

## بررسی مقایسه‌ای 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 پژوهش‌های 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، ۲۵۶۹ و 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 ( $\text{AlCl}_3$ )، فنل کل (TPH) به روش فولین-سیکالتو، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (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 تحلیل‌های 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 در ارتفاع ۲۸۱۳ متر از سطح دریا است. مقدار TFL، TPH و 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 (عمدتاً فلاونوئیدها و فنلیک‌ها) با سطح ارتفاع از دریا مشاهده شد. نتایج مطالعه مبین این است که عوامل محیطی در ارتفاع بالاتر احتمالاً 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

\*Correspondent 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  $\text{AlCl}_3$ , 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, flavonoid, GC/MS, phenolic acid, phytochemical variation

## 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 به منظور 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 ضد میکروبی، ضد التهابی، ضد قارچی، ضد باکتریایی و ضد توموری بسیار قوی برای درمان بیماری‌ها و التهابات پوستی و مخاطی نظیر اکزما، آکنه، سوختگی‌ها و زخم‌ها در طب سنتی مورد توجه قرار می‌گیرد. در دهه‌های اخیر توجهات زیادی به شناسایی ترکیبات شیمیایی این سرده گیاهی معطوف شده است و ترکیبات فیتوشیمیایی برخی از گونه‌های این سرده، *E. angustifolium*، *E. hirsutum*، *E. montanum*، *E. roseum*، *E. fleischeri*، *dodonaei*، *E. tetragonum* و *parviflorum* (Ducrey, 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 پلی‌فنل‌ها 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 بر این تا بحال، دو ترکیب دارویی مهم یعنی فلاونول‌ها (کوئرسیتین، مایرسیتین) (Bazylo et al., 2010) از گونه‌های این سرده شناسایی و استخراج شده‌اند. همچنین ترکیبات دیگری نظیر استرول‌ها، گالیک‌ها، کلروژنیک و الاجیک اسیدها، اسیدهای چرب و تعداد کمی از ترکیبات نظیر موسیلاژ، قندها، ویتامین‌ها، عناصر ضروری و روغن‌های ولاتیل نیز از این سرده گزارش شده‌اند. از دیگر سوی وجود طیف وسیعی از فلاونوئیدها به عنوان یک صفت مهم در علم کموتاکرونومی بااهمیت است.

امروزه استخراج ترکیبات گیاهی برای اهداف دارویی از رویشگاه‌های طبیعی آن مرسوم است و از طرف دیگر محتوای فلاونوئید 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 جمعیت‌های وحشی این گونه در طیفی از مناطق کوهستانی ایران در شرایط مختلف آب و هوایی پرورش می‌یابند. این امر این گونه را به مثابه 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

نمونه برداری 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 جمع‌آوری شد. رویشگاه‌های تحت بررسی شامل چاشم از اطراف شهیرزاد 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

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 آنتی‌اکسیدانی بر حسب میلی-مول یون فریک احیا شده ( $Fe^{2+}$ ) در هر گرم وزن خشک محاسبه شد (Uleberg *et al.*, 2012).

#### پروفایلینگ متابولیت‌ها به روش GC/MS

عصاره‌های خام جهت انجام پروفایلینگ متابولیت‌ها به روش GC/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 درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه تحت تیمار قرار گرفتند. سپس، نمونه‌ها با ۸۰ میکرولیتر از (N-methyl-N- MSTFA (trimethylsilyl)trifluoroacetamide) در ۳۷ درجه سانتی-گراد در انکوباتور به مدت ۳۰ دقیقه دریاوتیز شدند. در نهایت، نمونه‌ها به تیوب‌های نمونه‌بردار اتوماتیک ۱/۵ میلی لیتر شیشه‌ای منتقل و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان کروماتوگرافی گازی / اسپکترومتری جرمی (GC/MS) ذخیره شدند (Rohloff *et al.*, 2015). جهت پروفایلینگ متابولیت‌ها، نمونه‌ها با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی GC 6890/5975 سیستم کمپانی Agilent Technologies Inc., Palo Alto, )Agilent/MS (CA) 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

