اثر دمای قسمت ورودی، مواد موجود در فیبر واجذب شده و وارد دستگاه GC-MS شده و مورد شناسایی قرار می‌گیرند. مقادیر و نوع هر یک از ترکیبات سازنده اسانس به روش HS-SPME پس از تجزیه و تحلیل کروماتوگرام گازی مشخص شد. در تجزیه شیمیایی اسانس حاصل از اندام هوایی گیاه *F. imperialis* با تکنیک HS-SPME، ۲۱ ترکیب شناسایی شد که ترکیبات اصلی آنها در جدول شماره ۳ آمده

Archive of SID
www.SID.ir

است و در کل ۹۴/۹۳٪ از اسانس به دست آمده از اندام هوایی گیاه را تشکیل می‌دهند. حدود ۵۱/۷۱٪ از ترکیبات شناسایی شده را مونوترپن‌ها تشکیل می‌دهند که از این میزان، ۱۸/۷۹٪ شامل مونوترپن‌های اکسیژن دار و ۳۲/۹۲٪ مونوترپن‌های هیدروکربنی می‌باشد. در حالی که تنها ۴۷/۵۹٪ را سزکوئی سزکوئی‌ترپن‌ها شامل می‌شوند که محتوی سزکوئی‌ترپن‌های اکسیژن‌دار می‌باشند (جدول شماره ۴).

جدول شماره ۳- ترکیبات شناسایی شده در اسانس گیاه *F. imperialis* به روش HS-SPME

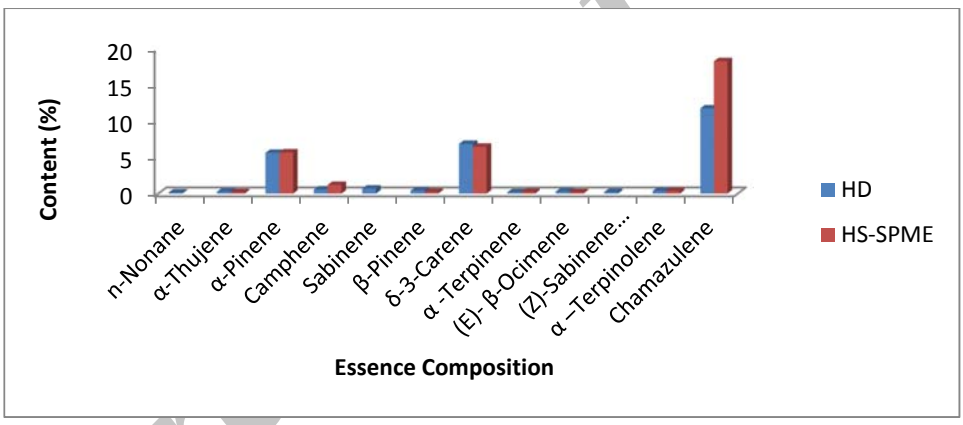
No.	Compounds	RI	%Area
1	α-Thujene	931	0.2
2	α-Pinene	939	5.7
3	Camphene	947	1.2
4	β-Pinene	980	0.23
5	δ-3-Carene	1009	6.5
6	α -Terpinene	1018	0.24
7	1,8-Cineol	1033	0.26
8	(E)- β-Ocimene	1050	0.2
9	α –Terpinolene	1084	0.35
10	Linalool	1098	0.16
11	cis-Thujone	1102	0.3
12	Trans-Thujone	1114	7.89
13	Camphor	1147	9.54
14	3-Thujanol	1166	0.23
15	Bornyle acetate	1255	0.15
16	α-Terpinyl acetate	1349	0.26
17	α-Bisabolol oxide B	1655	0.32
18	β- Bisabolol	1671	0.27
19	α-Bisabolone oxide A	1682	11.8
20	Chamazulene	1725	18.3
21	α-Bisabolol oxide A	1744	35.2
Total			**99.3**

جدول شماره ۴- نوع و دسته‌بندی ترکیبات ترپنوئیدی شناسایی شده در اسانس گیاه *F. imperialis* به روش HS-SPME

