بررسی مقایسه ای ترکیبات فیتوشیمیایی گونه *Epilobium minutiflorum* در ارتفاعات مختلف

میترا محمدی بازرگانی

دریافت: ۱۳۹۷/۰۵/۰۱/ اصلاح: ۱۳۹۷/۰۵/۲۷ / پذیرش: ۱۳۹۷/۰۷/۱۱/ انتشار: ۱۳۹۷/۱۲/۲۸

پژوهشکده کشاورزی، سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران
پست الکترونیکی: bazargani@irost.ir

چکیده. گیاه *E. minutiflorum* یکی از گونه‌های سرده *Epilobium* با خواص دارویی مهم است که در تحقیق حاضر تنوع ترکیبات فیتوشیمیایی *E. minutiflorum* در ارتفاعات مختلف بررسی شده است. نمونه‌برداری از اندام هوایی در مرحله گل‌دهی از رویشگاه‌های طبیعی ایران با ارتفاع‌های ۲۳۸۷، ۲۵۶۹و ۲۸۱۳ متر بالاتر از سطح دریا انجام شد. عصاره نمونه‌های گیاهی با متانول ٪۸۰ استخراج شد و محتوی فلاونوئید کل (TFL) به روش کلرید آلومینیوم ($AlCl_3$)، فنل کل (TPH) به روش فولین_سیکالتو، ظرفیت آنتی اکسیدانی (AOX) به روش قدرت احیای فریک (FRAP) و محتوی آنتوسیانین (ACY) با استفاده از روش PH افتراقی انجام گرفت. علاوه بر این ترکیبات فیتوشیمیایی به روش GC/MS نیز شناسایی شدند. نتایج تحلیل های فتومتریک نشان داد که جمعیت شمشک دارای بالاترین محتوی TFL، TPH و AOX به ترتیب با ۳۰/۳۹ mg/gr ، ۹۳۸/۹۱ mg/gr و ۷۷/۷۷ mM/gr را در ارتفاع ۲۸۱۳ متر از سطح دریا است. مقدار TFL، TPHو AOX ارتباط مثبتی با ارتفاع نشان داد. نتایج حاصل از تجزیه GC/MS مبین وجود ۴۱ ترکیب در گونه تحت بررسی بود که از نظر فیتوشیمیایی به گروه‌های فلاونوئیدها، فنلیک اسید و مشتقات آن، استروئیدها و ترپن‌ها مجزا شدند و جمعیت شمشک بالاترین میزان را در همه ترکیبات شناسایی شده دارا بود. ارتباط مثبتی نیز بین ۳۰ ترکیب شناسایی شده بوسیله GC/MS (عمدتا فلاونوئیدها و فنلیک ها) با سطح ارتفاع از دریا مشاهده شد. نتایج مطالعه مبین این است که عوامل محیطی در ارتفاع بالاتر احتمالا باعث افزایش سطح فلاونول‌ها و فنل در *E. minutiflorum* شده است و شناسایی این عوامل مؤثر در ارتفاع بالاتر بر محتوای فیتوشیمیایی نیازمند مطالعات بیشتری است.

واژه‌های کلیدی. آنتی‌اکسیدان، تنوع فیتوشیمیایی، فلاونوئید، فنلیک اسید، کروماتوگرافی گازی/ طیف سنج جرمی

Comparative analyses of phytochemical compounds of *Epilobium minutiflorum* (Onagraceae) at different altitudes

Mitra Mohammadi Bazargani

Received 23.07.2018 / Revised 18.08.2018/ Accepted 03.10.2018/ Published 19.03.2019

Agriculture Institute, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran
*Corresponedent author: bazargani@irost.ir

Abstract. *Epilobium minutiflorum* belongs to the genus *Epilobium* with important medicinal properties. In this study, the natural variation of phytochemical compounds of *E. minutiflorum* at different altitudes has been investigated. Aerial parts of plants were collected at flowering stage from natural habitats at different altitudes of 2387, 2569 and 2813 masl. The plant extracts were obtained with 80% methanol and several phytochemical properties were measured. The properties included the total flavonoid content (TFL), total phenol (TPH), antioxidant capacity (AOX) and anthocyanin content (ACY) measured by the AlCl3, the Folin-Ciocalteu, the Ferric reducing antioxidant power (FRAP) and the differential PH methods, respectively. In addition, phytochemical components were identified by the GC/MS method. The results of photometric analysis indicated that the population of Shemshak, located at the highest altitude showed the highest content of TFL, TPH and AOX with 30.39 mg/gr DW, 938.91 mg/gr DW and 77.77 mM/gr DW, respectively. The TFL, TPH and AOX values showed a positive correlation with altitude. The results of GC/MS analysis revealed the presence of 41 compounds in *E. minutiflorum*, which were separated into flavonoids, phenolic acid and its derivatives, steroids and terpenes groups. Shemshak population showed the highest value in all identified compounds. A positive correlation was also observed between altitude and 30 compounds identified by the GC/MS method including mainly flavonoids and phenolics. The results of this study indicated that environmental factors at higher altitudes may influence the elevation of the flavenols and phenol content in *E. minutiflorum*. The identification of these influential factors on phytochemical content at higher altitudes requires further studies.

Keywords. antioxidant, flavonoeid, GC/MS, phenolic acid, phytochemical variation

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.4.13.7]
[DOI: 10.29252/nbr.5.4.466]

مقدمه

گونه *Epilobium minutiflorum* Hausskn. متعلق به سرده *Epilobium* از تیره Onagraceae یا گل مغربیان است. این تیره شامل حدود ۶۵۰ گونه و ۱۷ سرده است و پراکنش وسیعی در سرتاسر دنیا از مناطق ساحلی تا گرمسیری دارد. از زمان‌های بسیار دور، استفاده از گیاهان این تیره به‌منظور پیشگیری و درمان طیف وسیعی از بیماری‌ها نظیر سیاه‌زخم، آسم، پروستات، خونریزی‌های رحمی و بهبود زخم در اروپای مرکزی رواج داشته است (Tyler, 1986).

سرده *Epilobium*، به دلیل خاصیت ضدمیکروبی، ضدالتهابی، ضد قارچی، ضدباکتریایی و ضد توموری بسیار قوی برای درمان بیماری ها و التهابات پوستی و مخاطی نظیر اگزما، آکنه، سوختگیها و زخم ها در طب سنتی مورد توجه قرار می گیرد. در دهه های اخیر توجهات زیادی به شناسایی ترکیبات شیمیایی این سرده گیاهی معطوف شده است و ترکیبات فیتوشیمیایی برخی از گونه های این سرده، *E. hirsutum*، *E. angustifolium*، *E. dodonaei*، *E. fleischeri*، *E. roseum*، *E. montanum*، *E. parviflorum* و *E. tetragonum* مشخص شده است (Ducrey, *et al.*, 1995; Granica, *et al.*, 2014; Hevesi Tóth, *et al.*, 2006; Hiermann, 1995; Slacanin *et al.*, 1991). گیاهان این سرده منبع غنی متابولیت‌های ثانویه، به خصوص پلی فنل ها نظیر فلاونوئیدها، اسیدهای فنلی و تانن‌ها هستند. به غیر از پلی‌فنل‌ها، برخی از ترکیبات چربی‌دوست استروئیدی مانند، تری‌ترپنوئیدها و اسیدهای چرب نیز در گونه‌های اپیلوبیوم جداسازی و شناسایی شده‌اند. علاوه براین تا بحال، دو ترکیب دارویی مهم یعنی فلاونول‌ها (کوئرسیتین، مایرسیتین) (Bazylko *et al.*, 2007; Hevesi Tóth, 2009) و الاگیتانین‌های ماکروسیکلیک نظیر اوئنوترین (OeA and OeB) (Shikov *et al.*, 2010) از گونه های این سرده شناسایی و استخراج شده اند. همچنین ترکیبات دیگری نظیر استرول‌ها، گالیک ها، کلروژنیک و الاجیک اسیدها، اسیدهای چرب و تعداد کمی از ترکیبات نظیر موسیلاژ، قندها، ویتامین ها، عناصر ضروری و روغن‌های ولاتیل نیز از این سرده گزارش شده اند. از دیگر سوی وجود طیف وسیعی از فلاونوئیدها به عنوان یک صفت مهم در علم کموتاکزونومی بااهمیت است.