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 کوئرستین (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 کوئرستین 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 (۰/۲۵ 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

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  $23/39$  mg/gr DW (جمعیت چاشم)،  $26/94$  mg/gr DW (جمعیت کوه‌رنگ) و  $30/39$  (جمعیت شمشک) به ترتیب در ارتفاع  $2387$ ،  $2569$  و  $2813$  متر بالاتر از سطح دریا متغیر بود. محتوی ترکیبات فنلی کل (TPH) در جمعیت‌های تحت بررسی از  $447/54$  mg/gr DW،  $719$  mg/gr DW تا  $938/91$  mg/gr DW به ترتیب در ارتفاع  $2387$ ،  $2569$  و  $2813$  متر بالاتر از سطح دریا ثبت شد. به طور مشابه مقدار آنتوسیانین (ACY) از حداقل  $83/49$  mg/gr DW در ارتفاع  $2387$  متر،  $54/55$  mg/gr DW در ارتفاع  $2569$  متر و  $63/46$  mg/gr DW در ارتفاع  $2813$  متر بالاتر از سطح دریا متغیر بود. نتایج بررسی محتوی آنتی اکسیدان (AOX) برای جمعیت‌های تحت مطالعه در دامنه بین  $49/09$  mM/gr DW،  $52/14$  DW و  $77/77$  mM/gr DW در ارتفاع  $2387$ ،  $2569$  و  $2813$  متر بالاتر از سطح دریا ثبت شد.

تجزیه و تحلیل رگرسیون بر روی داده‌های 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 طوری که 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

نمونه به نسبت رقت ۱۵:۱ تزریق شد. دمای تزریق و آشکارسازی به ترتیب در  $230$  و  $250$  درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. دمای اولیه ستون در  $40$  درجه سانتی‌گراد تنظیم شده بود و برای رسیدن به  $250$  درجه سانتی‌گراد به صورت افزایش‌های  $3/5$  درجه سانتی‌گراد در دقیقه برنامه‌ریزی شد و در نهایت در دمای  $250$  درجه سانتی‌گراد به مدت  $3$  دقیقه نگاه داشته شد (زمان تحلیل  $63$  دقیقه). منبع MS یا همان آشکارسازی در دمای  $230$  درجه سانتی‌گراد تنظیم شده بود. گاز حامل مورد استفاده هلیوم با نرخ جریان ثابت  $1$  میلی لیتر در دقیقه بود. برنامه دمایی ستون GC به صورت هم‌دما ابتدا در  $70$  درجه سانتی‌گراد به مدت  $5$  دقیقه گذاشته شد، و برای رسیدن به  $310$  درجه سانتی‌گراد به صورت افزایش‌های  $5$  درجه سانتی‌گراد در دقیقه برنامه‌ریزی شد تا در نهایت در دمای  $310$  درجه سانتی‌گراد به مدت  $7$  دقیقه (مدت زمان تحلیل:  $60$  دقیقه) نگاه داشته شد. منبع MS یا همان آشکارسازی در دمای  $230$  درجه 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 (Agilent Technologies Waldbronn, Germany) و نرم افزار هم‌ردیفی داده‌ها MetAlign (واخنینگن UR، هلند) انجام شد. متابولیت‌های شناسایی شده به صورت کمی بر اساس ریستول 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 GMD، Golm (موسسه ماکس پلانک، بخش مولکولی فیزیولوژی گیاهی، Golm، آلمان)، پایگاه داده‌های طیف سنجی MassBank با 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).