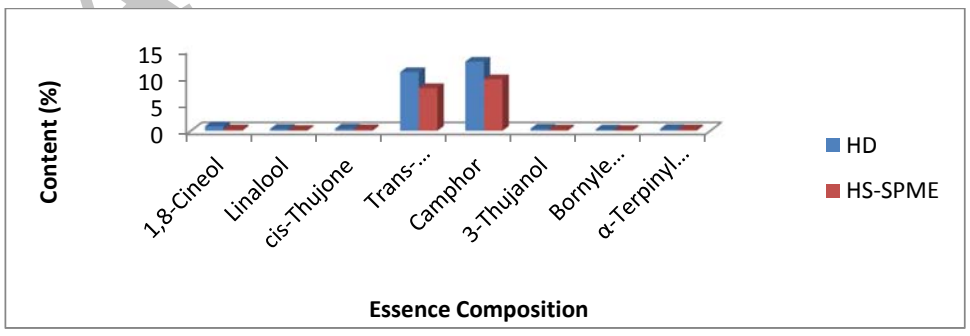
ترکیب‌های ترپنوئیدی	درصد (غلظت)
مونوترپن‌های هیدروکربنی	۳۲/۹۲
مونوترپن‌های اکسیژن‌دار	۱۸/۷۹
سزکوئی‌ترپن‌های هیدروکربنی	---
سزکوئی‌ترپن‌های اکسیژن‌دار	۴۷/۵۹

Archive of SID
www.SID.ir

مقایسه مونوترپن‌های هیدروکربنی شناسایی شده اسانس گیاه *F. imperialis* به روش تقطیر با آب (HD) و روش میکرو استخراج از فضای فوقانی فاز جامد (HS-SPME) در شکل شماره ۲- الف نشان داده شده است. نتایج این تحقیق نشان داد که در مقایسه استخراج اسانس به روش تقطیر با آب و روش میکرو استخراج فاز جامد فضای فوقانی، هر دو روش از کارایی مشابهی در استخراج مونوترپن‌های هیدروکربنی برخوردار هستند و هر دو روش در استخراج مونوترپن‌های هیدروکربنی نظیر آلفا- پینن و دلتا-۳-کارن موفق عمل نموده است. شکل شماره ۲- ب مقایسه مونوترپن‌های اکسیژن‌دار شناسایی شده اسانس گیاه *F. imperialis* به روش تقطیر با آب (HD) و روش میکرو استخراج از فضای فوقانی فاز جامد (HS-SPME) را نشان می‌دهد. نتایج تحقیق نشان داد روش تقطیر با آب نسبت به روش میکرو استخراج از فضای فوقانی فاز جامد در استخراج مونوترپن‌های اکسیژن‌دار ترانس-توجون و کامفور، بهتر عمل نموده است و مقادیر این دو ترکیب نسبت به سایر مونوترپن‌های اکسیژن‌دار شناسایی شده اسانس گیاه، از ترکیب درصد بالایی برخوردار است. مقایسه سزکوئی‌های اکسیژن‌دار شناسایی شده اسانس گیاه *F. imperialis* به روش تقطیر با آب (HD) و روش میکرو استخراج از فضای فوقانی فاز جامد (HS-SPME) در شکل شماره ۲- ج نشان داده شده است. نتایج تحقیق بیان می‌کند که در مقایسه استخراج اسانس به روش تقطیر با آب و روش میکرو استخراج فاز جامد فضای فوقانی، هر دو روش در استخراج سزکوئی‌ترپن‌های اکسیژن‌دار نتایج مشابهی دربرداشته‌اند و هر دو روش در استخراج سزکوئی‌ترپن‌های اکسیژن‌دار نظیرآلفا- بیزابولون اکسید A و آلفا- بیزابولول اکسید A موفق عمل نموده‌اند.

