Archive of SID

نشریه علمی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۶، شماره ۳، صفحه ۴۸۲-۴۶۶ (۱۳۹۹)

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijmapr.2020.128276.2663
شناسه دیجیتال (DOR): 98.1000/1735-0905.1398.36.466.101.3.1575.1610

ارزیابی ترکیب‌های فنولیک و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در برگ گونه‌های مختلف گل ماهور (*Verbascum* L.) در استان آذربایجان‌غربی

سونیا امینی[۱]، عباس حسنی[۲*]، ابوالفضل علیرضالو[۳] و رامین ملکی[۴]

۱- دانشجوی دکترا، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۲*- نویسنده مسئول، استاد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران، پست الکترونیک: a.hassani@urmia.ac.ir
۳- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۴- استادیار، گروه پژوهشی کروماتوگرافی، جهاد دانشگاهی آذربایجان‌غربی، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۸ تاریخ اصلاح نهایی: خرداد ۱۳۹۹ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۹

چکیده

گل ماهور یا خرگوشک (*Verbascum* L.) گیاهی علفی، دوساله، دارویی و متعلق به تیره گل‌میمون (Scrophulariaceae) می‌باشد. از گل‌های این گیاه برای درمان ناراحتی‌های دستگاه تنفس استفاده می‌شود. در این تحقیق تنوع ژنتیکی گونه‌های مختلف گل ماهور جمع‌آوری‌شده از مناطق مختلف استان آذربایجان‌غربی براساس برخی نشانگرهای فیتوشیمیایی در راستای اهلی‌سازی این گیاه ارزشمند مورد بررسی قرار گرفت. تنوع فیتوشیمیایی گونه‌های مختلف گل ماهور براساس محتوای کاروتنوئید، بتاکاروتن، مقدار فنل کل، فلاونوئید کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی (روش FRAP و DPPH) و ترکیب‌های فنلی (گالیک اسید، کافئیک اسید، کلروژنیک اسید، روتین، کوماریک اسید، کوئرسیتین، سینامیک اسید و آپی‌ژنین) به روش HPLC در اندام برگ ارزیابی گردید. نتایج نشان داد که نوع گونه تأثیر معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ بر میزان کاروتنوئید، بتاکاروتن، فنل، فلاونوئید کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ترکیب‌های فنلی داشته است. بیشترین میزان کاروتنوئید کل (۷۶/۲۷ mg/g DW)، بتاکاروتن (۵/۸۸ mg/100 g DW)، فنل کل (۳۲/۸۳ mg GAE/g DW)، فلاونوئید کل (۷/۱۳ mg QE/g DW) و فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH (۳۴/۶۶ µg AA/mL) در برگ‌های گونه *V. sinuatum* C. Koch مشاهده شد. نتایج نشان داد که برگ‌های گونه *V. erianthum* Benth. بیشترین میزان ترکیب‌های کلروژنیک اسید، کوئرسیتین، سینامیک اسید و آپی‌ژنین را دارد، در حالی‌که بیشترین مقدار گالیک اسید و کافئیک اسید در *V. saccatum* مشاهده شد. درمجموع یافته‌های این تحقیق نشان داد که تنوع وسیعی از گونه‌های گل ماهور در استان آذربایجان‌غربی وجود دارد. گونه‌های *V. erianthum* و *V. saccatum* دارای خصوصیات فیتوشیمیایی منحصر به‌فردی بودند که می‌توان از آنها برای طراحی برنامه‌های اصلاحی و نیز بهره‌برداری در صنایع داروسازی استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: تنوع فیتوشیمیایی، خرگوشک (*Verbascum* L.)، ترکیب‌های فنلی، فنل کل، فلاونوئید کل.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

امروزه به‌خوبی مشخص شده است که رادیکال‌های آزاد حاوی گونه‌های اکسیژن یا نیتروژن مسئول ایجاد بیماری‌های مزمن مختلفی مانند پارکینسون، آلزایمر، تصلب شرایین، پیری و سرطان در قسمت‌های مختلف بدن هستند. گیاهان به‌دلیل داشتن ترکیب‌های فنولیک دارای فعالیت‌های بیولوژیکی متعددی مانند خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی هستند. این ترکیب‌ها نقش مهمی در سلامتی و حتی بهبود بیماری‌ها ایفاء می‌کنند. ترکیب‌های فنولیک یکی از مهمترین ترکیب‌های فیتوشیمیایی موجود در گیاهان هستند. این ترکیب‌ها از حلقه‌های آروماتیک و یک یا چند گروه هیدروکسیل (OH) ساخته شده‌اند. با توجه به تعداد واحدهای فنولیک و محل قرارگیری و تعداد گروه‌های هیدروکسیل بیش از ۸۰۰۰ نوع ترکیب فنولیک شناسایی شده است (Kumar *et al*., 2011؛ Tohma *et al*., 2016). این ترکیب‌ها به‌دلیل خصوصیات کاهندگی خود می‌توانند به‌عنوان عوامل کاهنده (دهنده‌های پروتون) در پاکسازی اکسیژن منفرد دخالت کرده و به‌دلیل ساختار شیمیایی متنوع، تفاوت‌هایی را در فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان دهند. امروزه به دلیل اثرهای بیولوژیکی متعدد ترکیب‌های فنولیک مطالعه روی این ترکیب‌ها در حال افزایش است (Saboura *et al*., 2014).

گل ماهور (*Verbascum* sp.) بزرگترین جنس خانواده گل‌میمون (Scrophulariaceae)، گیاهی علفی، دوساله و دارویی است که در مناطق مختلف ایران به نام‌های علف خرگوش، خرگوشک، گل ماهور و علف ماهور شناخته می‌شود. از این گیاه برای درمان ناراحتی‌های تنفسی، سرفه، سرماخوردگی، التهاب حلق و گلو، ورم لوزه‌ها، اسهال و بواسیر و عفونت‌های مجاری ادرای استفاده می‌شود. همچنین جوشانده برگ‌ها یا چای گیاهی آن برای خلط‌آوری، سرفه خشک، برونشیت، گلودرد و خونریزی کاربرد دارد (Turker & Gurel, 2005؛ Riaz *et al*., 2013). گل ماهور بومی قاره آسیاست. بررسی مناطق انتشار جنس *Verbascum* sp. در ایران نشان می دهد که ۹۶٪ گونه ها متعلق به ناحیه ایران- تورانی هستند. تحقیقات تاکسونومیک نشان می دهد که در ایران ۴۲ گونه انتشار دارد که ۲۰ گونه آن انحصاری کشور است (Kheiri, 2009). ترکیب‌های موجود در جنس ورباسکوم شامل ساپونین ها، موسیلاژ، ایریدوئید گلیکوزید، فنیل اتانوئید گلوکوزید، مونوترپن گلوکوزید، نئولیگنان گلوکوزید، فلاونوئیدها، استروئیدها، اسپرمین آلکالوئید، فنولیک اسید، اسیدهای چرب، کاروتن و تانن می‌باشد (Turker & Gurel, 2005). فلاونوئید گلیکوزیدها در ساختار خود دارای اسکلت بنزو-گاما-پیرون هستند. تاکنون فلاونوئیدهای بسیاری از گونه‌های ورباسکوم گزارش شده است که تنوع زیادی در فلاون و فلاونول آگلیکون‌های آنها وجود دارد، مانند آپی ژنین، لوتئولین، کوئرسیتین و کامفرول. گلیکوزیلاسیون (قندی شدن) معمولاً در موقعیت کربن ۷ این آگلیکون‌ها رخ می‌دهد (Tatli & Akdemir, 2004). تحقیقات نشان داده است *V. phlomoides* و *V. thapsiforme* دارای اسیدهای فنلی مانند دی‌هیدروکسی سینامیک اسید، پارا کوماریک اسید، فرولیک اسید، پاراهیدروکسی بنزوئیک اسید و وانیلیک اسید می‌باشند (Kahraman *et al*., 2010). Armatu و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند در اندام گل گونه *V. phlomoides* مقدار فنل کل با توجه به نوع فرکشن (بوتانول و اتانول) بین ۴/۱۸۳ mg GA/g extract تا ۴/۹۳۳ mg GA/g extract متغیر بود. همچنین مقدار فلاونوئید کل در عصاره بوتانولی ۳۰/۷ mg Rutin/g extract و در عصاره اتانولی ۱۰/۱ mg Rutin/g extract بود. گونه‌های *V. phlomoides* و *V. densiflorum* دارای فنولیک اسیدهایی مانند پی‌کوماریک اسید، وانیلیک اسید، فرولیک اسید و پی‌هیدروکسی بنزوئیک اسید هستند. Mihailović و همکاران (۲۰۱۶)، اسیدهای فنلی، فلاونوئیدها و فعالیت آنتی‌اکسیدانی سه گونه *V. thapsus*، *V. nigrum* و *V. phlomoides* را در صربستان مقایسه کردند. آنان نشان دادند که بیشترین فنل کل و اسیدهای فنلی در *V. nigrum* وجود دارد، در حالی‌که بالاترین مقدار فلاونوئید کل در *V. phlomoides* مشاهده شد. همچنین *V. nigrum* فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتری را نسبت به سایر گونه‌ها از خود نشان داد.