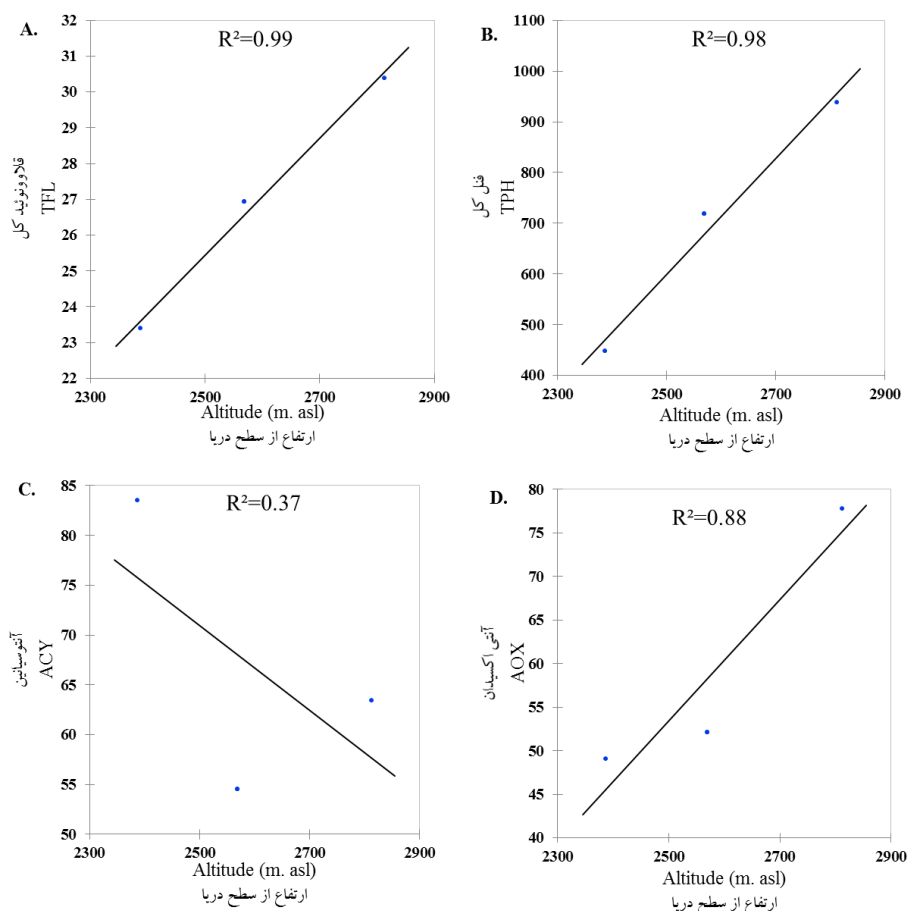
برای بررسی رابطه بین میزان ترکیبات فیتوشیمیایی با ارتفاع از سطح دریا، تجزیه رگرسیون با استفاده از نرم افزار XLSTAT

جدول ۱- محتوی ترکیبات فیتوشیمیایی در جمعیت‌های مختلف *Epilobium minutiflorum* تخمین شده به روش فتومتریک.**Table 1.** The content of phytochemical compounds in different populations of *Epilobium minutiflorum* estimated by photometric method.

حرف اختصاری	محل جمع آوری	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)
		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 FRAP و cyanidin 3-glucoside equivalents (Cy3-GE)، AOX و ACY، TPH، TFL به ترتیب بر حسب معادل روتین، معادل اسید گالیک، (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.

**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 minutiflorum*. 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

ترکیبات فلاونوئیدی، غنی ترین جمعیت برای گروه فلاونوئیدها محسوب شد (جدول ۳).

#### ترکیبات فنلی

در گروه ترکیبات فنلی، گالیک اسید (ترکیب شماره ۲۲) با مقدار متوسط ۳۰/۳۸ mg/gr 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)-کافیک اسید به ترتیب با مقادیر متوسط ۱۳/۴۶mg/gr، ۲/۱۱ و ۱/۹۶ مشاهده شد. به طور میانگین ترتیب ترکیبات اصلی گروه فنلیک اسید و مشتقات آن در جمعیت های مختلف به صورت (E)-کافیک اسید > گوئینیک اسید > الاجیک اسید > گالیک اسید است، در بین ۳ جمعیت تحت مطالعه شمشک به ترتیب با ۵۶/۷۸ mg/gr و ۲۶/۴۰ بیشترین و جمعیت چاشم به ترتیب ۱۱/۴۷ و ۵/۱۳ کمترین مقدار را به ترتیب 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 ۹۵/۷۸ mg/gr غنی ترین جمعیت و جمعیت چاشم در مجموع با مقدار ۲۰/۱۲ mg/gr ضعیف ترین جمعیت از نظر محتوی ترکیبات فنلی محسوب می شوند (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 جمعیت های