امروزه استخراج ترکیبات گیاهی برای اهداف دارویی از رویشگاه های طبیعی آن مرسوم است و از طرف دیگر محتوای فلانوئید و ترکیبات فنلی گیاه دارویی مورد نظر بسته به شرایط آب و هوایی محل برداشت متغیر است. گونه *E. minutiflorum* بومی مناطق مرکزی و غربی آسیا و از جمله ایران است و جمعیت های وحشی این گونه در طیفی از مناطق کوهستانی ایران در شرایط مختلف آب و هوایی پرورش می یابند. این امر این گونه را به‌مثابهٔ گونه‌ای جالب جهت بررسی نیمرخ فیتوشیمیایی تحت شرایط محیطی متفاوت تبدیل می‌کند. بنابراین هدف از مطالعه حاضر بررسی نیمرخ فیتوشیمیایی این گونه در رویشگاههای مختلف و بررسی ارتباط ارتفاع رویش گیاه با محتوی ترکیبات فیتوشیمیایی آن است. به هر حال مطالعات مروری ما نشان داد که تاکنون هیچ مطالعه‌ای روی این گونه در این زمینه صورت نگرفته و یا گزارشی منتشر نشده است و مطالعه حاضر اولین گزارش در رابطه با نیمرخ فیتوشیمیایی گونه مذکور است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

نمونه‌برداری از اندام هوایی *E. minutiflorum* از سه رویشگاه طبیعی ایران در تیر ماه سال ۱۳۹۳ انجام گرفت. از هر رویشگاه تعداد ۲۰ نمونه گیاهی به صورت تصادفی جمع آوری شد. رویشگاه‌های تحت بررسی شامل چاشم از اطراف شهمیرزاد از توابع سمنان E ۵۳/۲۶، N ۳۵/۹۲ در ارتفاع ۲۴۸۷ متر بالاتر از سطح دریا، چشمه کوهرنگ از توابع چهارمحال بختیاری E ۵۱/۴۸، N ۳۲/۴۶ در ارتفاع ۲۵۶۹ متر بالاتر از سطح دریا و شمشک از توابع تهران E ۵۰/۰۵، N ۳۶/۰۳ در ارتفاع ۲۸۱۳ متر بالاتر از سطح دریا هستند.

استخراج عصاره گیاهی

جهت عصاره‌گیری از نمونه‌ها، ابتدا ۲ گرم از بافت برگ پودر شد و ۴ میلی لیتر آب به همراه ۱۶ میلی لیتر متانول (متانول: آب، ۲۰:۸۰) به نمونه پودر شده اضافه شد و خوب مخلوط شد سپس نمونه‌ها روی شیکر در دمای اتاق به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. محتویات هر نمونه جداگانه توسط کاغذ صافی صاف شد و در دور ۳۱۰۰ به مدت ۴ دقیقه سانتریفوژ شد. عصاره بدست آمده مایل به سبز روشن به ۴ الی ۷ لوله آزمایشی ۲ میلی لیتری تقسیم و منتقل

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.4.13.7]
[DOI: 10.29252/nbr.5.4.466]

شد و در فریزر تا زمان آزمایش‌های فیتوشیمیایی نگهداری و ذخیره شد (Rohloff *et al.*, 2015).

اندازه‌گیری محتوی فلاونوئیدهای کل (Total flavonoids)

جهت اندازه‌گیری فلاونوئید کل، از میکروپلیت‌های ۹۶ تایی با حجم ۲۰۰ میکرولیتر برای هر چاهک استفاده شد. ابتدا در هر چاهک ۲۰ میکرولیتر عصاره خام (تهیه شده در بالا)، ۲۰ میکرولیتر کلرید آلومینیوم ($AlCl_3$) ٪۱۰، ۲۰ میکرولیتر استات پتاسیم و ۱۴۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر اضافه شد و مخلوط شدند. برای تهیه منحنی استاندارد: ۲۰ میکرولیتر کوئرسیتین (با غلظت‌های مختلف از ۱۰ تا ۱۰۰۰ میلی‌گرم/میلی لیتر) به همراه ۲۰ میکرولیتر کلرید آلومینیوم ($AlCl_3$) ٪۱۰، ۲۰ میکرولیتر استات پتاسیم و ۱۴۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر اضافه شد. غلظت و محتوی کل فلاونوئید با اندازه‌گیری جذب محلول واکنش در طول موج ۴۱۵ نانومتر محاسبه شد. مقدار فلاونوئید کل بر حسب میلی‌گرم کوئرسیتین در گرم ماده خشک با استفاده از فرمول توضیح داده شده توسط Rohloff و همکاران (2015) محاسبه شد.

اندازه‌گیری محتوی فنل کل (Total phenolics)

اندازه‌گیری محتوی ترکیبات فنلی کل به روش Folin-Ciocalteu تشریح شده توسط Uleberg و همکاران (2012) با کمی تغییرات انجام شد. به این ترتیب که عصاره خام نمونه ابتدا در متانول ٪۸۰ رقیق‌سازی شد و سپس به مدت ۲ ساعت در دمای محیط انکوبه شد. ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه مذکور به یک میکروپلیت ۹۶ تایی منتقل و میزان جذب در طول موج ۷۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. میزان محتوی فنل کل بر حسب منحنی استاندارد گالیک اسید (معادل گالیک اسید)، بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید در گرم ماده خشک قرائت و محاسبه شد (Uleberg *et al.*, 2012).

اندازه‌گیری محتوی آنتوسیانین (Total anthocyanins)

محتوی آنتوسیانین با استفاده از روش pH افتراقی شرح داده شده توسط Uleberg و همکاران (2012) با کمی تغییرات انجام شد. بافرهای مورد استفاده با pH برابر ۱ (۰/۰۲۵ مولار) و pH برابر ۴/۵ (۰/۴ مولار) به ترتیب بر پایه کلرید پتاسیم (KCl) و سدیم استات ($C_2H_3NaO_2$) بودند. pH بافرها با کلرید هیدروژن (HCL) تنظیم شد. عصاره خام نمونه‌ها در محلول بافر در زمان اندازه‌گیری رقیق شد و میزان جذب با اسپکتروفتومتر در طول موج نوری ۵۱۰ تا ۷۰۰ نانومتر اندازه‌گیری و قرائت شد. میزان و محتوی آنتوسانین بر حسب میلی گرم سیانیدین- ۳-گلوکوزید در گرم وزن خشک محاسبه شد (Uleberg *et al.*, 2012).

اندازه‌گیری محتوی آنتی اکسیدان

محتوی آنتی‌اکسیدانی به روش قدرت احیای فریک (FRAP) توصیف شده توسط Uleberg و همکاران (2012) با کمی تغییرات انجام شد. عصاره خام نمونه‌ها ابتدا در متانول ٪۸۰ رقیق سازی شد و سپس به مدت ۲ ساعت در دمای محیط انکوبه شد. ۵ میکرولیتر از نمونه به همراه ۱۵۰ میکرولیتر معرف FRAP به هر چاهک میکروپلیت ۹۶ تایی منتقل شدند و به مدت ۴ دقیقه بر روی شیکر قرار داده شدند. میزان جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری و قرائت شد و محتوی آنتی اکسیدانی بر حسب میلی-مول یون فریک احیا شده (Fe^{2+}) در هر گرم وزن خشک محاسبه شد (Uleberg *et al.*, 2012).

پروفایلینگ متابولیت‌ها به روشGC/MS

عصاره‌های خام جهت انجام پروفایلینگ متابولیت‌ها به روشGC/MS، ابتدا در دستگاه Speed vac بدون حرارت به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند تا خشک شوند. نمونه خشک شده در ۸۰ میکرولیتر متوکسی آمین هیدروکلراید ۲۰ میلی‌گرم/ میلی-لیتر در پیریدین به صورت محلول آماده شد و در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه تحت تیمار قرار گرفتند. سپس، نمونه‌ها با ۸۰ میکرولیتر از MSTFA (N-methyl-N-trimethylsilyl)trifluoroacetamide) در ۳۷ درجهٔ سانتی-گراد در انکوباتور به مدت ۳۰ دقیقه درایواتیز شدند. در نهایت، نمونه‌ها به تیوب‌های نمونه‌بردار اتوماتیک ۱/۵ میلی لیتر شیشه‌ای منتقل و در دمای ۲۰- درجهٔ سانتی‌گراد تا زمان کروماتوگرافی گازی / اسپکترومتری جرمی (GC/MS) ذخیره شدند (Rohloff *et al.*, 2015). جهت پروفایلینگ متابولیت‌ها، نمونه ها با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی GC 6890/5975 سیستم کمپانی Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA) Agilent/MS) تحلیل شدند. دستگاه مجهز به یک ستون مویرگی HP-5MS ۳۰ متر در ۰/۲۵ میلی‌متر قطر داخلی و ضخامت فاز ۰/۲۵ میکرومتر بود. برای این منظور ابتدا نمونه‌ها در تیوب‌های نمونه‌بردار اتوماتیک رقیق شدند. بدین ترتیب که ۱ میکرولیتر از

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.4.13.7]
[DOI: 10.29252/nbr.5.4.466]