با توجه به پراکنش و میزان قابل توجه گونه‌های مختلف گل ماهور در کشور و وجود ترکیب‌های زیست فعال و وجود

www.SID.ir

Archive of SID

تفاوت‌های بین‌گونه‌ای، مطالعات بیشتر در مورد خصوصیات فیتوشیمیایی اندام‌های مختلف گل ماهور ضروری به‌نظر می‌رسد. بنابراین هدف از این پژوهش بررسی مهمترین خصوصیات فیتوشیمیایی و ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی اندام برگ برخی از گونه‌های گل ماهور در استان آذربایجان‌غربی است.

مواد و روش‌ها

تهیه و آماده‌سازی نمونه‌های گیاهی

به‌منظور انجام این تحقیق، اندام برگ گونه‌های مختلف گل ماهور از مناطق مختلف آذربایجان‌غربی (جدول ۱) از اوایل تا اواخر تیرماه سال ۱۳۹۵ (در مرحله گلدهی) نمونه‌برداری و برای مطالعات بیشتر به گروه علوم باغبانی دانشگاه ارومیه منتقل شدند. با استفاده از نمونه‌های هرباریومی تهیه‌شده، گونه‌های مختلف از جنس ورباسکوم شامل: *V. erianthum*، *V. songaricum*، *V. speciosum*، *V. szovitsianum*، *V. stachydiforme*، *V. sinuatum*، *V. haussknechtianum*، *V. cheirantifolium* و *V. saccatum* مورد شناسایی قرار گرفتند.

جدول ۱- مناطق جمع‌آوری گونه‌های گل ماهور (*Verbascum* sp.)

گونه	منطقه جمع‌آوری	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	ارتفاع
V. erianthum	آذربایجان‌غربی/ بوکان (شمس برهان)	۳۶°۴۷′۴۲.۲۵"	۴۵°۴۸′۳۸.۰۳"	۱۵۹۰
V. songaricum	آذربایجان‌غربی/ بوکان (شمس برهان)	۳۶°۴۵′۰۶. ۷۹"	۴۵°۵۲′۲۲.۷۹"	۱۹۸۰
V. speciosum	آذربایجان‌غربی/ بوکان (شمس برهان)	۳۶°۴۷′۱۱. ۰۶"	۴۵°۴۹′۳۲.۱۸"	۱۶۵۰
V. szovitsianum	آذربایجان‌غربی/ دریاچه سد مهاباد	۳۶°۴۵′۳۹.۶۸"	۴۵°۴۲′۰۴.۹۱"	۱۴۲۰
V. stachydiforme	آذربایجان‌غربی/ دریاچه سد مهاباد	۳۶°۴۵′۳۰.۴۲"	۴۵°۳۷′۴۴.۵۳"	۱۰۳۷
V. sinuatum	آذربایجان‌غربی/ دریاچه سد مهاباد	۳۶°۴۴′۱۶.۸۷"	۴۵°۳۷′۲۱.۰۷"	۱۳۹۰
V. haussknechtianum	آذربایجان‌غربی/ پیرانشهر (کانی باغ)	۳۶°۴۶′۰۸.۳۵"	۴۵°۲۲′۳۱.۰۸"	۱۶۷۰
V. cheirantifolium	آذربایجان‌غربی/ انهر	۳۷°۳۶′۴۶.۴۹"	۴۴°۵۵′۵۸.۴۹"	۱۴۹۰
V. saccatum	آذربایجان‌غربی/ انهر	۳۷°۳۷′۱۶.۵۰"	۴۴°۵۶′۳۴.۱۹"	۱۴۷۰

اندازه‌گیری میزان کاروتنوئید کل و بتاکاروتن

برای سنجش میزان کاروتنوئید کل و بتاکاروتن، مقدار ۰/۰۵ گرم از بافت تازه برگ با ۵ میلی‌لیتر استون خالص در یک هاون چینی سرد و در حمام یخ هموژن شد. سپس به مخلوط حاصل ۱ گرم سولفات سدیم بدون آب اضافه و با استفاده از کاغذ صافی، صاف گردید. محلول صاف‌شده با استون به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد و به‌مدت ۱۰ دقیقه و در ۲۶۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. فاز رویی جداسازی و جذب محلول با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل UV2100 PC) در طول موج‌های ۶۶۲، ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Lichtenthaler, 1987). میزان کاروتنوئید کل برای هر عصاره با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه گردید.

$$C_a = 11.75\ A_{662} - 2.350\ A_{645}$$

$$C_b = 18.61\ A_{645} - 3.960\ A_{662}$$

$$C_{x+c} = 1000\ A_{470} - 2.270\ C_a - 81.4\ C_b/227$$

www.SID.ir

Archive of SID

A_{662}: میزان جذب در طول موج ۶۶۲ نانومتر
A_{645}: میزان جذب در طول موج ۶۴۵ نانومتر
A_{470}: میزان جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر
C_{x+c}: مقدار کاروتنوئید کل

برای بدست آوردن مقدار بتاکاروتن میزان جذب عصاره استونی در طول‌موج‌های ۶۶۳، ۶۴۵ و ۴۷۹ نانومتر قرائت و از فرمول زیر استفاده شد (Nagata, 2009).

$$\beta\text{-Carotene (mg/L)} = 0.854A_{sub}\,(479) - 0.312Asub\,(645) + 0.039Asub\,(663) - 0.005\ (r = 0.992,\ SE = 0.0096\ mg/L)$$

r: ضریب همبستگی بین مقدار پیش‌بینی شده و مقدار اندازه‌گیری شده
SE: خطای استاندارد

تهیه عصاره متانولی

برگ‌های برداشت‌شده در دمای اتاق و در سایه خشک شدند. برای اندازه‌گیری فنل کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی، اقدام به عصاره‌گیری از نمونه‌ها شد. برای این منظور یک گرم از هر نمونه گیاهی پودر و با استفاده از متانول ۸۰٪ (۲۰ میلی‌لیتر) به‌مدت نیم ساعت در دستگاه اولتراسونیک عصاره‌گیری گردید.

اندازه‌گیری میزان فنل کل (TPC)

میزان کل ترکیب‌های فنلی براساس روش رنگ‌سنجی فولین سیوکالتئو و استفاده از گالیک اسید به‌عنوان استاندارد تعیین شد. برای این منظور در هر لوله آزمایش ۲۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالتئو، ۱۶۰۰ میکرولیتر آب مقطر و ۱۰ میکرولیتر عصاره متانولی ریخته شد. بعد از گذشت ۸ دقیقه ۲۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۷٪ به آنها افزوده شد. نمونه‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس جذب آنها در طول موج ۷۶۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد و میزان ترکیب‌های فنلی برابر گالیک اسید در یک گرم نمونه خشک اندازه‌گیری گردید (Ebrahimzadeh *et al*., 2008).

اندازه‌گیری میزان فلاونوئید کل (TFC)

فلاونوئید کل عصاره برگ با استفاده از روش رنگ‌آمیزی آلومینیوم کلرید اندازه‌گیری شد. ۳ میلی‌لیتر عصاره با ۱۵۰ میکروگرم از سدیم نیترات ۵٪ مخلوط شد. بعد از ۵ دقیقه ۳ میلی‌لیتر از هگزاهیدرات آلومینیوم کلرید ۱۰٪ و بعد از ۵ دقیقه ۱ میلی لیتر NaOH یک مولار به مخلوط اضافه و با استفاده از آب مقطر دی‌یونیزه به حجم ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. بعد از ۳۰ دقیقه نگه‌داشتن در تاریکی و دمای اتاق، میزان جذب آنها در طول موج ۴۱۵ نانومتر با اسپکتروفتومتر قرائت شد. منحنی کالیبراسیون فلاونوئید با استفاده از غلظت‌های مختلف کوئرسیتین رسم و میزان ترکیب‌های فنلی گیاه برابر کوئرسیتین در یک گرم نمونه خشک اندازه‌گیری گردید (Agbo *et al*., 2015).