ثانویه گزارش می شود سایر ترکیبات شامل متابولیت های اولیه و ترکیبات آروماتیک غیر قابل شناسایی بوده که از ارائه لیست صرفه نظر می شود. از نظر فیتوشیمی ۴۱ ترکیب گزارش شده در گروه های 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 تری ترین، ۱ ترکیب دی ترین، و ۲ ترکیب که در گروه جداگانه ای 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 ۱۳/۰۴ mg/gr در ماده خشک گیاهی ترکیب غالب و عمده گروه ترکیبات فلاونوئیدی در جمعیت های تحت مطالعه بود. و کاتچین (ترکیب شماره ۲) به طور متوسط پایین ترین مقدار (۰/۰۱ mg/gr) را دارا بود (جدول ۳). ترکیبات اصلی بعد از مایرستین، فلاونوئید ۱، کوئرستین و کامفرول ثبت شدند. به طور میانگین ترتیب ترکیبات اصلی گروه فلاونوئیدها و مشتقات آن به صورت کامفرول > کوئرستین > فلاونوئید ۱ > مایرستین بود. در بین ۳ جمعیت تحت مطالعه، جمعیت شمشک بالاترین محتوی مایرستین، فلاونوئید ۱، کوئرستین و کامفرول را به ترتیب با مقادیر ۷/۵۶، ۲۶، ۶/۷۴ و ۲/۴۸ دارا بود و جمعیت چاشم پایین ترین محتوی مایرستین، کوئرستین، فلاونوئید ۱ و کامفرول را به ترتیب با مقادیر ۳/۸۷ mg/gr، ۱/۱۴، ۰/۸۵ و ۰/۵۲ دارا بود. در کل بین ۳ جمعیت، جمعیت شمشک در مجموع با میزان ۴۳/۱۶ mg/gr



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. minutiflorum* populations.  $R^2$  denote the coefficient of determination.

	Peak Nr	Scan Nr	RT*	RT**	RI calc	Class	Mass	Mass Scan	چشم	کورتک	شستک	Mean	R <sup>2</sup>
<b>Flavonoids</b>	epicatechin	58195	48.10	2841.87	2856.46	aro	356	356_5798	0.00	0.03	0.09	0.04	0.96
	catechin	59884	49.20	2864.23	2939.34	aro	368	368_5954	0.00	0.01	0.03	0.01	0.93
	Kaempferol	67800	50.65	3071.90	3052.27	aro	559	559_6158	0.52	0.78	2.49	1.26	0.90
	Quercetin	69415	51.98	3169.07	3159.66	aro	647	647_6345	1.14	2.16	6.74	3.35	0.93
	Myricetin	1382	52.56	3209.62	3207.67	aro	73	73_6426	3.87	9.26	26.00	13.05	0.96
	flavonoid1	69684	52.71	3220.20	3220.20	aro	663	663_6447	0.85	2.93	7.57	3.78	0.98
	flavonoid2	52064	53.27	3267.43	3267.43	aro	309	309_6326	0.05	0.09	0.22	0.12	0.96
	kaempferol deriv.	67908	58.79	3771.70	3771.70	aro	559	559_7302	0.03	0.01	0.02	0.02	0.16
									<b>6.48</b>	<b>15.27</b>	<b>43.16</b>		<b>21.64</b>
<b>Phenolic acids &amp; their derivatives</b>													
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	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	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