نمونه به نسبت رقت ۱۵:۱ تزریق شد. دمای تزریق و آشکارسازی به ترتیب در ۲۳۰ و ۲۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد تنظیم شد. دمای اولیه ستون در ۴۰ درجهٔ سانتی‌گراد تنظیم شده بود و برای رسیدن به ۲۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد به صورت افزایش‌های ۳/۵ درجهٔ سانتی‌گراد در دقیقه برنامه‌ریزی شد و در نهایت در دمای ۲۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه نگاه داشته شد (زمان تحلیل ۶۳ دقیقه). منبع MS یا همان آشکارسازی در دمای ۲۳۰ درجهٔ سانتیگراد تنظیم شده بود. گاز حامل مورد استفاده هلیم با نرخ جریان ثابت ۱ میلی لیتر در دقیقه بود. برنامه دمایی ستون GC به صورت هم دما ابتدا در ۷۰ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه گذاشته شد، و برای رسیدن به ۳۱۰ درجهٔ سانتی‌گراد به صورت افزایش‌های ۵ درجهٔ سانتی‌گراد در دقیقه برنامه ریزی شد تا در نهایت در دمای ۳۱۰ درجهٔ سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه (مدت زمان تحلیل: ۶۰ دقیقه) نگه داشته شد. منبع MS یا همان آشکارسازی در دمای ۲۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد تنظیم شده بود، و طیف جرمی m/z 70-700 ثبت شد. همه طیف‌های جمعی به حالت الکترون یونیزاسیون (70 eV) (EI) به دست آمد. آشکارسازی کروماتوگرام و ادغام ناحیه پیک با استفاده از نرم افزارهای Agilent Chem Station (AgilentTechnologies Waldbronn, Germany) و نرم افزار همردیفی داده‌ها MetAlign (واخینگن UR، هلند) انجام شد. متابولیت‌های شناسایی شده به‌صورت کمی بر اساس ریبیتول استاندارد داخلی تعیین شدند و غلظت نهایی بر حسب (گرم وزن خشک/ میکروگرم) مشخص شد. برای ارزیابی طیف جرمی و شناسایی پیک متابولیت، نرم افزار AMDIS (موسسه ملی استاندارد و فناوری، تخته سنگ، شرکت، USA) در ترکیب با پایگاه متابولوم Golm، GMD (موسسه ماکس پلانک، بخش مولکولی فیزیولوژی گیاهی، Golm، آلمان)، پایگاه داده‌های طیف سنجی MassBankبا قدرت وضوح بالا (انجمن نورمن، Verneuil-en-Halatte ، فرانسه)، کتابخانه طیف سنج NIST05 (موسسه ملی استاندارد و فناوری، Gaithersburgh، MD) و طیف سنج درجا و کتابخانه شاخص و استاندارد مشتقات متابولیت گیاهی مورد استفاده قرار گرفتند (Rohloff *et al.*, 2015).

برای بررسی رابطه بین میزان ترکیبات فیتوشیمیایی با ارتفاع از سطح دریا، تجزیه رگرسیون با استفاده از نرم افزار XLSTAT 2007.6 انجام شد و مقدار ضریب تبیین (R^2) برای هر ترکیب فیتوشیمیایی گزارش گردید.

نتایج

نتایج تحلیل‌های فتومتریک

محتوی فلاونوئید کل، ترکیبات فنلی کل، آنتوسیانین و آنتی اکسیدان در ۳ جمعیت *E. minutiflorum* ایران به روش فتومتریک تعیین شد که نتایج بدست آمده آن در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. محتوی فلاونوئید کل (TFL) در جمعیت‌های تحت بررسی از ۲۳/۳۹ mg/gr DW (جمعیت چاشم)، ۲۶/۹۴ mg/gr DW (جمعیت کوهرنگ)و mg/gr DW ۳۰/۳۹ (جمعیت شمشک) به ترتیب در ارتفاع ۲۳۸۷، ۲۵۶۹ و ۲۸۱۳ متر بالاتر از سطح دریا متغیر بود. محتوی ترکیبات فنلی کل (TPH)در جمعیت های تحت بررسی از ۴۴۷/۵۴ mg/gr DW ، ۷۱۹ mg/gr DW تا ۹۳۸/۹۱ mg/gr DW به‌ترتیب در ارتفاع ۲۳۸۷، ۲۵۶۹ و ۲۸۱۳ متر بالاتر از سطح دریا ثبت شد. به طور مشابه مقدار آنتوسیانین (ACY) از حداقل ۸۳/۴۹ mg/gr DW در ارتفاع ۲۳۸۷ متر ، ۵۴/۵۵ mg/gr DW در ارتفاع ۲۵۶۹ متر و ۶۳/۴۶ mg/gr DW در ارتفاع ۲۸۱۳ متر بالاتر از سطح دریا متغیر بود. نتایج بررسی محتوی آنتی اکسیدان (AOX) برای جمعیت های تحت مطالعه در دامنه بین ۴۹/۰۹ mM/gr DW ، ۵۲/۱۴ mM/gr DW و ۷۷/۷۷ mM/gr DW در ارتفاع ۲۳۸۷، ۲۵۶۹ و ۲۸۱۳ متر بالاتر از سطح دریا ثبت شد.

تجزیه و تحلیل رگرسیون بر روی داده های محتوی TFL، TPH، ACY و AOX نشان داد که بین محتوی TFL، TPH و AOX و ارتفاع از سطح دریا ارتباط مثبت وجود دارد به طوری‌که ضریب تبیین برای ترکیبات مذکور به ترتیب (R^2>0.99)، (R^2>0.97)، (R^2>0.88) بود (شکل ۱). ولی ارتباطی بین محتوی ACY با ارتفاع از سطح دریا مشاهده نشد. (R^2>0.37). همچنین بین محتوی TFL، TPH و AOX نیز همبستگی مثبت و معنی‌داری مشاهده شد (جدول ۲).

نتایج تجزیه و تحلیل GC/MS

با تجزیه و تحلیل GC/MS در جمعیت‌های *E. minutiflorum* ۷۲ ترکیب شناسایی شد که در این مقاله ۴۱ ترکیب متابولیتهای

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.4.13.7]
[DOI: 10.29252/nbr.5.4.466]

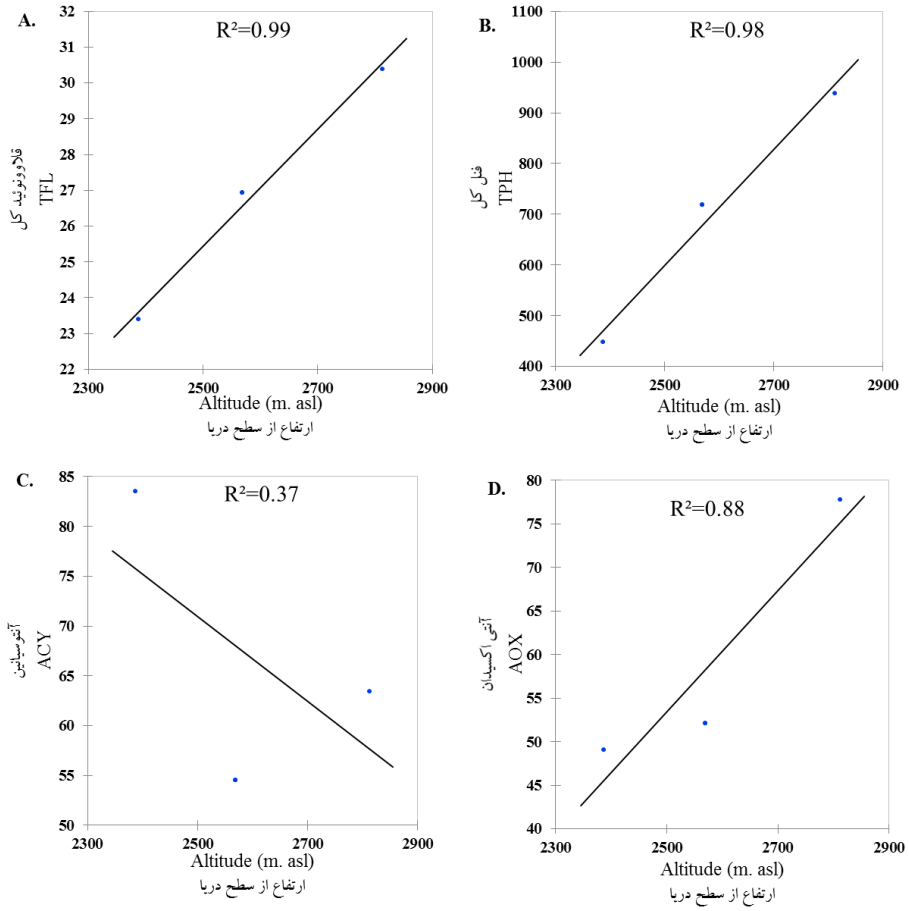
جدول ۱- محتوی ترکیبات فیتوشیمیایی در جمعیت‌های مختلف *Epilobium minutiflorum* تخمین‌شده به روش فتومتریک.

Table 1. The content of phytochemical compounds in different populations of *Epilobium mintiflorum* estimated by photometric method.