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد (DPPH)

۲ و ۲- دی فنیل-۱- پیکریل هیدرازین (DPPH) یک ترکیب رادیکالی آزاد پایدار با رنگ بنفش می‌باشد که با احیاء شدن توسط عناصر دهنده الکترون یا هیدروژن (ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی موجود در عصاره) به رنگ زرد تبدیل می‌شود. قدرت از دست دادن الکترون و پروتون عصاره‌های مختلف، با توجه به میزان بی‌رنگ شدن محلول بنفش رنگ DPPH در متانول سنجیده می‌شود. در ابتدا ۲ میلی‌لیتر از محلول ۰/۱ میلی‌مولار DPPH را در لوله‌ها ریخته و بعد ۱۵ میکرولیتر عصاره گیاهی به لوله‌ها اضافه گردید. نمونه‌ها ۳۰ دقیقه در تاریکی و دمای اتاق نگهداری و بعد جذب آنها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد. در نهایت درصد به دام‌اندازی رادیکال DPPH طبق فرمول زیر محاسبه شد (Burits & Bucar, 2000). به‌منظور برآورد دقیق فعالیت

www.SID.ir

Archive of SID

آنتی‌اکسیدانی از آسکوربیک اسید به‌عنوان استاندارد استفاده شد و فعالیت آنتی‌اکسیدانی به‌صورت میکروگرم آسکوربیک اسید در میلی‌لیتر بیان گردید.

درصد مهار = $(A_{control} - A_{sample}) / A_{control} \times 100$

$A_{control}$: جذب محلول بلانک در طول موج ۵۱۷ نانومتر

A_{sample}: جذب نمونه در طول موج ۵۱۷ نانومتر

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش احیاء یون آهن (III)، (FRAP)

برای اندازه گیری توان آنتی اکسیدانی احیاء آهن روش Benzie و Strain (۱۹۹۶) با کمی تغییرات مورد استفاده قرار گرفت. اصول این روش مبتنی بر کاهش کمپلکس فریک تری‌پیریدیل تری‌آزین، به فرم فروس در حضور آنتی اکسیدانی ها است. محلول فرپ تازه با افزودن ۳۰۰ میلی‌مولار بافر استات با اسیدیته ۳/۶ با ۲/۵ میلی‌لیتر از TPTZ ۱۰ میلی‌مولار که در ۴۰ میلی‌مولار Hcl و ۲۰ میلی‌مولار $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ حل شد تهیه گردید. ۳ میلی لیتر از محلول فرپ با ۳۰۰ میکرولیتر از هر نمونه مخلوط شد. پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۹ نانومتر اندازه گیری شد. برای رسم منحنی کالیبراسیون از محلول آبی $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ با غلظت‌های ۱۰۰۰-۱۰۰ میکرومول بر لیتر استفاده شد و درنهایت مقدار FRAP برحسب میلی‌مول سولفات آهن بر یک گرم نمونه خشک گیاه بیان گردید (Žugić *et al*., 2014).

آنالیز ترکیب‌های فنلی توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)

جداسازی، شناسایی و تعیین مقدار کمّی اسیدهای فنلی مورد مطالعه در این تحقیق با استفاده از دستگاه HPLC مدل سری ۱۱۰۰ ساخت کمپانی Agilent آمریکا، مجهز به یک لوپ تزریق به حجم ۲۰ میکرولیتر، پمپ گرادیان چهار حلالی، سیستم گاز زدا، آون ستون (تنظیم‌شده در ۲۵ درجه سانتی‌گراد) و آشکارساز آرایه دیودی که در طول‌موج‌های ۲۵۰، ۲۷۲ و ۳۱۰ نانومتر تنظیم‌شده انجام شد. جداسازی بر روی ستون اکتادسیل سیلان (به طول ۲۵ سانتی‌متر، قطر داخلی ۴/۶ میلی‌متر و اندازه ذرات ۵ میکرومتر) (ZORBAX Eclipse XDB) ساخت کمپانی Dr. Mainsch آلمان انجام شد. از نرم‌افزار Chemstation برای پردازش داده‌ها استفاده شد.

به‌منظور جداسازی بهتر ترکیب‌ها از برنامه شویش استفاده شد که برای این منظور ابتدا فاز متحرک با نسبت ۱۰٪ استونیتریل و ۹۰٪ محلول ۱٪ استیک اسید با فلوی یک میلی‌لیتر بر دقیقه شروع و طی ۵ دقیقه به نسبت ۲۵٪ استونیتریل و ۷۵٪ محلول ۱٪ استیک اسید با فلوی یک میلی‌لیتر بر دقیقه رسید. سپس در طی ۱۰ دقیقه به نسبت ۶۵٪ استونیتریل و ۳۵٪ محلول ۱٪ استیک اسید با فلوی یک میلی‌لیتر بر دقیقه رسید. زمان جداسازی ۱۵ دقیقه و حجم هر تزریق ۲۰ میکرولیتر بود (Seal, 2016).

نمونه‌های استاندارد گالیک اسید، کافئیک اسید، کلروژنیک اسید، روتین، کوئرسیتین، کوماریک اسید، سینامیک اسید و آپی‌ژنین در متانول خالص تهیه و برای رسم منحنی استاندارد در محدوده‌ای از غلظت‌های مناسب رقیق گردیده و بعد به دستگاه HPLC تزریق شدند.

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها

به‌منظور تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌های مربوط به صفات فیتوشیمیایی اندام برگ گل ماهور از طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار استفاده شد. برای تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها (با آزمون دانکن) از نرم‌افزار (ver, 16) SAS و برای آنالیز و محاسبه ضرایب همبستگی و تجزیه خوشه‌ای از نرم‌افزار Minitab استفاده شد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- تجزیه واریانس خصوصیات فیتوشیمیایی در اندام برگ گونه‌های مورد مطالعه گل ماهور

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات					
		کاروتنوئید کل	بتاکاروتن	فنل کل	فلاونوئید کل	فعالیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH)	فعالیت آنتی‌اکسیدانی (FRAP)
گونه	۸	۱۴۹۳/۹۹ **	۹/۲۷ **	۲۰۸/۵۴ **	۱۰/۰۰ **	۷۳۲/۷۰ **	۱۳/۰۶ **
خطا	۱۸	۰/۷۹	۰/۰۰۶	۱/۰۶	۰/۰۹	۱۰/۷۷	۰/۰۸
ضریب تغییرات (٪)		۲/۰۴	۲/۴۴	۶/۱۵	۹/۸۴	۵/۴۰	۶/۷۳

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج

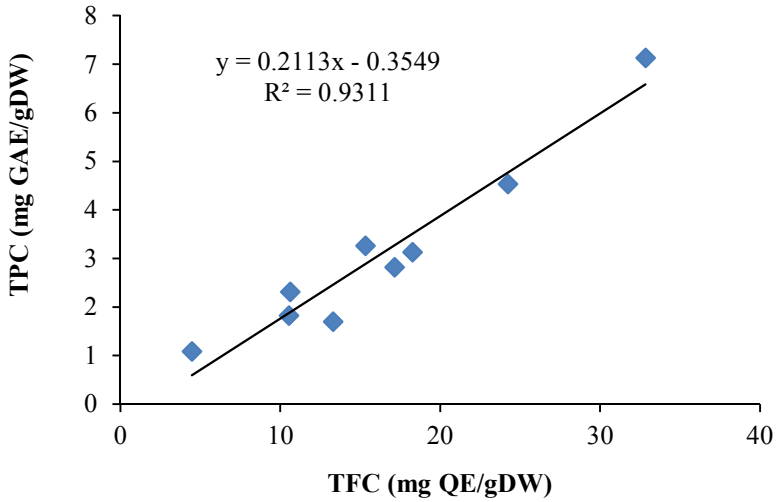
کاروتنوئید کل و بتاکاروتن

نتایج تجزیه واریانس نشان می‌دهد که بین برگ گونه‌های مختلف گل ماهور از نظر مقدار کاروتنوئید کل و بتاکاروتن اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ وجود دارد (جدول ۲). مقدار کاروتنوئید در اندام برگ گونه‌های مختلف گل ماهور بین ۱۷/۹ تا ۷۶/۲۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک و مقدار بتاکاروتن بین ۱/۳۶ تا ۵/۸۸ میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم وزن خشک متغیر بود. بیشترین مقدار کاروتنوئید کل و بتاکاروتن در برگ گونه *V. sinuatum* و کمترین مقدار آنها در برگ گونه *V. stachydiforme* مشاهده شد (جدول ۳).

جدول ۳- مقایسه میانگین مقادیر کاروتنوئید کل، بتاکاروتن، فنل کل و فلاونوئید کل در اندام برگ گونه‌های گل ماهور

گونه‌ها	کاروتنوئید کل (mg/g DW)	بتاکاروتن (mg/100 g DW)	فنل کل (mg GAE/g DW)	فلاونوئید کل (mg QE/g DW)
V. erianthum	۲۱/۵۶ g	۱/۷۱g	۱۰/۵۲ f	۱/۸۳ef
V. songaricum	۲۲/۳۲ g	۱/۷۴g	۱۸/۲۷ c	۳/۱۳c
V. speciosum	۳۱/۴۹ f	۲/۳۵f	۴/۴۸ g	۱/۰۸ f
V. szovitsianum	۶۱/۱۵ c	۴/۷۷c	۱۳/۲۹ e	۱/۷۰ef
V. stachydiforme	۱۷/۹۷ h	۱/۳۶h	۲۴/۲۳ b	۴/۵۳b
V. haussknechtianum	۳۶/۴۳ e	۲/۷۵e	۱۰/۶۲ f	۲/۳۱de
V. cheirantifolium	۵۳/۱۶d	۴/۱۱d	۱۷/۱۵ cd	۲/۸۲cd
V. sinuatum	۷۶/۲۷a	۵/۸۸a	۳۲/۸۳ a	۷/۱۳ a
V. saccatum	۷۰/۱۹b	۵/۶۲b	۱۵/۳۲ d	۳/۲۶c

حروف مشابه در مقابل میانگین‌ها در هر ستون نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۱٪ بین آنهاست (آزمون دانکن).