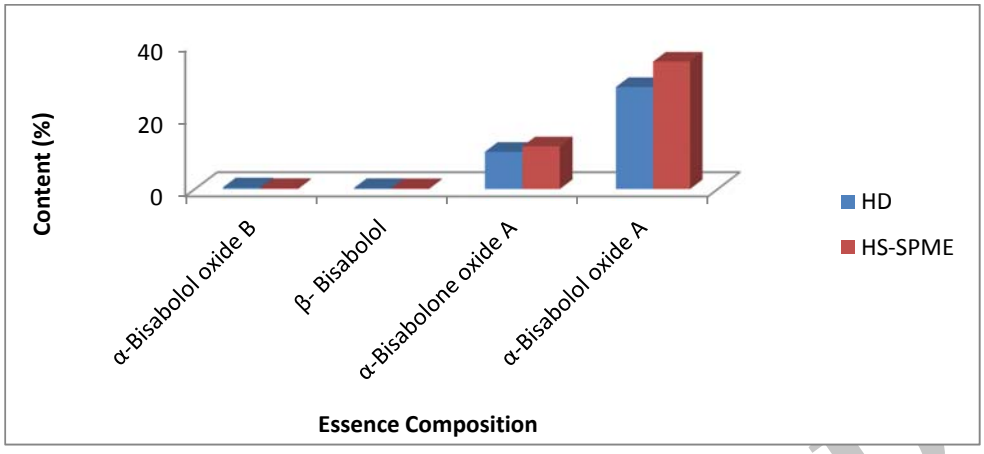


شکل شماره ۲- (الف)



شکل شماره ۲- (ب)

www.SID.ir



(ج)

شکل شماره ۲- مقایسه الف- مونوترپن‌های هیدروکربنی ب- مونوترپن‌های اکسیژن‌دار ج- سزکوئی‌ترپن‌های اکسیژن‌دار شناسایی شده اسانس گیاه *F. imperialis* به روش‌های HD و HS-SPME

بحث

در این تحقیق اسانس اندام هوایی گیاه لاله واژگون (*F. imperialis*) مورد تجزیه شیمیایی قرار گرفت و از نظر اجزا، ترکیب درصد آنها و همچنین ساختار هر جزء بررسی شد. به منظور استخراج اسانس‌های گیاهی از روش‌های تقطیر با آب و میکرو استخراج فاز جامد فضای فوقانی استفاده شد. میکرو استخراج از جمله روش‌هایی است که در سال‌های اخیر فراوان به منظور استخراج روغن‌های اسانسی به کار رفته و از معروف‌ترین روش‌های آن میکرو استخراج با فاز جامد در فضای فوقانی می‌باشد. مزیت این روش توانایی استخراج اجزا از نمونه با مقادیر بسیار کم و تزریق و شناسایی به کمک دستگاه GC-MS بوده، همچنین یک روش استخراج سریع و ساده برای اسانس‌های گیاهی نسبت به روش تقطیر با آب است [۱۴، ۱۳]. مشخص شد گیاه مذکور از سزکوئی‌ترپن‌ها غنی‌تر بوده که این مطلب هم در تجزیه اسانس حاصل از تقطیر با آب و هم در تجزیه اسانس گیاه به روش استخراج از فضای فوقانی فاز جامد کوپل شده با تکنیک GC-MS مشاهده می‌شود. در تجزیه شیمیایی اسانس حاصل از اندام هوایی گیاه *F. imperialis* با تکنیک تقطیر با آب، ۲۴ ترکیب شناسایی شد که ترکیبات اصلی اسانس شامل آلفا- بیزابولول اکسید A (۲۸/۲٪)، کامفور (۱۲/۸۶٪)، کامازولن (۱۱/۸٪)، ترانس-توجون (۱۰/۹٪)، آلفا- بیزابولون اکسید A (۱۰/۳٪)، دلتا-۳-کارن (۶/۹٪) و آلفا- پینن (۵/۶۵٪) می‌باشند که در کل ۸۶/۶۱٪ از اسانس به دست آمده از اندام هوایی گیاه را تشکیل می‌دهند. حدود ۵۳/۸۲٪ از ترکیبات شناسایی شده را مونوترپن مونوترپن‌ها تشکیل می‌دهند که از این میزان، ۲۶/۲۷٪ شامل مونوترپن‌های اکسیژن‌دار و ۲۷/۵۵٪ مونوترپن‌های هیدروکربنی می‌باشد. در حالی که تنها ۳۹/۲۸٪ را سزکویی‌ترپن‌ها شامل می می‌شوند که محتوی سزکویی‌ترپن‌های اکسیژن‌دار می‌باشند. همچنین در تجزیه شیمیایی اسانس حاصل از اندام هوایی گیاه *F. imperialis* با تکنیک HS-SPME، ۲۱ ترکیب شناسایی شد که ترکیبات اصلی اسانس شامل آلفا- بیزابولول اکسید A (۳۵/۲٪)، کامفور (۹/۵۴٪)، کامازولن (۱۸/۳٪)، ترانس-توجون (۷/۸۹٪)، آلفا- بیزابولون اکسید A (۱۱/۸٪)، دلتا-۳-کارن (۶/۵٪) و آلفا-پینن (۵/۷٪) می‌باشند که در کل ۹۴/۹۳٪ از اسانس به دست آمده از اندام هوایی گیاه را تشکیل می‌دهند. حدود ۵۱/۷۱٪ از ترکیبات شناسایی شده را مونوترپن‌ها تشکیل می‌دهند که از این میزان، ۱۸/۷۹٪ شامل مونوترپن‌های اکسیژن‌دار و ۳۲/۹۲٪ مونوترپن‌های هیدروکربنی می‌باشد. در حالی که تنها ۴۷/۵۹٪ را سزکویی‌ترپن‌ها شامل می‌شوند که محتوی سزکویی‌ترپن‌های اکسیژن‌دار می‌باشند. از این دو تجربه می‌توان دریافت که آلفا- بیزابولول اکسید A، کامفور،