		TFL (mg/gr DW)	TPH (mg/gr DW)	ACY (mg/gr DW)	AOX (mM/gr DW)	ارتفاع MASL (m)	عرض جغرافیایی (E)	طول جغرافیایی (N)
حرف اختصاری	محل جمع آوری	TFL	TPH	ACY	AOX	Alt	Lat	Long
EPM1	چاشم	23.39	447.54	83.49	49.09	2387	35.92	53.26
EPM2	چشمه کوهرنگ	26.94	719.00	54.55	52.14	2569	38.33	32.46
EPM3	شمشک	30.39	938.91	63.46	77.77	2813	36.03	36.03

*TFL، TPH ، ACY و AOX به ترتیب نشان‌دهنده محتوی فلاونوئید کل، محتوی ترکیبات فنلی کل، مقدار آنتوسیانین، محتوی آنتی‌اکسیدان است. میزان TFL، TPH ، ACY و AOX به ترتیب بر حسب معادل روتین، معادل اسید گالیک، cyanidin 3-glucoside equivalents (Cy3-GE) و FRAP (Ferric reducing antioxidant power) تعیین شده است.

*TFL, TPH, ACY and AOX denote the total flavonoid content, total phenolic compounds, anthocyanin content, and antioxidant content, respectively. The level of TFL, TPH, ACY and AOX was determined as routine equivalent, gallic acid equivalent, cyanidin 3-glucoside equivalents (Cy3-GE), and FRAP (Ferric reducing antioxidant power), respectively.



شکل ۱- نمودار حاصل از تجزیه رگرسیون مبین ارتباط بین محتوی فیتوشیمیایی جمعیت‌های *E. minutiflorum* با ارتفاع از سطح دریا، **A:** فلاونوئید کل، **B:** فنلیک کل، **C:** آنتوسیانین و **D:** آنتی‌اکسیدان.

Fig. 1. The regression analysis representing the relationship between the phytochemical content of the *E. mutiflorum* populations with altitudes above sea level, **A:** total flavonoid, **B:** total phenolic, **C:** anthocyanin and **D:** antioxidant.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.4.13.7]
[DOI: 10.29252/nbr.5.4.466]

جدول ۲- ضریب همبستگی بین محتوی ترکیبات فیتوشیمیایی و ارتفاع از سطح دریا (Alt) در *Epilobium minutiflorum*، حروف اختصاری در جدول شماره ۱ ذکر شده است.

Table 2. The correlation coefficient between the content of phytochemicals and altitudes (Alt) in *Epilobium mintiflorum*. The abbreviations are listed in Table 1.

متغیرها	Alt	TFL	TPH	ACY	AOX
Alt	**1**	1	0.99	-0.61	0.94
TFL	1	**1**	1	-0.68	0.91
TPH	0.99	1	**1**	-0.72	0.88
ACY	-0.61	-0.68	-0.72	**1**	-0.31
AOX	0.94	0.91	0.88	-0.31	**1**

ثانویه گزارش می‌شود سایر ترکیبات شامل متابولیتهای اولیه و ترکیبات آروماتیک غیر قابل شناسایی بوده که از ارائه لیست صرفه‌نظر می‌شود. از نظر فیتوشیمی ۴۱ ترکیب گزارش شده در گروه‌های مختلف دسته بندی شدند که شامل ۸ ترکیب مربوط به گروه فلاونوئیدها، ۲۳ ترکیب مربوط به گروه ترکیبات فنلیک اسید و مشتقات آن، ۳ ترکیب متعلق به استروئیدها، ۴ ترکیب تری‌ترپن، ۱ ترکیب دی‌ترپن، و ۲ ترکیب که در گروه جداگانه‌ای تحت عنوان دیگر ترکیبات قرار گرفتند.

ترکیبات فلاونوئیدی

از بین ۸ ترکیب شناسایی شده در گروه ترکیبات فلاونوئیدی، مایرستین (ترکیب شماره ۵) با مقدار متوسط mg/gr ۱۳/۰۴ در ماده خشک گیاهی ترکیب غالب و عمده گروه ترکیبات فلاونوئیدی درجمعیت‌های تحت مطالعه بود. و کاتچین (ترکیب شماره ۲) به طور متوسط پایین‌ترین مقدار (mg/gr ۰/۰۱) را دارا بود (جدول ۳). ترکیبات اصلی بعد از مایریسیتین، فلاونوئید ۱، کوئرسیتین و کامفرول ثبت شدند. به طور میانگین ترتیب ترکیبات اصلی گروه فلاونوئیدها و مشتقات آن به صورت کامفرول< کوئرسیتین< فلاونوئید ۱< مایریستین بود. در بین ۳ جمعیت تحت مطالعه، جمعیت شمشک بالاترین محتوی مایریسیتین، فلاونوئید۱، کوئرسیتین و کامفرول را به ترتیب با مقادیرmg/gr ۲۶، ۷/۵۶، ۶/۷۴و ۲/۴۸ دارا بود و جمعیت چاشم پایین‌ترین محتوی مایریسیتین، کوئرسیتین، فلاونوئید۱ و کامفرول را به ترتیب با مقادیر mg/gr ۳/۸۷ ، ۱/۱۴، ۰/۸۵ و ۰/۵۲ دارا بود. در کل بین ۳ جمعیت، جمعیت شمشک در مجموع با میزان mg/gr ۴۳/۱۶ ترکیبات فلاونوئیدی، غنی‌ترین جمعیت برای گروه فلاونوئید ها محسوب شد (جدول ۳).

ترکیبات فنلی

در گروه ترکیبات فنلی، گالیک اسید (ترکیب شماره ۲۲) با مقدار متوسط mg/gr ۳۰/۳۸ در ماده خشک گیاهی، بیشترین مقدار را در بین ترکیبات فنلی به خود اختصاص داد و به طور متوسط ترکیبات عمده بعد از گالیک اسید، الاجیک اسید، گوئینیک اسید و (E)-کافئیک اسید به ترتیب با مقادیر متوسط mg/gr۱۳/۴۶، ۲/۱۱ و ۱/۹۶ مشاهده شد. به طور میانگین ترتیب ترکیبات اصلی گروه فنلیک اسید و مشتقات آن در جمعیت‌های مختلف به صورت (E)-کافئیک اسید< گوئینیک اسید< الاگیک اسید< گالیک اسید است، در بین ۳ جمعیت تحت مطالعه شمشک به ترتیب با mg/gr ۵۶/۷۸ و ۲۶/۴۰ بیشترین و جمعیت چاشم به ترتیب mg/gr ۱۱/۴۷ و ۵/۱۳ کمترین مقدار را به‌ترتیب برای گالیک اسید و الاجیک اسید دارا بودند (جدول ۳). در کل در بین ۳ جمعیت، جمعیت شمشک از نظر کل ترکیبات فنلی با مقدار mg/gr ۹۵/۷۸ غنی‌ترین جمعیت و جمعیت چاشم در مجموع با مقدار mg/gr ۲۰/۱۲ ضعیف ترین جمعیت از نظر محتوی ترکیبات فنلی محسوب می‌شوند (جدول ۳).

ترکیبات استروئیدی

گروه ترکیبات استروئیدی در نتایج مشاهده شده GC/MS دیگر گروه مهم بوده که شامل ترکیبات استرول ۱، استرول ۲ و بتا-سیتواسترول (شماره ۳۲-۳۴) هستند. به طور میانگین در جمعیت‌های

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.4.13.7]
[DOI: 10.29252/nbr.5.4.466]

[DOI: 10.29252/nbr.5.4.466] [DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.4.13.7] [Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-19]

جدول ۳- نتایج تحلیل پروفایلینگ GC/MS برای جمعیت‌های *E. minutiflorum*، R^2 ضریب رگرسیون را نشان می‌دهد.

Table 3. The results of the GC/MS profiling analysis for the *E. mutiltifum* populations. R^2 denote the coefficient of determination.