شکل ۱- همبستگی بین فنل و فلاونوئید کل در اندام برگ گونه‌های گل ماهور

www.SID.ir

Archive of SID

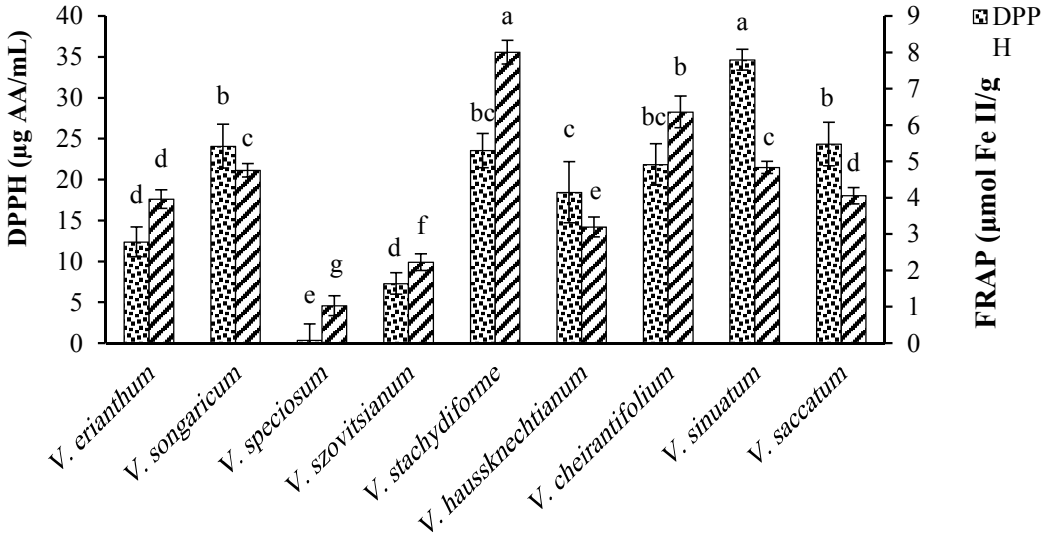
فنل کل و فلاونوئید کل

طبق نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲)، نوع گونه تأثیر معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ بر فنل کل و فلاونوئید کل دارد. بیشترین میزان فنل و فلاونوئید کل به‌ترتیب ۳۲/۸۳ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک و ۷/۱۳ میلی‌گرم کوئرسیتین بر گرم وزن خشک در برگ گونه *V. sinuatum* و کمترین میزان آنها به‌ترتیب ۴/۴۸ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک و ۱/۰۸ میلی‌گرم کوئرسیتن بر گرم وزن خشک در برگ گونه *V. speciosum* مشاهده شد (جدول ۳). شکل ۱ نشان می‌دهد که همبستگی خطی معنی‌داری (R^2= 0.931) بین فنل کل و فلاونوئید کل وجود دارد، بنابراین گونه‌های دارای فنل کل بیشتر از میزان فلاونوئید کل بیشتری نیز برخوردار بوده‌اند.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

نتایج تجزیه واریانس نشان می‌دهد که نوع گونه مورد مطالعه، سبب ایجاد تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ در میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی به هر دو روش شده است (جدول ۲). براساس نتایج مقایسه میانگین‌ها (شکل ۲)، بیشترین (۳۴/۶۶ µg AA/mL) و کمترین (۰/۳۶ µg AA/mL) میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH به‌ترتیب در برگ گونه‌های *V. sinuatum* و *V. speciosum* مشاهده شد. براساس روش FRAP نیز بیشترین مقدار فعالیت آنتی‌اکسیدانی به گونه *V. stachydiforme* (۸ µmol Fe (II)/ gDW) و کمترین مقدار فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز به گونه *V. speciosum* (۱/۰۳ µmol Fe (II)/ gDW) مربوط بود. بررسی ارتباط بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی اندازه‌گیری شده به دو روش نشان می‌دهد که همبستگی مثبتی (R^2= 0.48) بین دو روش DPPH و FARP وجود دارد (شکل ۳).

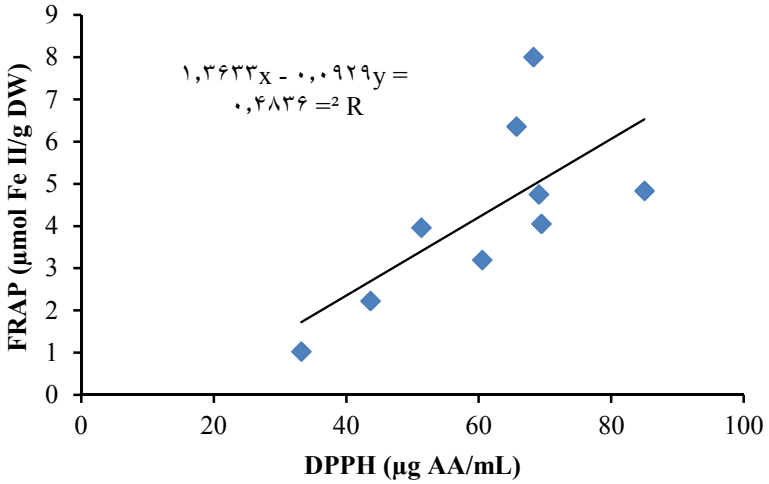
همچنین همبستگی مثبت و معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ بین فنل کل و فلاونوئید کل با ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH و بین فنل کل با فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش FRAP وجود داشت (جدول ۴).



شکل ۲- مقایسه میانگین فعالیت آنتی‌اکسیدانی به دو روش FRAP و DPPH در اندام برگ گونه‌های مورد مطالعه گل ماهور

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳- همبستگی بین دو روش اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی (**FRAP** و **DPPH**)

جدول ۴- همبستگی بین فنل کل و فلاونوئید کل با فعالیت آنتی‌اکسیدانی در اندام برگ گونه‌های گل ماهور