Archive of SID
www.SID.ir

کامازولن، ترانس- توجون، آلفا- بیزابولون اکسید A، دلتا-۳-کارن و آلفا-پینن از ترکیبات اصلی و مشخصه اسانس گیاه می‌باشند. آلفا- بیزابولول ماده ای ست که اثرات ضد التهابی و التیام‌بخش و غیر آلرژیک دارد. این ماده اثرات مخرب اشعه ماورابنفش را کاهش می‌دهد و با اعمال ویژگی ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی کارایی ضدآفتاب را افزایش می‌دهد. آلفا- بیزابولول در اسانس اندام هوایی لاله واژگون درصد قابل توجهی را به خود اختصاص داده است و به این ترتیب اسانس گونه *F. imperialis* می‌تواند بسیار مؤثر و مفید واقع شود. بیزابولون‌ها در دسته سزکوئی‌ترپنوئیدها قرار دارند و جزء اصلی اسانس‌های بسیاری از گیاهان از جمله لیمو و پونه کوهی می‌باشند. مشتقات مختلف آن می‌توانند به عنوان فرومون، در حشراتی نظیر مگس میوه عمل کنند. بتا- بیزابولون بوی بالزامیک دارد و در اروپا به عنوان چاشنی غذا استفاده می می‌شود [۱۵]. کامفور یک مونوترپن اکسیژن دار دوحلقه‌ای است که قویاً ضدعفونی‌کننده و به عنوان یک ترکیب آنتی آنتی‌پاتوژن و مخصوصاً به عنوان دافع قارچ، باکتری و حشرات شهرت یافته است [۱۶]. همچنین به عنوان مسکن اعصاب، کاهش‌دهنده دمای بدن و تب [۱۷] و محرک مراکز عصبی و تنفسی شناخته شده است [۱۸]. به طور کلی، پینن‌ها که از شناخته شده‌ترین ترپن‌ها هستند، اهمیت تجاری ویژه‌ای دارند. از این ترکیب‌ها در ساختن صابون‌ها، کرم‌ها، پاک‌کننده‌ها، رنگ، روغن جلا، لاک، چسب، کاغذ، داروهای ضدعفونی ضدعفونی‌کننده، حشره‌کش‌ها، آفت‌کش‌ها و حلال‌ها استفاده می‌شود. همچنین پینن‌ها در ترکیب‌های ترپنوئیدی دیگر مانند ترپینولین، ترپینن هیدرات، کامفور، کامفن و اوسیمن مورد استفاده قرار می‌گیرند. آلفا- پینن یک ترکیب آلی و یکی از دو ایزومر پینن است و مونوترپنوئید می‌باشد. یک آلکن است و از یک حلقه چهار عضوی تشکیل شده است. آلفا- پینن در روغن‌های بسیاری از گیاهان بویژه کاج و همچنین در اسانس رزماری یافت می‌شود. هر دو گونه آلفا-پینن (راست گردان و چپ گردان) در طبیعت شناخته شده است. مخلوط راسمیک آن در برخی از روغن‌های اسانسی مانند روغن اسانس اکالیپتوس شناسایی شده است [۱۹]. همانطور