	Peak Nr	Scan Nr	RT*	RI**	RI calc	Class	Mass	Mass_Scan	چاشم	کوهرنگ	شمشک	Mean	R²
Flavonoids													
epicatechin	58195	5798	48.10	2841.87	2856.46	aro	**356**	356_5798	0.00	0.03	0.09	0.04	0.96
catechin	59884	5954	49.20	2864.23	2939.34	aro	**368**	368_5954	0.00	0.01	0.03	0.01	0.93
Kaempferol	67800	6158	50.65	3071.90	3052.27	aro	**559**	559_6158	0.52	0.78	2.49	1.26	0.90
Quercetin	69415	6345	51.98	3169.07	3159.66	aro	**647**	647_6345	1.14	2.16	6.74	3.35	0.93
Myricetin	1382	6426	52.56	3209.62	3207.67	aro	**73**	73_6426	3.87	9.26	26.00	13.05	0.96
flavonoid1	69684	6447	52.71		3220.20	aro	**663**	663_6447	0.85	2.93	7.57	3.78	0.98
flavonoid2	52064	6526	53.27		3267.43	aro	**309**	309_6526	0.05	0.09	0.22	0.12	0.96
kaempferol deriv.	67908	7302	58.79		3771.70	aro	**559**	559_7302	0.03	0.01	0.02	0.02	0.16
									6.48	**15.27**	**43.16**	**21.64**	
Phenolic acids & their derivatives													
benzoic acid	26703	1362	16.56	1251.20	1258.03	aro	**179**	179_1362	0.06	0.07	0.21	0.11	0.89
4-hydroxybenzaldehyde	35815	2299	23.22	1493.64	1495.87	aro	**223**	223_2299	0.01	0.02	0.11	0.05	0.89
p-tyrosol (phenolic antioxidant)	26710	2559	25.07	1575.25	1569.57	aro	**179**	179_2559	0.00	0.01	0.02	0.01	0.97
4-hydroxybenzoic acid	44715	2746	26.40	1633.29	1624.80	aro	**267**	267_2746	0.12	0.07	0.25	0.15	0.57
Hydroxyquinol	39131	2652	25.73	1598.07	1596.74	aro	**239**	239_2652	0.04	0.06	0.15	0.08	0.96
4-hydroxyphenylacetic acid	26711	2780	26.64	1644.00	1634.97	aro	**179**	179_2780	0.00	0.01	0.02	0.01	0.97
2,5-dihydroxybenzaldehyde	52107	2999	28.20	1709.76	1702.65	aro	**311**	311_2999	0.01	0.13	0.09	0.08	0.41
(Z)-p-coumaric acid	48466	3245	29.95	1789.44	1781.91	aro	**293**	293_3245	0.03	0.05	0.09	0.06	0.98
protocatechuic acid	29903	3329	30.54	1812.68	1809.45	aro	**193**	193_3329	0.13	0.45	1.36	0.65	0.97
quinic acid	57300	3435	31.30	1842.69	1845.56	ac	**345**	345_3435	1.58	0.87	3.88	2.11	0.62
gallic acid methyl ester	46883	3522	31.92	1840.00	1875.56	aro	**281**	281_3522	0.51	0.72	1.75	0.99	0.92
(E)-p-coumaric acid	48504	3675	33.00	1947.53	1928.97	aro	**293**	293_3675	0.15	0.23	0.56	0.31	0.94
gallic acid	1197	3715	33.29	1945.87	1943.57	aro	**73**	73_3715	11.48	22.90	56.78	30.39	0.96
(E)-ferulic acid	56618	4080	35.88	2093.07	2078.95	aro	**338**	338_4080	0.10	0.23	0.37	0.23	0.99
(E)-caffeic acid	61096	4192	36.68	2135.55	2122.65	aro	**396**	396_4192	0.55	2.86	2.50	1.97	0.53
(Z)-4-caffeoyl-quinic acid	51300	5767	47.88	2991.58	2840.17	aro	**307**	307_5767	0.19	1.03	1.03	0.75	0.67
chlorogenic acid	57474	6230	51.17	3101.60	3093.81	aro	**345**	345_6230	0.00	0.03	0.02	0.02	0.38
caffeoylquinic acid deriv.1	51354	6253	51.33		3106.71	aro	**307**	307_6253	0.00	0.01	0.02	0.01	0.96
caffeoylquinic acid deriv.2	51361	6303	51.69		3135.93	aro	**307**	307_6303	0.00	0.01	0.02	0.01	0.97
(E)-4-caffeoylquinic acid	51364	6330	51.88	3154.54	3151.46	aro	**307**	307_6330	0.01	0.01	0.02	0.01	0.90
(E)-5-caffeoylquinic acid	51370	6370	52.16	3177.57	3174.48	aro	**307**	307_6370	0.01	0.03	0.07	0.04	1.00
(Z)-1-caffeoylquinic acid	51374	6412	52.46	3201.00	3199.34	aro	**307**	307_6412	0.01	0.27	0.06	0.11	0.01
ellagic acid	1388	6541	53.38	3329.00	3276.79	aro	**73**	73_6541	5.14	8.86	26.40	13.47	0.93

[DOI: 10.29252/nbr.5.4.466] [DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.4.13.7] [Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-19]

(E)-5-caffeoylquinic acid	51370	6370	52.16	3177.57	3174.48	aro	**307**	307_6370	0.01	0.03	0.07	0.04	1.00
(Z)-1-caffeoylquinic acid	51374	6412	52.46	3201.00	3199.34	aro	**307**	307_6412	0.01	0.27	0.06	0.11	0.01
ellagic acid	1388	6541	53.38	3329.00	3276.79	aro	**73**	73_6541	5.14	8.86	26.40	13.47	0.93
									20.13	**38.94**	**95.79**	**51.62**	
Steroids													
sterol1	60372	6381	52.24		3181.09	st	**375**	375_6381	0.10	0.08	0.53	0.23	0.79
sterol2	60377	6475	52.91		3236.99	ste	**375**	375_6475	0.06	0.04	0.18	0.09	0.75
beta-sitosterol	61253	6640	54.08	3377.20	3336.98	ste	**396**	396_6640	0.03	0.06	0.09	0.06	1.00
									0.19	**0.18**	**0.81**	**0.39**	
Diterpens													
(E)-phytol	18925	4282	37.32	2169.13	2158.27	ter	**143**	143_4282	0.44	0.67	1.35	0.82	0.96
Teriterpenes													
oleanolic acid deriv.1	67007	6966	56.40		3544.46	ter	**496**	496_6966	0.02	0.01	0.02	0.02	0.01
oleanolic acid deriv.2	67008	7061	57.07		3606.74	ter	**496**	496_7061	0.07	0.01	0.02	0.03	0.49
oleanolic acid	31708	7121	57.50	3559.97	3647.29	ter	**203**	203_7121	0.38	0.65	1.29	0.77	0.98
ursolic acid	31714	7250	58.42	3608.85	3735.59	ter	**203**	203_7250	0.28	0.46	1.27	0.67	0.93
									0.75	**1.13**	**2.61**	**1.50**	
Other components													
mandelic acid (skin care)	26707	2254	22.90	1461.65	1483.47	aro	**179**	179_2254	0.02	0.05	0.17	0.08	0.94
allantoin (skin care)	55362	3512	31.85	1875.07	1872.14	pur	**331**	331_3512	0.07	0.04	0.09	0.06	0.25
									0.09	**0.09**	**0.26**	**0.15**	

*Retention Time, **Retention Index, Significant regression coefficient (R^2)

مختلف میزان استرول ۱ با میزان ۰/۲۳ mg/gr و بتا-سیتواسترول با میزان ۰/۰۶۴ mg/gr به ترتیب بیشترین وکمترین مقدار را دارا بودند. در کل جمعیت شمشک (۰/۸ mg/gr) و جمعیت چاشم به مقدار بسیار ناچیز mg/gr ۰/۱۸ به ترتیب بیشترین و کمترین مقدار ترکیبات استروئیدی را دارا بودند (جدول ۳).

تری‌ترپن‌ها

گروه مهم دیگر ترکیبات، گروه تری‌ترپن‌ها (ترکیبات شماره ۳۹-۳۶) شامل مشتقات اولئانولیک اسید ۱، مشتقات اولئانولیک اسید ۲، اولئانولیک اسید و اورسالیک اسید هستند. به طور میانگین در بین ترکیبات این گروه، اولئانولیک اسید با میزان ۰/۷۷ mg/gr بالاترین مقدار گروه را داشت و ترکیب عمده و اصلی گروه تری‌ترپن‌ها بود، و در بین جمعیت های تحت مطالعه جمعیت شمشک به میزان ۲/۶ mg/gr و در جمعیت چاشم ۰/۷۵ mg/gr به ترتیب بالاترین و کمترین مقدار تری‌ترپن‌ها را بود.

از دیگر ترکیبات شناسایی شده (E)-فایتول (شماره ۳۵) بود که متعلق به گروه دی‌ترپن‌ها بود. به طوری که جمعیت شمشک با میزان ۱/۳۵ mg/gr و جمعیت شهمیرزاد با میزان ۰/۴۴ mg/gr به ترتیب بالاترین و کمترین مقدار ماده مذکور را دارا بودند.

سایر ترکیبات

سایر ترکیات شناسایی شده شامل ماندلیک اسید، آلانتوئین، ۱۰ ترکیب آروماتیک و ۸ ترکیب شناسایی نشده است (۱۰ ترکیب آروماتیک و ۸ شناسایی نشده در جدول ارائه نشده است).