	FRAP	DPPH
TPC	۰/۶۷۷ **	۰/۸۶۹**
TFC	۰/۵۷۹	۰/۸۷۸ **

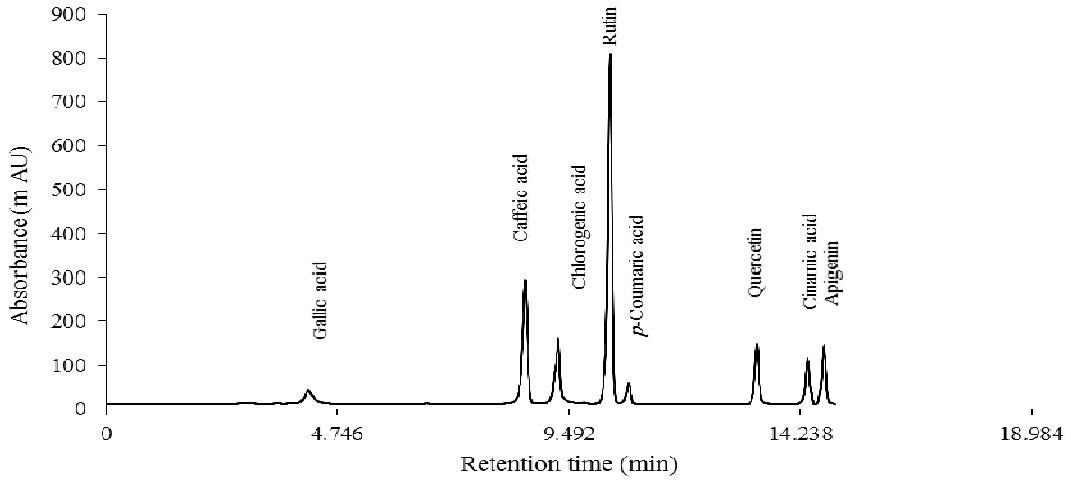
**: همبستگی معنی‌دار در سطح ۱٪

آنالیز HPLC ترکیب‌های فنلی

مقدار هشت ترکیب فنولیک شامل: گالیک اسید، کافئیک اسید، کلروژنیک اسید، روتین، پی-کوماریک اسید، کوئرسیتین، سینامیک اسید و آپی‌ژنین به‌صورت همزمان با HPLC اندازه‌گیری شدند. شکل ۴ کروماتوگرام استاندارد ترکیب‌های ذکرشده را نشان می‌دهد. نتایج بدست‌آمده نشان می‌دهد که بین گونه‌های مختلف از نظر نوع و مقدار ترکیب‌های فنلی تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ وجود دارد (جدول ۵). برگ گونه‌های *V. songaricum*، *V. saccatum* و *V. sinuatum* فاقد آپی‌ژنین بود. از بین ۸ ترکیب مورد بررسی کلروژنیک اسید با بازه ۶/۹۴ تا ۴۲۵/۳۲ میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم ماده خشک ترکیب غالب اندام برگ بیشتر گونه‌ها بود و گالیک اسید (۱/۴۲ تا ۶/۰۲ میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم ماده خشک) و کافئیک اسید (۰/۸۲ تا ۱/۷۴ میلی‌گرم بر صد گرم ماده خشک) کمترین ترکیب‌های موجود در برگ این گونه‌ها بودند. در این تحقیق دو گونه *V. erianthum* و *V. saccatum* بالاترین مقدار ترکیب‌های فنلی اندازه‌گیری شده را داشتند، به‌طوری که بالاترین میزان کلروژنیک اسید، کوئرسیتین، سینامیک اسید و آپی‌ژنین در برگ گونه *V. erianthum* مشاهده شد. برگ گونه *V. saccatum* دارای بالاترین مقدار ترکیب‌های گالیک اسید و کافئیک اسید بود. به‌طوری که بالاترین مقدار روتین (۹۷/۶۱ میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم ماده خشک) و پی‌کوماریک اسید (۳۲/۹۶ میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم ماده خشک) به‌ترتیب در گونه‌های *V. sinuatum* و *V. speciosum* اندازه‌گیری شدند (جدول ۶).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۴- کروماتوگرام مخلوط استاندارد ترکیب‌های فنلی در اندام برگ گونه‌های گل ماهور

تجزیه خوشه‌ای

دسته‌بندی گونه‌های مورد مطالعه به روش Ward و براساس ترکیب‌های مورد اندازه‌گیری در اندام برگ در دو خوشه رسم شد (شکل ۵). در خوشه الف، گونه‌ها براساس TPC، TFC، ترکیب‌های فنلی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی اندام برگ به دو گروه اصلی و چهار گروه فرعی تقسیم‌بندی شدند. در گروه اول گونه *V. erianthum* به‌صورت منفرد در یک گروه جداگانه قرار گرفت. این گونه بالاترین ترکیب‌های فنلی شناسایی شده مانند کلروژنیک اسید، کوئرسیتین، سینامیک اسید و آپی‌ژنین را به خود اختصاص داد. در گروه دوم گونه‌های *V. songaricum*، *V. cheirantifolium*، *V. sinuatum*، *V. szovitsianum* و *V. haussknechtianum* با مقدار متوسطی از ترکیب‌های فنلی، فنل کل و TPC قرار گرفتند. *V. saccatum* و *V. sinuatum* با بیشترین مقدار ترکیب‌های فنلی، فنل کل و فلاونوئید کل در گروه سوم قرار گرفتند. *V. speciosum* با کمترین مقدار فنل کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در گروه چهارم قرار گرفت. در خوشه ب نیز گونه‌ها براساس مقدار کاروتنوئید کل و بتاکاروتن به دو گروه اصلی دسته‌بندی شدند. در گروه اول گونه‌های *V. erianthum*، *V. songaricum*، *V. stachydiforme*، *V. speciosum* و *V. haussknechtianum* قرارگرفتند. این گونه‌ها در مقایسه با سایر گونه‌ها دارای مقادیر کمتری از کاروتنوئید کل و بتاکاروتن بودند. در گروه دوم نیز گونه‌های *V. saccatum*، *V. sinuatum*، *V. szovitsianum* و *V. cheirantifolium* که از بیشترین مقدار کاروتنوئید و بتاکاروتن برخوردار بودند قرار گرفتند.

بحث

پایه و اساس تحقیقات به‌نژادی در گیاهان بر وجود تنوع ژنتیکی استوار است و در واقع بدون دسترسی به چنین تنوعی به‌نژادگر موفقیت چندانی برای ایجاد و معرفی ارقام جدید نخواهد داشت. بهبود ارقام اصلاح شده برای افزایش بهره‌وری آنها نیازمند شناخت دقیق تنوع موجود در بین ژرم‌پلاسم گونه و کاربرد آن در پروژه‌های اصلاحی می‌باشد (He *et al.*, 1992؛ Bernath, 2002). نتایج این تحقیق نشان داد که تنوع قابل توجهی از نظر مقدار کاروتنوئید و بتاکاروتن در بین ۹ گونه مورد مطالعه گل ماهور وجود دارد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۵- تجزیه واریانس ترکیب‌های فنلی در اندام برگ گونه‌های گل ماهور

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات						
		گالیک اسید	کافئیک اسید	کلروژنیک اسید	روتین	پی‌کوماریک اسید	کوئرسیتین	سینامیک اسید	آپی‌ژنین
گونه	۸	۵/۳۶ **	۰/۲۱ **	۵۳۳۵۳/۸۷ **	۳۷۶۷/۲۷ **	۳۱۹/۵۸ **	۱۸۰/۵۱ **	۷۱۳۸/۲۱ **	۱۴۷۰۹/۶۷ **
خطا	۱۸	۰/۰۰۱	۰/۰۰	۰/۲۵	۰/۰۲	۰/۰۶	۰/۰۴	۰/۰۴	۰/۰۸
ضریب تغییرات (٪)		۱/۰۴	۱/۹۵	۰/۶۱	۰/۴۹	۱/۸۲	۱/۷۱	۰/۵۴	۰/۵۲

**: معنی‌دار در سطح ۱٪

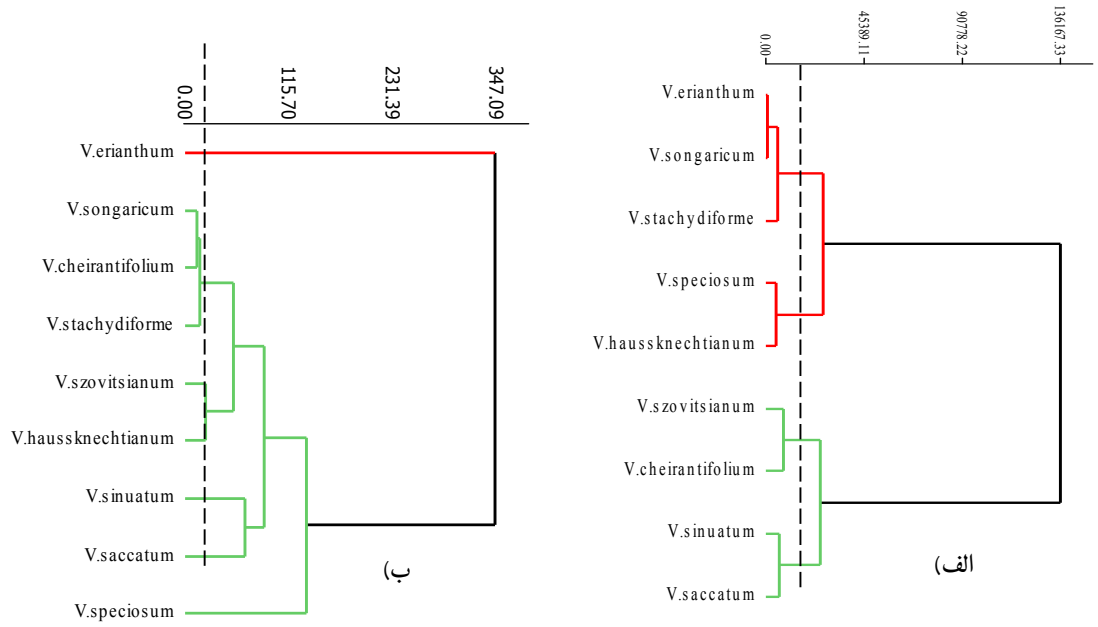
جدول ۶- مقادیر ترکیب‌های فنلی در اندام برگ گونه‌های گل ماهور