که از شکل شماره ۱ و جداول شماره ۱ و ۳ در این تحقیق به دست می می‌آید، میزان آلفا- توجن اسانس اندام‌های هوایی بسیار کم است. این ترکیب بسیار سمّی است و مقدار آن در اسانس‌های گیاهی که مورد مصرف دارویی قرار می‌گیرد باید کمتر از ۰/۲٪ باشد. در غیر این صورت، تشنج‌آور بوده و خطر مرگ را به دنبال دارد. بنابراین جهت مصرف آن در درمان سردرد، میگرن و مخصوصاً در استعمال داخلی حتماً باید به میزان این ترکیب در اسانس گیاه توجه نمود [۲۰]. در مقایسه تجزیه اسانس گیاه بوسیله تکنیک‌های HD و HS-SPME، تکنیک میکرو استخراج فاز جامد در فضای فوقانی از نظر میزان زمان مورد نیاز و هچنین صرفه‌جویی در مصرف آب مناسب‌تر می‌باشد و چون از دمای پایین‌تری استفاده می‌شود، احتمال تجزیه و تغییر ماهیت دادن اسانس در این روش بسیار پایین‌تر است. همانطور که از جداول شماره ۲ و ۴ پیداست تکنیک HS-SPME برای سزکوئی‌ترپن‌های اسانس‌ها نیز روش مناسب‌تری به نظر می می‌رسد [۲۱]. نتایج به دست آمده از میکرو استخراج با فاز جامد در فضای فوقانی گیاه *F. imperialis* نشان‌دهنده این است که در مقایسه با روش تقطیر با آب، این روش توانایی بیشتری برای استخراج ترکیبات سنگین‌تر را داشته و دلیل عمده آن استفاده از فیبر PDMS در این روش می‌باشد زیرا الکل‌های قطبی و ترپن‌های با وزن مولکولی کم را جذب نمی‌کند [۲۲]. در مطالعه انجام گرفته توسط .Rahman et al (۲۰۰۲) بر روی گیاه لاله واژگون (*Fritillaria imperialis* L.)، دو آلکالوئید استروئیدی جدید به نام‌های ایمپریسین (Impericine) و فرتیسین (Forticine) از عصاره گیاه مذکور استخراج شدند و این دو باز استروئیدی فعالیت مهارکنندگی آنزیم کولین استراز را از خود نشان دادند [۲۳]. در پژوهش انجام یافته توسط .Zarei et al (۲۰۱۷) تأثیر عصاره استخراج شده از لاله واژگون (*Fritillaria imperialis* L.) بر روی سلول‌های سرطانی بافت کبد، پستان و سلول‌های فیبروبلاست مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان دادند که در اثر تزریق عصاره گیاه مذکور بر روی سلول‌های سرطانی بافت کبد و پستان و سلول‌های فیبروبلاست، دیواره سلول‌های سرطانی تخریب و میزان سلول‌های سرطانی کاهش یافته است و