(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
<b>Steroids</b>									<b>20.13</b>	<b>38.94</b>	<b>95.79</b>	<b>51.62</b>	
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
<b>Diterpens</b>									<b>0.19</b>	<b>0.18</b>	<b>0.81</b>	<b>0.39</b>	
(E)-phytol	18925	4282	37.32	2169.13	2158.27	ter	143	143_4282	0.44	0.67	1.35	0.82	0.96
<b>Teriterpenes</b>													
oleanoic acid deriv.1	67007	6966	56.40		3544.46	ter	496	496_6966	0.02	0.01	0.02	0.02	0.01
oleanoic acid deriv.2	67008	7061	57.07		3606.74	ter	496	496_7061	0.07	0.01	0.02	0.03	0.49
oleanoic 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
<b>Other components</b>									<b>0.75</b>	<b>1.13</b>	<b>2.61</b>	<b>1.50</b>	
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
									<b>0.09</b>	<b>0.09</b>	<b>0.26</b>	<b>0.15</b>	

\*Retention Time, \*\*Retention Index, Significant regression coefficient (R<sup>2</sup>)



*parviflorum* (Hevesi Tóth 2009) مشاهده شده است و بنابراین نتایج این تحقیق در مقایسه با تحقیق اخیر قابل توجه است و بالا بودن میزان TFL و TPH را در گونه *E. minutiflorum* در مقایسه با دیگر گونه‌ها نشان می‌دهد.

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 بر این بین 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., 2007; Wojdyło et al., 2006) 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 AOX TFL و TPH مشاهده شد. آنتوسیانین‌ها (ACY) پلی فنل‌هایی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی 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 آنتی‌اکسیدانی تاکید نمودند (Rohloff et al., 2015) که در تأیید نتیجه تحقیق حاضر است و نشان می‌دهد سهم TPH در ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بیشتر از ACY است.

بر اساس نتایج تجزیه و تحلیل رگرسیون در جمعیت‌های تحت مطالعه، ارتباط مثبتی بین محتوی TFL، TPH و AOX با ارتفاع از دریا ( $R^2 > 0.89$ ) مشاهده شد و تنها در ACY ارتباطی با ارتفاع مشاهده نشد (شکل ۱). به عبارتی تغییرات محتوی TFL، TPH و AOX در جمعیت‌های تحت مطالعه متأثر 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 فوتومتریک مشاهده نشد. حال

مختلف میزان استرول ۱ با میزان  $0.23 \text{ mg/gr}$  و بتا-سیتواسترول با میزان  $0.064 \text{ mg/gr}$  به ترتیب بیشترین و کمترین مقدار را دارا بودند. در کل جمعیت شمشک ( $0.8 \text{ mg/gr}$ ) و جمعیت چاشم به مقدار بسیار ناچیز  $0.18 \text{ mg/gr}$  به ترتیب بیشترین و کمترین مقدار ترکیبات استروئیدی را دارا بودند (جدول ۳).

### تری‌ترین‌ها

گروه مهم دیگر ترکیبات، گروه تری‌ترین‌ها (ترکیبات شماره ۳۶-۳۹) 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  $0.77 \text{ mg/gr}$  بالاترین مقدار گروه را داشت و ترکیب عمده و اصلی گروه تری‌ترین‌ها بود، و در بین جمعیت‌های تحت مطالعه جمعیت شمشک به میزان  $2.6 \text{ mg/gr}$  و در جمعیت چاشم  $0.75 \text{ mg/gr}$  به ترتیب بالاترین و کمترین مقدار تری‌ترین‌ها را بود.

از دیگر ترکیبات شناسایی شده (E)-فایتول (شماره ۳۵) بود که متعلق به گروه دی‌ترین‌ها بود. به طوری که جمعیت شمشک با میزان  $1.35 \text{ mg/gr}$  و جمعیت شه‌میرزاد با میزان  $0.44 \text{ mg/gr}$  به ترتیب بالاترین و کمترین مقدار ماده مذکور را دارا بودند.