گونه	گالیک اسید (mg/ 100 gDW)	کافئیک اسید (mg/ 100 gDW)	کلروژنیک اسید (mg/ 100 gDW)	روتین (mg/ 100 gDW)	پی‌کوماریک اسید (mg/ 100 gDW)	کوئرسیتین (mg/ 100 gDW)	سینامیک اسید (mg/ 100 gDW)	آپی‌ژنین (mg/ 100 gDW)
زمان بازداری (دقیقه)	۴/۱	۸/۶	۹/۱	۱۰/۳	۱۰/۷	۱۳/۳	۱۴/۳	۱۴/۵۶
V. erianthum	۳/۹۸ b	۱/۰۴ g	۴۲۵/۳۲ a	۴۲/۳۴ c	۲۹/۳۸ b	۲۳/۸۰ a	۱۳۹/۴۶ a	۱۹۹/۱۹ a
V. songaricum	۳/۴۶ c	۱/۱۰ f	۴۷/۸۹ c	۶/۱۶ h	۱۱/۲۳ d	۵/۸۴ g	۱۹/۵۶ e	Nd
V. speciosum	۲/۶۳ e	۱/۴۵ b	۱۲۶/۴۳ b	۸۱/۸۴ b	۳۲/۹۶ a	۲۰/۷۳ c	۳۱/۱۴ c	۱۳۷/۶۴ b
V. szovitsianum	۲/۰۸ g	۱/۳۸ c	۱۲/۸۵ g	۰/۰۶ i	۵/۹۴ g	۵/۵۰ g	۲۲/۹۷ d	۶۴/۶۵ c
V. stachydiforme	۲/۶۶ e	۱/۱۷ e	۲۶/۴۸ e	۱۰/۶۵ f	۱۰/۷۵ e	۷/۴۹ e	۱۰/۷۲ g	۲۰/۲۲ e
V. haussknechtianum	۲/۸۸ d	۱/۳۸ c	۲۷/۸۰ d	۱۱/۳۰ e	۱۴/۶۱ c	۶/۶۶ f	۱۷/۹۴ f	۴۹/۲۴ d
V. cheirantifolium	۲/۳۴ f	۱/۲۶ d	۴۸/۶۲ c	۷/۹۴ g	۹/۰۹۰ f	۷/۰۰ ef	۸/۶۷ h	۲۰/۳۷ e
V. sinuatum	۱/۴۲ h	۰/۸۲ h	۶/۹۴ h	۹۷/۶۱ a	۴/۶۶ h	۱۲/۶۰ d	۶/۷۴ i	Nd
V. saccatum	۶/۰۲ a	۱/۷۴ a	۲۰/۹۶ f	۳۱/۸۱ d	۶/۲۲ g	۲۲/۶۶ b	۱۱۰/۲۲ b	Nd

nd= not detected، حروف مشابه در مقابل میانگین‌ها در هر ستون نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۱٪ بین آنهاست (آزمون دانکن).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۵- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای اندام برگ ۹ گونه گل ماهور؛ الف) براساس ترکیب‌های فنلی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، TPC و TFC. ب) براساس مقدار کاروتنوئید کل و بتاکاروتن

به‌طوری که بیشترین مقدار کاروتنوئید کل و بتاکاروتن در برگ گونه *V. sinuatum* و کمترین مقدار آنها در برگ گونه *V. stachydiforme* مشاهده شد. البته تاکنون مطالعات زیادی روی میزان ترکیب‌های کاروتنوئیدی و بتاکاروتن برگ گل ماهور انجام نشده است. Ghasemi و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که بین ژنوتیپ‌های مختلف ریواس از نظر مقدار کاروتنوئید اختلاف معنی‌داری وجود دارد.

در این تحقیق میزان فنل کل در اندام برگ گونه‌های مختلف گل ماهور بین ۷/۱۳ تا ۳۲/۸۳ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک و مقدار فلاونوئید کل نیز بین ۱/۰۸ تا ۷/۱۳ میلی‌گرم کوئرسیتین بر گرم وزن خشک متغیر بود. در تحقیقی مقدار فنل کل در اندام برگ اکوتیپ‌های مختلف *V. songaricum* بین ۱۰۷/۷۱ تا ۱۹۲/۹۲ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک متغیر بود. نتایج این تحقیق نشان داد که میزان فنل کل نمونه‌ها تحت تأثیر شرایط اقلیمی محل رویش بود (Safi *et al.*, 2016). Karamian و Ghasemlou (۲۰۱۳) با مقایسه ترکیب‌های فنولیک در اندام برگ سه گونه *V. sinuatum*، *V. speciosum* و *V. nudicaule* جمع‌آوری شده از اطراف همدان نشان دادند که بیشترین مقدار فنل کل (۱۱۸/۲ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک) در گونه *V. sinuatum* و بیشترین مقدار فلاونوئید کل (۵/۷ میلی‌گرم کوئرسیتین بر گرم وزن خشک) در اندام برگ گونه *V. speciosum* مشاهده شد. همچنین در تحقیق مشابه انجام شده توسط Amini و همکاران (۲۰۱۸)، میزان فنل کل اندام گل در گونه‌های مورد مطالعه خرگوشک از ۷/۴۴ (در گونه *V. erianthum*) تا ۲۱/۸۹ (در گونه *V. saccatum*) میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک متغیر بود. محتوی پلی‌فنل‌ها در گیاهان به عوامل مختلفی ازجمله واریته، نوع اندام، مرحله فیزیولوژیکی و شرایط آب و هوایی منطقه بستگی دارد (Carvalho *et al.*, 2015). آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی بیشتر در گیاهانی می‌باشند که حاوی ترکیب‌های

www.SID.ir

Archive of SID

فنلی هستند. محتوی فنلی و ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی گیاه به فاکتورهای ژنتیکی و محیطی وابسته می‌باشند. ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی به فراوانی در گیاهان وجود دارند که شناسایی تک تک آنها کاری دشوار است. بنابراین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با سنجش‌های متعدد ارزیابی می‌شود. آزمون DPPH از قدیمی‌ترین روش‌های سنجش غیرمستقیم خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد که برای یافتن ترکیب‌های هیدروژن‌دهنده در مواد طبیعی پیشنهاد شده است. آزمون DPPH براساس واکنش رادیکال آزاد پایدار DPPH با ترکیب‌های دهنده هیدروژن مانند فنل‌ها استوار است. DPPH با ترکیب‌هایی که حاوی گروه هیدروکسیل می‌باشند واکنش می‌دهد. در حالی‌که با فلاونوئیدهایی که در حلقه B خود گروه هیدروکسیل ندارند و اسیدهای آروماتیک که تنها یک گروه هیدروکسیل دارند واکنش نمی‌دهد (Khalighi-Sigaroodi *et al*., 2013). Safi و همکاران (۲۰۱۶) ۱۰ اکوتیپ مختلف *V. songaricum* را مورد مطالعه قرار دادند و گزارش نمودند که بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی براساس روش DPPH مربوط به اکوتیپ منطقه اردل بود (۳۱/۰۹؛ IC_{50} میکروگرم بر میلی‌لیتر) که با سایر اکوتیپ‌های گل ماهور تفاوت معنی‌داری داشت. در تحقیقی میزان فنل کل و فلاونوئید کل عصاره متانولی اندام هوایی *V. speciosum* به‌ترتیب ۸۲ mg GAE/g DW و ۳۰ mg RE/g DW و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن IC_{50}:۳۲/۳۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود (Nofouzi, 2015).

آزمون FRAP بر پایه توانایی ترکیب‌های فنلی در احیای Fe^{3+} به Fe^{2+} استوار می‌باشد. ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی ردیابی شده به‌وسیله FRAP محدود به ترکیب‌های محلول در آب (همچنین ترکیب‌های محلول در حلال‌های هیدروالکلی) می‌باشند. به‌عنوان مثال کاروتنوئیدها را که قابلیت احیای یون فریک را ندارند دربرنمی‌گیرند. همچنین جذب برخی ترکیب‌ها مانند کافئیک اسید، فرولیک اسید، کوئرسیتین و تانیک اسید در زمان‌های کوتاه اندازه‌گیری تثبیت نمی‌شوند و به آهستگی و با گذشت چند ساعت از زمان واکنش افزایش می‌یابند (Khalighi-Sigaroodi *et al*., 2013). آنالیز HPLC ترکیب‌های فنولیک در اندام برگ گونه‌های مختلف گل ماهور نشان داد که نوع گونه و شرایط محیطی تأثیر زیادی در ساخت ترکیب‌های فنلی دارند که با نتایج سایر محققان مطابقت دارد (Kharazian & Rahiminejad, 2009؛ Zhelev *et al*., 2013؛ Tohma *et al*., 2016).

تحقیقات نشان می‌دهد که عوامل محیطی و ژنتیکی تولید متابولیت‌های ثانویه را در گیاه تحت تأثیر قرار می‌دهند که به‌نظر می‌رسد تأثیر عوامل ژنتیکی قوی‌تر از عوامل محیطی باشد (Martz *et al*., 2010). Grigore و همکاران (۲۰۱۳)، هشت ترکیب فنولی ازجمله کلروژنیک اسید (۱۲/۳۴ mg/g DW)، کافئیک اسید (۳۹/۹۶ mg/g DW)، رزمارینیک اسید (۱۴/۹۳ mg/g DW)، کوئرسیتین (۱۷/۲۹ mg/g DW) و آپی‌ژنین (۰/۳۵ mg/g DW) را در *V. phlomoides* شناسایی کردند. تفاوت در مقدار ترکیب های فنولی در این تحقیق در مقایسه با تحقیق حاضر می‌تواند ناشی از تفاوت در گونه‌ها، شرایط محیطی و روش آنالیز HPLC باشد.