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که مقدار محتوی فلاونوئید کل (TFL)، محتوی ترکیبات فنلی کل (TPH)، محتوی آنتوسیانین (ACY) و آنتی اکسیدان (AOX) اندازه‌گیری شده به روش فتومتریک تنوع قابل ملاحظه‌ای بین جمعیت‌های مختلف *E. Minutiflorum* نشان می‌دهد به طوری‌که محتوی TFL (۲۳/۳۹ mg/gr DW- ۳۰/۳۹) و محتوی TPH(mg/gr DW ۴۴۷/۵۴ – ۹۳۸/۹۱) در این تحقیق بسیار بیشتر از سایر گونه‌های بررسی شده است. در بررسی انجام شده بر روی ۵ گونه مختلف از سرده اپیلوبیوم میزان محتوی TFL و TPH به ترتیب در محدوده (۳/۳ mg/gr DW-۸/۷) و (۳۴۸ mg/gr DW-۲۵۸) گزارش شده است که بالاترین مقادیر TFL و TPH در گونه *E. parviflorum* مشاهده شده است (Hevesi Tóth 2009). بنابراین نتایج این تحقیق در مقایسه با تحقیق اخیر قابل توجه است و بالا بودن میزان TFLو TPH را در گونه *E. minutiflorum* در مقایسه با دیگر گونه‌ها نشان می دهد.

بر اساس نتایج بدست آمده جمعیت شمشک بالاترین محتوی TFL، TPH و بالاترین ظرفیت آنتی اکسیدانی AOX را در مقایسه با دو جمعیت دیگر دارا است (جدول ۱). علاوه براین بین TFL، TPH، و AOX همبستگی مثبت قوی مشاهده شد. در نتایج بررسی‌های مختلف نیز ظرفیت بالای آنتی‌اکسیدانی به غلظت بالایی از فلاونوئیدها و فنل‌ها نسبت داده شده است (Arredondo *et al.*, 2004; Hevesi Tóth *et al.*, 2009; Shikov *et al.*, 2006; Wojdyło *et al.*, 2007) که همسو با نتایج مشاهده در این تحقیق است.

از طرفی مقدار آنتوسیانین (ACY) برخلاف TFL، TPH و AOX در جمعیت چاشم دارای بالاترین مقدار بود. و همبستگی منفی ضعیفی بین ACY با TFL AOXو TPH مشاهده شد. آنتوسیانین ها (ACY) پلی فنل‌هایی با فعالیت آنتی اکسیدانی شناخته شده هستند که ممکن است مسئول برخی از فعالیت‌های بیولوژیک باشند (Miguel 2011). در مطالعه‌ای بر روی زغال اخته همبستگی نسبی بین میزان TPH و AOX گزارش شده، در حالیکه رابطه بین ACY و AOX بسیار ضعیف بوده است، و به دنبال این نتیجه مشاهده شده، بر اهمیت ترکیبات فنولی غیر از آنتوسیانین‌ها، و سهم آنها در فعالیت کلی آنتی اکسیدانی تاکید نمودند (Rohloff *et al.*, 2015) که در تأیید نتیجه تحقیق حاضر است و نشان می دهد سهم TPH درظرفیت آنتی اکسیدانی بیشتر از ACY است.

بر اساس نتایج تجزیه و تحلیل رگرسیون در جمعیت های تحت مطالعه، ارتباط مثبتی بین محتوی TFL، TPH و AOX با ارتفاع از دریا (R^2>0.89) مشاهده شد و تنها درACY ارتباطی با ارتفاع مشاهده نشد (شکل ۱). به عبارتی تغییرات محتوی TFL، TPH و AOX در جمعیت های تحت مطالعه متاثر از ارتفاع از سطح دریا است. در مطالعه‌ای که توسط Monschein و همکاران (2015) بر روی محتوی ترکیبات فنلی در جمعیت‌های وحشی *E. angustifolium* در ۳ ارتفاع مختلف انجام شد ارتباطی بین میزان محتوی فنل اندازه‌گیری شده به روش فتومتریک مشاهده نشد. حال

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.4.13.7]
[DOI: 10.29252/nbr.5.4.466]

آنکه برای محتوی فلاونوئید کل با ارتفاع از سطح دریا ارتباط مثبتی گزارش شد. این محققین تاکید نمودند که عوامل محیطی در ارتفاع بالا می تواند منجر به افزایش سطوح فلاونول‌ها در بافت‌های گیاهی *E. angustifolium* شود (Monschein *et al.*, 2015).

نتایج تجزیه و تحلیل GC/MS نشان داد که عمده ترکیبات شناسایی شده در جمعیت‌های تحت مطالعه فلاونوئیدها و ترکیبات فنلی است. تانن‌ها با توجه به اینکه از نظر وزن مولکولی در محدوده شناسایی در تحلیل استفاده شده نبودند، شناسایی نشدند ولی نتیجه بدست آمده دلیل بر عدم وجود تانن‌ها نیست. مطالعات نشان می‌دهد که پلی‌فنل‌ها ترکیبات اصلی در گیاه اپیلوبیوم هستند که از جمله آن فلاونوئیدها، اسید فنلیک و تانن‌ها جزو ترکیبات اصلی هستند (Granica *et al.*, 2014). ازترکیبات فلاونوئیدی، مایریسیتین با مقدار متوسط ۱۳/۰۴ mg/gr در ماده خشک گیاه به ترتیب ترکیب غالب و عمده گروه ترکیبات فلاونوئیدی درجمعیت‌های *E. minutiflorum* بود. گزارش‌ها و نتایج مشابهی در خصوص غالب بودن و ترکیب عمده مایریستین در گروه ترکیبات فلاونوئیدی برای برخی گونه‌های اپیلوبیوم نیز ارایه شده است. بررسی میزان فلاونوئیدها در گونه‌های مختلف از سرده *Epilobium* نشان‌داده است که در *E. angustifolium* در مقایسه با گونه‌های دیگر گلیکوزید های کورستین ترکیب عمده و غالب فلاونوئیدها هستند در حالیکه در گونه‌های دیگر از جمله *E. hirsutum*، *E. dodonaei*، *E. fleischeri*، *E. roseum*، *E. parviflorum*، *E. montanum*، *E. tetragonum* و چند گونه دیگر، مایریسیتین ترکیب عمده و غالب فلاونوئید ها گزارش شده است (Slacanin *et al.*, 1991; Ducrey *et al.*, 1995; Hiermann 1995; Granica *et al.*, 2014; Hevesi Tóth *et al.*, 2006). بنابراین نتیجه تحقیق حاضر در تأیید و راستای نتایج این تحقیقات است و نشان می‌دهد که درگونه *E. minutiflorum* نیز مانند اکثر گونه‌های سرده اپیلوبیوم مایریسیتین ترکیب عمده و غالب فلاونوئیدها است. دیگر ترکیبات عمده شناسایی شده در گروه فلاونوئیدها به ترتیب فراوانی مقدار تخمین زده شده کامفرول< کوئرسیتین< فلاونوئید ۱< مایریستین هستند که این ترتیب فراوانی در هر ۳ جمعیت مطالعه شده مشاهده شد. علاوه بر ترکیبات اخیر دو ترکیب دیگر تحت عنوان کاتچین و اپی کاتچین که مقدارشان در هر ۳ جمعیت ناچیز بود شناسایی شدند. تمام ترکیبات شناسایی شده گروه فلاونوئیدها به غیر کاتچین و اپی کاتچین در اکثر گونه‌های سرده اپیلوبیوم نیز گزارش شده‌اند (Granica *et al.*, 2014). لذا نتایج ما در تأیید گزارشات پیشین است ولی در رابطه با دو ترکیب کاتچین و اپی کاتچین، با توجه به اینکه در هر ۳ جمعیت تحت مطالعه شناسایی شده‌اند، می‌تواند به عنوان نشانگر فیتوشیمیایی برای تشخیص گونه *E. minutiflorum* مطرح شود که البته نیاز به تحقیقات بیشتری جهت تأیید این موضوع دارد. بر اساس نتایج فیتوشیمیایی GC/MS در مجموع برای ترکیبات گروه فلاونوئید، بین جمعیت‌های تحت مطالعه جمعیت شمشک غنی از فلاونوئیدها است. در گروه ترکیبات فنلی، گالیک اسید با مقدار متوسط ۳۰/۳۸ mg/gr در ماده خشک گیاهی، بیشترین مقدار در بین ترکیبات گروه فنلی را به خود اختصاص داد و به طور میانگین ترتیب ترکیبات اصلی گروه فنلیک اسید و مشتقات آن در جمعیت‌های مختلف به صورت (E)-کافئیک اسید< گوئینیک اسید< الاگیک اسید< گالیک اسید بود. تمامی ترکیبات شناسایی شده در گروه ترکیبات فنلی اکثرا در گونه های *E. hirsutum*، *E. roseum*، *E. parviflorum*، *E. montanum*، *E. angustifolium* گزارش شده‌اند (Granica *et al.*, 2014)، همچنین گالیک اسید در بین تمامی ۴۱ ترکیت شناسایی شده اصلی‌ترین ترکیب و عمده ترین ترکیب است که به نوبه خود بیشترین سهم را در بالابردن میزان محتوی گروه ترکیبات فنلی در مقایسه با دیگر گروه ها ایفا می‌کند و الاگیک اسید و مایریسیتن (از گروه فلاونوئیدها) به ترتیب بعد از مایریسیتین بیشترین مقدار را به خود اختصاص دادند.بر اساس پژوهش‌های انجام گرفته الاجیک اسید نشانگر حضور الاجیتانین‌ها است و در ۵ گونه *Epilobium* از جمله *E. angustifolium*، *E. hirsutum* و *E. parviflorum* هستند مشاهده و شناسایی شده است و در تأیید نتایج مشاهده شده در تحقیق حاضر است (Granica *et al.*, 2014; Hevesi Tóth *et al.*, 2006; Shikov *et al.*, 2006).