Archive of SID
www.SID.ir

همچنین مرگ سلولی در دیواره سلولی سلول‌هایی که تحت تأثیر درمان با عصاره گیاه مذکور قرار گرفته‌اند، مشاهده شد. علاوه بر این، تأثیر عصاره اتانولی بیش از عصاره آبی بود و تأثیر عصاره گیاه روی سلول‌های فیبروبلاست نسبت به سلول سلول‌های سرطانی کمتر بود [۲۴]. Badfar-Chaleshtori et al. (۲۰۱۲) تنوع ژنتیکی را در جمعیت‌های لاله واژگون را در ناحیه زاگرس ایران با شاخص‌های AFLP، ISSR و RAPD مورد مطالعه قرار دادند. نتایج نشان دادند که شاخص AFLP بهترین گزینه برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و دستیابی به تفاوت تفاوت‌های موجود در جمعیت‌های گونه *Fritillaria imperialis* از هفت ناحیه جغرافیایی زاگرس ایران می‌باشد [۲۵] در پژوهشی که توسط Koohgard et al. (۲۰۱۲) روی لاله واژگون انجام شد، میانگین درصد همردیف (الل)های ژنی چند شکل بین جمعیت‌های لاله واژگون حدود ۸۷/۶۵ برآورد شد که نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بالا بین جمعیت‌های لاله واژگون است [۲۶]. Yamagishi et al. (۲۰۱۰) در بررسی روی *Fritillaria camschatcensis* نیز نشان دادند که تمایز ژنتیکی بالایی بین سه جمعیت مورد بررسی وجود دارد و افراد متعلق به هر جمعیت در گروه‌های جداگانه و خاص جمعیتی قرار دارند [۲۷]. در مطالعه انجام گرفته توسط Znini et al. (۲۰۱۴) بر روی اسانس گیاه *Salvia aucheri* با روش‌های میکرو استخراج فاز جامد فضای فوقانی و تقطیر با آب، نتایج نشان دادند که روش تقطیر با آب تعداد ترکیب بیشتری را از گیاه استخراج می‌کند که با پژوهش حاضر همسو است [۲۸]. در جدیدترین مطالعه انجام گرفته توسط آبرومند و همکارانش (۱۳۸۹) بر روی استخراج اسانس گیاه *A. absinthium* به روش‌های متفاوت، نتایج نشان داد که استخراج با روش تقطیر با بخار آب (HD) و HS-SPME نتایج مشابهی را دربرداشت که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی و مطابقت دارد [۲۹]. در بررسی به عمل آمده توسط فیروزی و همکاران (۱۳۹۰) بر روی اسانس گیاه *T. sonbolii* با روش‌های استخراج جذبی از فضای فوقانی و تقطیر با آب، نتایج نشان دادند که روش تقطیر با آب تعداد ترکیب بیشتری را از گیاه استخراج می‌کند که با پژوهش حاضر همسو است. این ترکیبات به لحاظ تعداد، نوع و مقدار مواد متفاوت از ترکیبات استخراج شده به روش HS-SPME می‌باشند به طوری که ۸۱ درصد اسانس گیاه که با روش HS-SPME استخراج شده، حاوی مونوترپن‌های آلفا آلفا و بتا پینن است. در صورتی که بیشتر از نصف اسانس استخراج شده با روش تقطیر با آب در دمای بالا، سزکوئی‌ترپن سزکوئی‌ترپن‌های الکلی مانند آلفا کادینول و گلوبولول است [۳۰]. در گزارش طهماسبی و همکاران (۱۳۹۲) پیرامون ساختار روغن‌های اسانسی دو گونه *Sclerorhacis platyrachis* Boiss. تحقیقات نشان داده است که در هر دو روش استخراج (HD و HS-SPME)، ترکیبات غالب اسانس اسانس‌ها از نوع مونوترپن‌های هیدروکربنی و مونو اکسیژن‌دار هستند، ولی مقدار مونوترپن‌های هیدروکربنی در روش میکرو استخراج فاز جامد فضای فوقانی بیشتر و مقدار مونوترپن‌های اکسیژن‌دار در روش تقطیر با آب خیلی بیشتر است که نتایج به دست آمده با تحقیق حاضر همخوانی و مطابقت دارد [۳۱].

نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر در شرایط تجزیه‌ای ذکر شده با روش HS-SPME نشان می‌دهد که این روش در مقایسه با روش تقطیر با بخار آب (HD) موفق عمل نموده و به دلیل کاربرد و هدف (سرعت بالای آنالیز و حجم نمونه‌های کم) بسیار ارزشمند است. در مورد بررسی اجزای مواد مؤثره گیاه بوسیله روش‌های HD و HS-SPME تاکنون گزارشی از بررسی ترکیبات این گیاه بوسیله روش‌های دیگر در منابع علمی ارائه نشده است و نتایج مطالعه اخیر نشان می‌دهد که روش HS-SPME در یک جمع‌بندی، به دلیل عدم نیاز به حلال، سادگی، نیاز به مقدار بسیار کم نمونه، هزینه کمتر، سازگاری با محیط زیست و کوتاه‌ترین زمان استخراج بسیار مفید و حائز اهمیت است و نظر به وجود برخی ترکیبات ارزشمند در اسانس گیاه، اثرات ضد میکروبی و ضد قارچی و همچنین خاصیت آنتی آنتی‌اکسیدانی اسانس به عنوان سایر گزینه‌های پژوهشی می می‌تواند مورد بررسی قرار گیرد.

Archive of SID
www.SID.ir

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی و آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد واحد علوم دارویی تهران به دلیل همکاری و راهنمایی‌های ارزشمندشان در اجرای این پروژه قدردانی و تشکر می‌شود.