Selseleh و همکاران (۲۰۱۹) نیز جمعیت‌های مختلف *V. songaricum* را از مناطق مختلف ایران جمع‌آوری و مورد آنالیز قرار دادند. در این تحقیق ترکیب‌های فنلی روتین (۲/۱۶–۲۶/۵۳ mg/g DW)، کوئرسیتین (۰/۲–۱۴/۶۹ mg/g DW)، رزمارینیک اسید (۰۶/۰۱– ۱/۱۴ mg/g DW)، سالیسیلیک اسید (۲/۳–۴۵/۳۷ mg/g DW)، فرولیک اسید (۰/۵–۱۹/۳۵ mg/g DW)، پارا- کوماریک اسید (۰/۲–۱/۷۱ mg/g DW)، ۵،۲- دی‌هیدروکسی بنزوئیک اسید (۵/۷۳– mg/g DW ۰/۱)، ۴،۳- دی‌هیدروکسی بنزوئیک اسید (۵۸/۴۵– mg/g DW ۰/۹) و هارپاگوزید (۰/۳۲– mg/g DW ۰) در جمعیت‌های مختلف *V. songaricum* شناسایی شدند.

در تحقیقی که Nowak و Gawlik-Dziki (۲۰۰۷) بر روی اندازه‌گیری کمّی و کیفی ترکیب‌های فنلی و فلاونوئیدی در برگ گونه‌های رز انجام دادند، گزارش نمودند که مقدار

www.SID.ir

Archive of SID

فلاونوئید کوئرسیتین در گونه‌های مختلف رز بین ۳/۶۸ تا ۱۵/۸۱ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک متغیر بود. در گونه‌های مورد مطالعه گل ماهور در این تحقیق میزان کوئرسیتین بین ۵/۵۰ تا ۲۳/۸۰ میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم وزن خشک بود که در مقایسه با گونه‌های رز دارای مقدار کمتری از این ترکیب بودند. فلاونوئید روتین با وجود مقدار بالای آن در اندام گل همیشه‌بهار (۳۴/۳۳ میلی‌گرم در گرم وزن خشک) در اندام برگ آن گزارش نشد (Rigane *et al*., 2013). در این تحقیق در اندام برگ گونه‌های مورد مطالعه گل ماهور مقدار فلاونوئید روتین بین ۰/۰۶ تا ۹۷/۶۱ میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم وزن خشک گیاه متغیر بود که در مقایسه با اندام برگ گل همیشه‌بهار غنی‌تر می‌باشد. تحقیقی که Sytar و همکاران (۲۰۱۶) در بررسی و آنالیز ترکیب‌های فنلی برگ ۲۶ گیاه دارویی (شامل خانواده‌های نعناعیان، کاسنی و گلسرخیان) انجام دادند مقدار کلروژنیک اسید در این گیاهان بین ۰/۱۸۷ تا ۰/۲۲۹ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک گیاه متغیر بود. همچنین در این تحقیق بیشترین مقدار سینامیک اسید (۰/۴۷۵ میلی‌گرم در گرم وزن خشک) در برگ گونه *Mentha suaveolens* مشاهده شد. در حالی‌که در این تحقیق مقدار کلروژنیک اسید در برگ گونه‌های مورد مطالعه گل ماهور بین ۶/۹۴ تا ۴۲۵/۳۲ میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم وزن خشک گیاه متغیر بود. در نتیجه، این تحقیق قابلیت خوب گونه‌های گل ماهور را برای تولید کلروژنیک اسید در مقایسه با سایر گیاهان دارویی نشان می‌دهد. در این پژوهش برگ گونه *V. erianthum* بیشترین مقدار سینامیک اسید (۱۳۹/۴۶ میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم وزن خشک) را داشت، به‌طوری که در مقایسه با سایر گیاهان دارویی در تحقیق Sytar و همکاران (۲۰۱۶) مقدار بالاتری از این ترکیب را دارد.

همان‌طور که نتایج نشان داد همبستگی بالایی بین میزان ترکیب‌های فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی برگ‌های گونه‌های مختلف گل ماهور وجود دارد که با نتایج سایر پژوهشگران در مورد ریحان (Javanmardi *et al*., 2003) و ولیک (Alirezalu *et al*., 2015) مطابقت دارد. از همبستگی بین فنل کل و فلاونوئید کل با فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌توان نتیجه گرفت که افزایش مقدار فنل کل و فلاونوئید کل به‌طور مستقیم میزان توانایی گونه‌های مختلف را در مهار رادیکال‌های آزاد افزایش می‌دهد. در غلظت‌های بالاتر ترکیب‌های فنلی، به دلیل افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل حلقه‌های آروماتیک ترکیب‌های فنلی در محیط واکنش، احتمال دادن هیدروژن به رادیکال‌های آزاد و به‌دنبال آن قدرت مهارکنندگی افزایش می‌یابد. توانایی و قدرت مهارکنندگی فنل‌ها به‌دلیل گروه‌های هیدروکسیل در مولکول‌های آنهاست. در بین ترکیب‌های فنلی، فلاونوئیدها آنتی‌اکسیدان‌های قوی‌تری محسوب می‌شوند. فلاونوئیدها بازدارنده‌های قوی رادیکال‌های هیدروکسیل و پراکسید هستند (Peksel *et al*., 2010).

یافته‌های این تحقیق نشان داد که تنوع ژنتیکی قابل توجهی از نظر ویژگی‌های فیتوشیمیایی در اندام برگ گونه‌های گل ماهور موجود در استان آذربایجان‌غربی وجود دارد که می‌تواند در فرایند اهلی‌سازی و برنامه‌های به‌نژادی این جنس مورد توجه و استفاده قرار گیرد. در بین گونه‌های مورد مطالعه در این تحقیق، گونه *V. sinuatum* به‌دلیل دارا بودن مقادیر بالای کاروتنوئید کل، بتاکاروتن، فنل، فلاونوئید کل و نیز فعالیت آنتی‌اکسیدانی و گونه‌های *V. erianthum* و *V. saccatum* به‌دلیل برخورداری از بالاترین سطح ترکیب‌های فنلی، دارای خصوصیات فیتوشیمیایی منحصر به‌فردی بودند که می‌توان از آنها برای طراحی برنامه‌های اصلاحی و نیز بهره‌برداری در صنایع داروسازی استفاده نمود.

منابع مورد استفاده

- Agbo, M.O., Uzor, P.F., Nneji, U.N.A., Odurukwe, C.U.E., Ogbatue, U.B. and Mbaoji, E.C., 2015. Antioxidant, total phenolic and flavonoid content of selected Nigerian medicinal plants. Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences, 14(1): 35-41.
- Alirezalu, A., Ahmadi, N., Salehi, P., Sonboli, A., Ayyari, M. and Hatami-Maleki, H., 2015. Antioxidant capacity in different organs of