جمعیت شمشک در مجموع با مقدار ۹۵/۷۸ mg/gr در بین جمعیت‌های تحت مطالعه غنی ترین جمعیت از نظر محتوی ترکیبات فنلی محسوب می‌شود (جدول ۲). در مطالعات مختلف غربالگری، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی غنی از ترکیبات فنلی مشخص شده است و عموما فعالیت‌های آنتی اکسیدانی بالا را از طریق آزمایش‌های مختلف از قبیل: توانایی

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.4.13.7]
[DOI: 10.29252/nbr.5.4.466]

کاهش آهن و قدرت آنتی‌اکسیدان (FRAP) و غیره در عصاره گونه‌های مختلف اپیلوبیوم نشان داده شده است (Katalinic *et al.*, 2006; Wojdyło *et al.*, 2007; Hevesi Tóth *et al.*, 2009). لذا بر اساس نتایج مشاهده شده می‌توان استنباط کرد که جمعیت شمشک به دلیل غنی بودن از ترکیبات فنلی در مقایسه با دیگر جمعیت‌ها از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری برخوردار باشد، داده های آزمایشات فتومتریک (ارایه شده در جدول ۲) در تأیید نتیجه گرفته شده است و بالا بودن ظرفیت آنتی اکسیدانی جمعیت شمشک را به دلیل غنی بودن از ترکیبات فنلی ، تأیید می کند.

ترکیبات استرول ۱، استرول ۲ و بتا-سیتواسترول از جمله اجزای گروه ترکیبات استروئیدی هستند. بیشترین میزان ترکیبات استروئیدی مربوط به جمعیت شمشک بود. در منابع مختلف به وجود و حضور ۱۱ ترکیب استروئیدی از جمله کلسترول، کمپسترل، استیگمااسترول، بتا-سیتوستول و گلایکوزیدهای آن و استرها در گونه‌های *E. angustifolium*، *E. parviflorum*، *E. obscurum* اشاره شده است ولی تا کنون در رابطه با گونه *E. minutiflorum* هیچ گزارشی منتشر نشده است (Hiermann & Mayr 1985; Granica *et al.*, 2014). لذا حضور ترکیبات استروئیدی در گونه *E. minutiflorum* برای اولین بار است.

ترکیبات مهم گروه تری‌ترپن‌ها شامل مشتقات اولئانولیک اسید ۱، مشتقات اولئانولیک اسید ۲، اولئانولیک اسید و اورسالیک اسید هستند. و در بین جمعیت‌های تحت مطالعه، جمعیت شمشک بیشترین مقدار تری‌ترپن‌ها را دارا است این در حالی است که پژوهش‌های انجام شده به حضور اسید تریترپونوئید به عنوان ترکیب مهم در قسمت های هوایی *E. angustifolium* اشاره کرده‌اند اما مطالعات اندکی در مورد تری‌ترپن‌ها در سایر گونه‌های اپیلوبیوم وجود دارد (Glen *et al.*, 1967; Granica *et al.*, 2014)، لذا نتایج تحقیق حاضر از لحاظ حضور تری‌ترپن‌ها در گونه *E. minutiflorum* ایران قابل ملاحظه است.

علاوه بر ترکیبات مذکور ۲ ترکیب دیگر تحت عنوان ماندلیک اسید و آلانتوئین در این تحقیق شناسایی شد که تاکنون در هیچ تحقیقی بر روی گونه‌های سرده اپیلوبیوم گزارش نشده است و برای اولین بار در تحقیق حاضر گزارش می‌شود. هر دو ترکیب مذکور نقش محافظتی برای پوست دارند. در بین جمعیت‌های تحت مطالعه، جمعیت شمشک بیشترین مقدار ماندلیک اسید و آلانتوئین را در مقایسه با دو جمعیت دیگر داشت. گزارشها چندین اثر مفید برای آلانتوئین را به عنوان یک ماده فعال در لوازم آرایشی مطرح کرده‌اند که از جمله آن می توان به اثر مرطوب کننده و کراتولیتیک، افزایش میزان آب ماتریکس خارج سلولی و افزایش لایه‌های بالای سلول‌های پوست مرده، افزایش صافی پوست، ترویج تکثیر سلولی و بهبود زخم، و یک اثر محافظتی، ضد تحریک‌کننده و محافظ پوست از طریق تشکیل کمپلکس‌هایی با مواد حساس کننده و تحریک کننده اشاره کرد (Araújo *et al.*, 2010). همچنین بر اساس نتایج تجزیه و تحلیل‌های بافتی نشان داده شده است که یک لوسیون نرم با ۵٪ آلانتوئین، بهبود التهاب واکنش، بهبود روند زخم را تسریع می‌بخشد. همچنین تجزیه و تحلیل کمی، از این ایده حمایت می‌کند که آلانتوئین باعث ترویج تکثیر فیبروبلاست و سنتز ماتریکس خارج سلولی است می‌شود (Araújo *et al.*, 2010). همچنین درمان خارش و درماتیت آتوپیک خفیف تا متوسط را با یک داروی موضعی بدون استروئید حاوی آلانتوئین گزارش شده است (Veraldi *et al.*, 2009). این ترکیب اغلب در خمیر دندان، دهانشویه و سایر محصولات بهداشت دهان و دندان، در شامپوها، رژ لب‌ها، داروهای ضد آکنه، محصولات مراقبت از پوست و لوسیون‌های روشن کننده، لوسیون‌های آرایشی مختلف و کرم‌ها و سایر محصولات آرایشی و دارویی استفاده می‌شود (Thornfeldt 2005). از طرفی بر اساس گزارشها گونه‌های گیاهی اپیلوبیوم به صورت موضعی در طب سنتی برای درمان بیماری های التهابی پوست به مانند جراحات و زخم‌های بدن استفاده می‌شوند و بیان‌شده است که عصاره برگ و گل در این گیاه برای بسیاری از مشکلات پوستی نظیر اگزما، آکنه، سوختگیها و زخم ها مفید و مؤثر است و در تهیه داروهای پوستی مدنظر است. سرخپوستان آمریکای شمالی از آن برای درمان زخم‌های آلوده، خونریزی بعد از زایمان و به عنوان یک شستشودهنده برای درمان التهاب‌های پوستی استفاده می‌کردند (Barrett & Gifford 1933; Bocek 1984; Smith 1923). لذا این گزارشها در تأیید نتایج تحقیق حاضر است و خواص ذکر شده برای درمان مشکلات پوستی می‌تواند به دلیل حضور آلانتوئین باشد.

نتایج تجزیه رگرسیون ارتباط مثبت را بین ۳۰ ترکیب شناسایی‌شده در جمعیت‌های *E. minutiflorum* با ارتفاع از سطح

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.4.13.7]
[DOI: 10.29252/nbr.5.4.466]

دریا نشان داد که از این میان بیشتر ترکیبات دارای ارتباط مثبت مربوط به گروه فلاونوئیدها (۷ ترکیب از ۸ ترکیب)، گروه فنل‌ها (۱۶ ترکیب از ۲۳ ترکیب)، گروه استروئیدها و ترپن‌ها بود (جدول ۳). به عبارتی افزایش محتوی ۳۰ ترکیب بخصوص در گروه فلاونوئیدها، فنلیک اسید و استروئیدها می‌تواند با افزایش ارتفاع افزایش یابد. لذا از نتایج رگرسیون داده‌های فیتوشیمیایی GC/MS می‌توان استنباط نمود که ترکیبات دارای ارتباط مثبت با ارتفاع می‌تواند به عنوان یک صفت بالقوه جهت افزایش تولید فلاونول‌ها، فنل‌ها و استروئیدها در قسمت‌های گیاهی *E. minutiflorum* در سطوح ارتفاع‌های بالاتر از سطح دریا در نظر گرفته شود. در تحقیقی مشابه با بررسی‌های فیتوشیمیایی بین جمعیت‌های *E. angustifolium* در ارتفاعات مختلف توانستند افزایش غلظت کوئرسیتین و نیز فلاونول را با افزایش ارتفاع نشان دهند و کوئرسیتین را به عنوان یک نشانگر بالقوه جهت افزایش تولید فلاونول در گونه ذکر شده با افزایش ارتفاع مطرح کردند (Monschein *et al.*, 2015).