منابع

1. Beck J. Fritillaries, a gardener's introduction to the genus Fritillaria. Faber and Faber, London. 1953.

2. Burquez A. Blue tits, Parus caeruleus, as pollinators of the crown imperial, *Fritillaria imperialis*, in Britain. *Oikos* 1989; 55: 335-340.

3. Kang DG, Sohn EJ, Lee YM, Lee AS, Han JH, Kim TY and Lee HS. Effects of bulbus Fritillaria water extracton blood pressure and renal functions in the LNAME induced hypertensive rats. *J. Ethnopharm*. 2004; 91: 51-56.

4. Kitajima J, Noda N, Ida Y, Miyahara K and Kawasaki T. Steroidal alkaloids of fresh bulbs of Fritillaria thunbergi and of crude drug 'bai-mo' prepared there from. *Heterocycles* 1981; 15: 791-796.

5. Liu XX, Chen C, Pan LL, Chen YH and Fu CX. Genetic diversity of bulbus Fritillariae thunbergii Miq.varieties based on ISSR markers. *Journal of Zhejiang University* (*Agric and Life Sci*). 2010; 36: 246-254.

6. Dawidowicz AL, Szewczyk J and Dybowski MP. Modified application of HS-SPME for quality evaluation of essential oil plant materials. *Talanta* 2016; 146: 195-202.

7. Nekoei M and Mohammad Hosseini M. Chemical Compositions of the Essential Oils from the Aerial Parts of *Achillea wilhelmsii* Using Traditional Hydrodistillation, Microwave Assisted Hydro-distillation and Solvent-Free Microwave Extraction Methods: Comparison with the Volatile Compounds Obtained by Headspace Solid-Phase Micro extraction. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 2016; 19 (1): 59-75.

8. Nekoei M, Mohammad Hosseini M and Akhlaghi H. Chemical Composition of the Volatile Oils from the Aerial Parts of *Artemisia annua* L. (Asteraceae) by Using Head Space Solid Phase Microextraction and Hydrodistillation Methods Prior to Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Determination: A Comparative Investigation. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 2012; 15: 926-933.

9. Rastakhi N, Azar PA, Tehrani MS, Moradalizadeh M and Larijani K. Chemical constituents comparison of essential oils of aerial parts of Conium Maculatum L. growing wild in Iran by hydrodistillation, microwave assisted hydrodistillation and solid phase microextraction methods. *International Journal of Life Sciences* 2015; 9 (2): 48-50.

10. Silva EAS, Risticevic S and Pawliszyn J. Recent trends in SPME concerning sorbent materials, configurations and in vivo applications. *Trends in Analytical Chem*. 2013; 43: 24-36.

11. Adams RP. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/ Quadropole Mass Spectroscopy. Allured Publishing Co., USA, 2004, pp: 456.

12. Davies NW. Gas Chromatographic Retention Index of Monoterpenes and Sesquiterpenes on Methyl silicone and Carbowax 20 M phases. *Journal of Chromatogaphy* 1990; 503: 1-24.

13. Richter J and Schellenberg I. Comparison of different extraction methods for the determination of essential oils and related compounds from aromatic plants and optimization of solid-phase

Archive of SID
www.SID.ir

microextraction/gas chromatography. *Analytical Bio analytical Chem*. 2007; 387: 2207-17.

14. Hernandez-Cordoba M, Cacho JI, Campillo N and Vinas P. Determination of alkyl phenols and phthalate esters in vegetables and migration studies from their packages by means of stir bar sorptive extraction coupled to gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2012; 1241: 21 - 7.

15. Vas G, Huang JT, Alquier L, Kaisa JP, Reed G and Gilmor T. Method development and validation for the determination of 2,4,6-tribromoanisole, 2,4,6-tribromophenol, 2,4,6-trichloroanisole, and 2,4,6-trichlorophenol in various drug products using stir bar sorptive extraction and gas chromatography–tandem mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*. 2011; 1262: 196-204.

16. Mohammad Hosseini M. Chemical composition of the volatile fractions from flowers, leaves and stems of *Salvia mirzayanii* by HS-SPME-GC-MS. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 2015; 18: 464 - 476.