www.SID.ir

Archive of SID

Verbascum L. species. Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology, 6(2): 63-75.
- Karamian, R. and Ghasemlou, F., 2013. Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities of three *Verbascum* species from Iran. Journal of Medicinal Plants and By-Products, 2(1): 43-51.
- Kheiri, S., 2009. Identification of breeding system of some species of *Verbascum* (Scrophulariaceae) in north-west of Iran on the basis of the ratio of pollen to ovule number. Journal of Biology, Islamic Azad University, 4(2): 67-74.
- Khalighi-Sigaroodi, F., Ahvazi, M., Ebrahimzadeh, H., Rahimifard, N., 2013 Chemical composition of the essential oil and antioxidant activities, total phenol and flavonoid content of the extract of *Nepeta pogonosperma*. Journal of Medicinal Plants, 4 (48):185-198.
- Kharazian, N. and Rahiminejad, M., 2009. Study of phenolic constituents of *Triticum* L. (Poaceae) species in Iran. Iranian Journal of Science and Technology, 33(4): 309-315.
- Kumar, G.P., Kumar, R., Badere, R. and Singh, S.B., 2011. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extracts from trans himalayan medicinal plants. European Pharmacognosy Journal, 17(2): 66-69.
- Lichtenthaler, H.K., 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in Enzymology, 148: 350-382.
- Martz, F., Jaakola, L., Julkunen-Tiitto, R. and Stark, S., 2010. Phenolic composition and antioxidant capacity of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) leaves in Northern Europe following foliar development and along environmental gradients. Journal of Chemical Ecology, 39(9): 1017-1028.
- Mihailović, V., Kreft, S., Benković, E.T., Ivanović, N. and Stanković, M.S., 2016. Chemical profile, antioxidant activity and stability in stimulated gastrointestinal tract model system of three *Verbascum* species. Industrial Crops and Products, 89: 141-151.
- Nagata, M., 2009. A simple spectrophotometric method for the estimation of β-carotene content in spinach acetone extracts. Bulletin of the National Institute of Vegetable and Tea Science, 8: 1-5.
- Nofouzi, K., 2015. Study on the antioxidant activity and in vitro antifungal activity of *Verbascum speciosum* methanolic extract. Journal of Mycology Research, 2(2): 97-103.
- Nowak, R. and Gawlik-Dziki, U., 2007. Polyphenols of Rosa L. leaves extracts and their radical scavenging activity. Zeitschrift für Naturforschung, Hawthorn various species (*Crataegus* spp.). Journal of Food Research, 25(2): 325-338.
- Amini, S., Hassani, A., Alirezalu, A. and Maleki, R., 2018. Investigation of genetic diversity among *Verbascum* species in West Azerbaijan province by morphological and phytochemical markers. Journal of Plant Production Research, 24(3): 123-142.
- Armatu, A., Bodirlau, R., Nechita, C., Niculaua, M., Teaca, C., Ichim, M. and Spiridon, I., 2011. Characterization of biological active compounds from *Verbascum phlomoides* by chromatography techniques. I. Gas chromatography. Romanian Biotechnological Letters, 16(4): 6297-6304.
- Benzie, I.F. and Strain, J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Analytical Biochemistry, 239(1): 70-76.
- Bernath, J., 2002. Strategies and recent achievements in selection of medicinal and aromatic plants. Acta Horticulturae, 576: 115-128.
- Burits, M. and Bucar, F., 2000. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. Phytotherapy Research, 14(5): 323-328.
- Carvalho, L., Carvalho, J., Faustino, R., Kaser, I., Lima, V. and Sousa, D., 2015. Variability of total carotenoids in *C. moschata* genotypes. Chemical Engineering Transactions, 44: 247-252.
- Ebrahimzadeh, M., Hosseinimehr, S., Hamidinia, A. and Jafari, M., 2008. Antioxidant and free radical scavenging activity of *Feijoa sallowiana* fruits peel and leaves. Pharmacologyonline, 1: 7-14.
- Ghasemi, G., Fattahi, M. and Alirezalu, A., 2017. Evaluation of diversity in some phytochemical characteristics among flower extract of wild-growing populations of *Rheum ribes* L. in Iran. Eco-Phytochemical Journal of Medicinal Plants, 4(4): 49-61.
- Grigore, A., Colceru-Mihul, S., Litescu, S., Panteli, M. and Rasit, I., 2013. Correlation between polyphenol content and anti-inflammatory activity of *Verbascum phlomoides* (Mullein). Pharmaceutical Biology, 51(7): 925-929.
- He, S., Ohm, H. and Mackenize, S., 1992. Detection of DNA sequence polymorphisms among wheat varieties. Theoretical and Applied Genetics, 84: 573-578.
- Javanmardi, J., Stushnoff, C., Locke, E. and Vivanco, J., 2003. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum accessions*. Food Chemistry, 83(4): 547-550.
- Kahraman, C., Akdemir, Z.S. and Tatlı, I.I., 2010. Promising cytotoxic activity profile, biological activities and phytochemical screening of

www.SID.ir

Archive of SID

- Selseleh, M., Hadian, J., Nejad Ebrahimi, S., Sonboli, A., Georgiev, M.I. and Mirjalili, M.H., 2019. Metabolic diversity and genetic association between wild populations of *Verbascum songaricum* (Scrophulariaceae). Industrial Crops and Products, 137: 112-125.
- Sytar, O., Hemmerich, I., Zivcak, M., Rauh, C. and Brestic, M., 2016. Comparative analysis of bioactive phenolic compounds composition from 26 medicinal plants. Saudi Journal of Biological Sciences, 25: 631-641.
- Tatli, I. and Akdemir, Z., 2004. Chemical constituents of *Verbascum* L. species. Fabad Journal of Pharmaceutical Sciences, 29: 93-107.
- Tohma, H., Köksal, E., Kılıç, Ö., Alan, Y., Yılmaz, M.A., Gülçin, I., Bursal, E. and Alwasel, S.H., 2016. RP-HPLC/MS/MS analysis of the phenolic compounds, Antioxidant and antimicrobial activities of *Salvia* L. species. Antioxidants, 5(4): 38.
- Turke, A.U. and Gurel, E., 2005. *Common mullein* (*Verbascum thapsus* L.): recent advances in research. Phytotherapy Research, 19(9): 733-739.
- Zhelev, I., Dimitrova-Dyulgerova, I., Belkinova, D. and Mladenov, R., 2013. Content of phenolic compounds in the genus *Carduus* L. from Bulgaria. Ecologia Balkanica, 5(2): 14-20.
- Žugić, A., Đorđević, S., Arsić, I., Marković, G., Živković, J., Jovanović, S. and Tadić, V., 2014. Antioxidant activity and phenolic compounds in 10 selected herbs from Vrujci Spa, Serbia. Industrial Crops and Products, 52: 519-527.
62(1-2): 32-38.
- Peksel, A., Arisan-Atac, I. and Yanardag, R., 2010. Evaluation of antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of the extracts of *Pistacia atlantica* Desf. Leaves. Journal of Food Biochemistry, 34(3): 451-476.
- Riaz, M., Zia-Ul-Haq, M. and Jaafar, H.Z., 2013. *Common mullein*, pharmacological and chemical aspects. Revista Brasileira de Farmacognosia, 23(6): 948-959.
- Rigane, G., Ben, Y., Ghazghazi, H. and Ben, S., 2013. Investigation into the biological activities and chemical composition of *Calendula officinalis* L. growing in Tunisia. International Food Research Journal, 20(6): 3001-3007.
- Saboura, A., Ahmadi, A., Zeynali, A. and Parsa, M., 2014. Comparison between the contents of phenolic and flavonoid compounds and aerial part antioxidant activity in *Scutellaria pinnatifida* in two North Iranian populations. Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences, 13(3): 249-266.
- Safi, Z., Saeidi, K., Lorigooini, Z. and Shirmardi, H.A., 2016. Evaluation of total phenols and antioxidant activity of Mullein (*Verbascum songaricum*) ecotypes. Journal of Shahrekord Uuniversity of Medical Sciences, 17(6): 68-75.
- Seal, T., 2016. Quantitative HPLC analysis of phenolic acids, flavonoids and ascorbic acid in four different solvent extracts of two wild edible leaves, *Sonchus arvensis* and *Oenanthe linearis* of North-Eastern region in India. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 6(02): 157-166.

www.SID.ir

Archive of SID

Evaluation of phenolic compounds and antioxidant activity in leaves of different different *Verbascum* L. species in West Azerbaijan province

S. Amini[1], A. Hassani[2*], A. Alirezalu[3] and R. Maleki[4]

1- Ph.D. student, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
2*- Corresponding author, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
E-mail: a.hassani@urmia.ac.ir
3- Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
4- Research Department of Chromatography, Iranian Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Urmia, Iran

Received: October 2019 Revised: June 2020 Accepted: June 2020

Abstract

Mullein (*Verbascum* L.) is a biennial herbaceous medicinal plant belonging to the Scrophulariaceae family. The flowers of this plant are used to treat respiratory disorders. In this study, the genetic diversity of different mullein species from different regions of West Azerbaijan province was investigated based on some phytochemical markers to domesticate this valuable plant. Phytochemical diversity among different species of mullein was evaluated based on the content of carotenoid, beta-carotene, total phenol, total flavonoid, and antioxidant activity (by FRAP and DPPH methods), and identification of phenolic compounds (gallic acid, caffeic acid, chlorogenic acid, rutin, coumaric acid, quercetin, cinnamic acid, and apigenin) by HPLC in leaf. The results showed that all phytochemical characteristics studied were significantly different among species (P<0.01). The highest content of carotenoid (76.27 mg g^{-1} DW), beta-carotene (5.88 mg $100g^{-1}$ DW), total phenol (32.83 mg GAE g^{-1} DW), total flavonoid (7.13 mg QE g^{-1} DW) and antioxidant activity by DPPH method (34.66 µg AA mL^{-1}) was observed in *V. sinuatum*. The results showed that *V. erianthum* leaves had the highest content of chlorogenic acid, quercetin, cinnamic acid, and apigenin, while the highest content of gallic acid and caffeic acid was observed in *V. saccatum*. In general, the findings of this research showed that there was a wide variation of mullein species in West Azerbaijan province. Species *V. erianthum* and *V. saccatum* had unique phytochemical properties that can be used to design breeding programs and use them in the pharmaceutical industry.

Keywords: Phytochemical diversity, mullein (*Verbascum* L.), phenolic compounds, total phenol, total flavonoid.

www.SID.ir