ارتباط بین نتایج تجزیه GC/MS با تجزیه‌های فتومتریک (TFL, TPH and AOX)

نتایج تجزیه GC/MS با نتایج به‌دست‌آمده از تجزیه‌های فتومتریک مطابقت زیادی دارد و نتایج همدیگر را تأیید کردند. جمعیت شمشک در هر دو بررسی، به عنوان جمعیت غنی از فلاونوئید، فنل با ظرفیت آنتی اکسیدانی بالا مشخص شد. همچنین در نتایج بدست‌آمده از هر دو تحلیل بین محتوای فلاونوئید و فنل ارتباط مثبت و قوی با ارتفاع از سطح دریا مشاهده شد.

لازم به ذکر است که نتایج تحلیل GC/MS را نمی‌توان به طور مستقیم با نتایج تحلیل فتومتریک مقایسه نمود، زیرا استانداردهای استفاده شده برای اندازه‌گیری محتوی فلاونوئید کل، فنل کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، برای تحلیل GC/MS مورد استفاده قرار نگرفته اند و استانداردهای استفاده شده متفاوت هستند. علاوه براین، داده‌های بیان شده برای متغیرهای فیتوشیمیایی بر اساس جذب اسپکتروفتومتری و بر خلاف داده‌های حاصل از تجزیه و تحلیل GC/MS بیان شده است. همچنین، ترکیبات فیتوشیمیایی شناسایی شده بوسیله GC/MS تنها شامل فنل و محتویات فلاونوئیدها نیست، بلکه شامل بسیاری از ترکیبات دیگر مانند دی‌ترپن‌ها، تری‌ترپن‌ها، متیل استرهای معطر، اسید چرب اشباع نشده، استر، اسید چرب، هورمون های گیاهی و غیره است (Ismail *et al.*, 2017).

سپاسگزاری

از صندوق حمایت از پژوهشگران و فن آوران کشور (شماره طرح ۹۲۰۳۴۸۳۳) به خاطر حمایت از انجام بخشی از این پژوهش تشکر می‌شود. از دانشکده زیست شناسی داتنشگاه علوم و تکنولوژی نروژ جهت فراهم آوردن بخشی از اجرای طرح تشکر می گردد.

REFERENCES

Araújo, L.U., Grabe-Guimarães, A., Mosqueira, V.C.F., Carneiro, C.M., and Silva-Barcellos, N.M. 2010. Profile of wound healing process induced by allantoin. – Acta Cir. Bras. 25: 460-461.

Arredondo, M., Blasina, F., Echeverry, C., Morquio, A., Ferreira, M., Abin-Carriquiry, J., Lafon, L., and Dajas, F. 2004. Cytoprotection by Achyrocline satureioides (Lam) DC and some of its main flavonoids against oxidative stress. – J. Ethnopharmacol. 91: 13-20.

Barrett, S.A., and Gifford, E.W. 1933. Indian life of the yosemite region :Miwok material culture. Bull. Public Mus. – Milwaukee. 2: 174.ب

Bazylko, A., Kiss, A., and Kowalski, J. 2007. Densitometric determination of flavonoids in methanolic and aqueous extracts of *Epilobii angustifolii* herba by use of HPTLC. J. Planar. Chromatogr. – Mod .TLC. 20: 53-56.

Bocek, B.R. 1984. Ethnobotany of Costanoan Indians,California,based on collections by John P. Harrington. – Econ. Bot. 38: 240-255.

Ducrey, B., Wolfender, J., Marston, A., and Hostettmann, K. 1995. Analysis of flavonol glycosides of thirteen *Epilobium* species (Onagraceae) by LC-UV and thermospray LC-MS. – Phytochemistry. 38: 129-137.

Glen, A.T., Lawrie, W., McLean, J., and Younes, M.E.-G. 1967. Triterpenoid constituents of rose-bay willow-herb. – J. Chem. Soc. C. 510-515.

Granica, S., Piwowarski, J.P ,.Czerwińska, M.E., and Kiss, A.K. 2014. Phytochemistry, pharmacology and traditional uses of different *Epilobium* species (Onagraceae): a review. – J. Ethnopharmacol. 156: 316-346.

Hevesi Tóth, B. 2009. Phytochemical and in vitro biological evaluation of potentially active compounds in *Epilobium* species. Thesis of doctoral (Ph. D.) dissertation Budapest: Semmelweis University.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.4.13.7]
[DOI: 10.29252/nbr.5.4.466]

Hevesi Tóth, B., Balázs, A., Vukics, V., Szőke, É., and Kéry, Á. 2006. Identification of *Epilobium* species and willow-herbs (Onagraceae) by HPLC analysis of flavonoids as chemotaxonomic markers. – Chroma. 63: 119-123.

Hevesi Tóth, B., Blazics, B., and Kéry, Á. 2009. Polyphenol composition and antioxidant capacity of *Epilobium* species. J. Pharm. – Biomed. Anal. 49: 26-31.

Hiermann, A. 1995. Phytochemical characterization of *Epilobium angustifolium* L. and its differentiation to other *Epilobium* species by TLC and HPLC. – Sci. Pharm. 63: 135-135.

Hiermann, A., and Mayr, K. 1985. The investigation of active compounds from *Epilobium* species. The occurrence of sitosterol derivatives in *Epilobium angustifolium* L. and *Epilobium parviflorum* Schreb. – Sci. Pharm. 53: 39-44.

Ismail, N.Z., Arsad, H., Samian, M.R., and Hamdan, M.R. 2017. Determination of phenolic and flavonoid contents, antioxidant activities and GC-MS analysis of *Clinacanthus nutans* (Acanthaceae) in different locations. – Agrivita 39: 335–344.

Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T., and Jukic, M. 2006. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. – Food Chem. 94: 550-557.

Miguel, M.G. 2011. Anthocyanins: antioxidant and/or anti-inflammatory activities. – J. Appl. Pharm. Sci. 1: 7-15.

Monschein, M., Jaindl, K., Buzimkić, S., and Bucar, F. 2015. Content of phenolic compounds in wild populations of *Epilobium angustifolium* growing at different altitudes. – Pharm. Biol. 53: 1576-1582.

Rohloff, J., Uleberg, E., Nes, A., Krogstad, T., Nestby, R., and Martinussen, I. 2015. Nutritional composition of bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.) from forest fields in Norway–Effects of geographic origin, climate, fertilization and soil properties. – J. Appl. Bot. Food Qual. 88 274-287.

Shikov, A.N., Poltanov, E.A., Dorman, H.D., Makarov, V.G., Tikhonov, V.P., and Hiltunen, R. 2006. Chemical composition and in vitro antioxidant evaluation of commercial water-soluble willow herb (*Epilobium angustifolium* L.) extracts. – J. Agric. Food Chem. 54: 3617-3624.

Shikov, A.N., Pozharitskaya, O.N., Ivanova, S.A., Makarov, V.G., Tikhonov, V.P., and Galambosi, B. 2010. Improved and validated HPTLC method for quantification of oenothein B and its use for analysis of *Epilobium angustifolium* L. – J. Planar. Chromatogr. Mod. TLC. 23: 70-74.

Slacanin, I., Marston, A., Hostettmann, K., Delabays, N., and Darbellay, C. 1991. Isolation and determination of flavonol glycosides from E*pilobium* species. – J. Chromatogr. A. 557: 391-398.

Smith, H.H. 1923. Ethnobotany of the Menomini Indians. Bull. Public Mus. – Milwaukee. 19234: 40.

Thornfeldt, C. 2005. Cosmeceuticals Containing Herbs: Fact, Fiction, and Future. – Dermatol. Surg. 31: 873-881.

Tyler, V. 1986. Some recent advances in herbal medicine. – Pharm Int. 7: 203-207.

Uleberg, E., Rohloff, J., Jaakola, L., Trôst, K., Junttila, O., Häggman, H., and Martinussen, I. 2012. Effects of temperature and photoperiod on yield and chemical composition of northern and southern clones of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.). – J. Agric. Food Chem. 60: 10406-10414.

Veraldi, S., De, P.M., Schianchi, R., and Lunardon, L. 2009. Treatment of pruritus in mild-to-moderate atopic dermatitis with a topical non-steroidal agent. Journal of drugs in dermatology: – JDD. 8: 537-539.

Wojdyło, A., Oszmiański, J., and Czemerys, R. 2007. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. – Food Chem. 105: 940-949.

*****

How to cite this article:

Mohammadi Bazargani, M. 2019. Comparative analyses of phytochemical compounds of *Epilobium minutiflorum* (Onagraceae) at different altitudes. – Nova Biol. Reperta 5: 466-478.

محمدی بازرگانی، م . ۱۳۹۷. بررسی مقایسه‌ای ترکیبات فیتوشیمیایی گونه *Epilobium minutiflorum* در ارتفاعات مختلف. – یافته‌های نوین در علوم زیستی۵: ۴۷۸-۴۶۶.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.4.13.7]
[DOI: 10.29252/nbr.5.4.466]