17. Chiasson H, Belanger A, Bostanian N, Vincent C and Poliquin A. caricidal properties of Artemisia absinthium and Tanacetum vulgare (Asteraceae) essential oils obtained by three methods of extraction. *Journal of Economic Entomol*. 2001; 94: 167- 71.

18. Baser B, Demirci N, Tabanca T, Özek T and Goren N. Composition of the essential oils of Tanacetum armenum (DC.) Schultz Bip., T. balsamita L., T. chiliophyllum (Fisch. & Mey) Schultz Bip. var. chiliophyllum and T. haradjani (Rech. Fil.) Grierson and the enantiomeric distribution of camphor and carvone. *Flavour and Fragrance J*. 2001; 16: 195-200.

19. Jain NK and Kulkarni SK. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Tanacetum parthenium L. extract in mice and rats. *J. Ethnopharmacol*. 1999; 68: 251-259.

20. Keskitalo M, Pehu E, Simon JE. Variation in volatile compounds from tansy (*Tanacetum vulgare* L.) related to genetic and morphological differences of genotypes. *Biochemical Systematic and Ecol.* 2001; 29: 267-285.

21. Ridgway K, Lalljie SPD and Smith RM. An alternative method for analysis of food taints using stir bar sorptive extraction. *Analytica Chimica Acta* 2010; 677: 29 - 36.

22. Zhang DQ, Gao LM and Yang YP. Genetic diversity and structure of a traditional Chinese medicinal plant species, *Fritillaria cirrhosa* (Liliaceae) in southwest China and implications for its conservation. *Biochem. Sys. Ecol*. 2010; 38: 236-242.

23. Rahman A-U, Akhtar MN, Choudhary MI, Tsuda Y, Sener B, Khalid A and Parvez M. New steroidal alkaloids from *Fritillaria imperialis* and their cholinesterase inhibiting activities. *Chem. Pharm. Bull*. 2002; 50 (8): 1013-1016.

24. Zarei O and Yaghoobi MM. Cytotoxic effects of *Fritillaria imperialis* extracts on human liver cancer cells, breast cancer cells and fibroblast-like cells. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 2017; 94: 598-604.

25. Badfar-Chaleshtori S, Shiran B, Kohgard M, Mommeni H, Hafizi A, Khodambashi M, Mirakhorli N and Sorkheh K. Assessment of genetic diversity and structure of Imperial Crown (*Fritillaria imperialis* L.) populations in the Zagros region of Iran using AFLP, ISSR and RAPD markers and implications for its conservation. *Biochemical Systematics and Ecol*. 2012; 42: 35-48.

26. Koohgard M, Sheeran B and Mirakhorli N. Genetic diversity between and within populations of Fritillaria (*Fritillaria imperialis* L.) Zagros using molecular markers RAPD, *Modern Genetics* 2012; 7 (4): 353-362. (in Farsi)

27. Yamagishi M, Nishioka M and Kondo T. Phenetic diversity in the *Fritillaria camschatcensis* population growen on the Sapporo campus of

Archive of SID
www.SID.ir

Hokkaido University. *Landscape Ecol. Eng*. 2010; 6: 75-79.

28. Znini M, Majid L, Desjobert JM, Paolini J and Costa J. GC-MS analysis and comparision of volatile compounds of *salvia aucheri* Boiss. Var. *mesatlantica* Maire, obtained by Hydrodistillation and Headspace Solid Phase Microextraction (HS-SPME). *Acta Chromatographica* 2014; 26 (3): 495-505.

29. Abroomand-Azar P, Saber Tehrani M, Soleimani M, Porgham A and Ghorbani A. The National Phytochemistry Conference; 2010, 5-6 March; Qom, Iran. pp: 105.

30. Firozy M, Talebpour Z and Sonboli A. Essential oil composition and antioxidant activities of the various extracts of Tanacetum sonbolii Mozaff. (Asteraceae) from Iran. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters* 2011; 26: 2204-7.

31. Tahmasebi A, Andi SA, Ahmadi MR and Alavi B.G. Inhibitory effect of essential oils of *Sclerorhachis platyrachis* and *Sclerorhachis leptoclada* on phytopathogenic fungi. *International Journal of Agri*. *Science* 2012; 2 (1): 48-53.

Archive of SID

www.SID.ir