### سایر ترکیبات

سایر ترکیبات شناسایی شده شامل ماندلیک اسید، آلانئوئین، 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 آنتی‌اکسیدان (AOX) اندازه‌گیری شده به روش فوتومتریک تنوع قابل ملاحظه‌ای بین جمعیت‌های مختلف *E. Minutiflorum* نشان می‌دهد به طوری که محتوی TFL ( $23.39 - 30.39 \text{ mg/gr DW}$ ) و محتوی TPH ( $30.39 - 44.7/54 \text{ mg/gr DW}$ ) 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  $8.7/3.3 - 25.8 - 34.8 \text{ mg/gr DW}$  و گزارش شده است که بالاترین مقادیر TFL و TPH در گونه *E.*

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 بافت های گیاهی *E. angustifolium* شود (Monschein et al., 2015).

نتایج تجزیه و تحلیل GC/MS نشان داد که عمده ترکیبات شناسایی شده در جمعیت های تحت مطالعه فلاونوئیدها و ترکیبات فنلی است. تانن ها 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 تانن ها نیست. مطالعات نشان می دهد که پلی فنل ها ترکیبات اصلی در گیاه اپیلوبیوم هستند که از جمله آن فلاونوئیدها، اسید فنلیک و تانن ها جزو ترکیبات اصلی هستند (Granica et al., 2014). از ترکیبات فلاونوئیدی، مایرستین با مقدار متوسط ۱۳/۰۴ mg/gr در ماده خشک گیاه به ترتیب ترکیب غالب و عمده گروه ترکیبات فلاونوئیدی در جمعیت های *E. minutiflorum* بود. گزارش ها و نتایج مشابهی در خصوص غالب بودن و ترکیب عمده مایرستین در گروه ترکیبات فلاونوئیدی برای برخی گونه های اپیلوبیوم نیز ارایه شده است. بررسی میزان فلاونوئیدها در گونه های مختلف از سرده *Epilobium* نشان داده است که در *E. angustifolium* در مقایسه با گونه های دیگر گلیکوزید های کورستین ترکیب عمده و غالب فلاونوئیدها هستند در حالیکه در گونه های دیگر از جمله *E. hirsutum*, *E. roseum*, *E. fleischeri*, *E. dodonaei*, *E. tetragonum*, *E. montanum parviflorum* و چند گونه دیگر، مایرستین ترکیب عمده و غالب فلاونوئیدها 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 می دهد که در گونه *E. minutiflorum* نیز مانند اکثر گونه های سرده اپیلوبیوم مایرستین ترکیب عمده و غالب فلاونوئیدها است. دیگر ترکیبات عمده شناسایی شده در گروه فلاونوئیدها به ترتیب فراوانی مقدار تخمین زده شده کامفرول > کوئرستین > فلاونوئید ۱ > مایرستین 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 گونه های سرده اپیلوبیوم نیز گزارش شده اند (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 شده اند، می تواند 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 جمعیت های 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 جمعیت های مختلف به صورت (E)-کافئیک اسید > گوئینیک اسید > الاگیک اسید > گالیک اسید بود. تمامی ترکیبات شناسایی شده در گروه ترکیبات فنلی اکثراً در گونه های *E. hirsutum*, *E. roseum*, *E. parviflorum*, *E. angustifolium montanum* گزارش شده اند (Granica et al., 2014)، همچنین گالیک اسید در بین تمامی ۴۱ ترکیب شناسایی شده اصلی ترین 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 می کند و الاگیک اسید و مایرستین (از گروه فلاونوئیدها) به ترتیب بعد از مایرستین بیشترین مقدار را به خود اختصاص دادند. بر اساس پژوهش های انجام گرفته الاجیک اسید نشانگر حضور الاجیتانین ها است و در ۵ گونه *Epilobium* از جمله *E. hirsutum*, *E. angustifolium* و *E. parviflorum* هستند مشاهده و شناسایی شده است و در تأیید نتایج مشاهده شده در تحقیق حاضر است (Granica et al., 2006; Shikov et al., 2006; Hevesi Tóth et al., 2014). جمعیت شمشک در مجموع با مقدار ۹۵/۷۸ mg/gr در بین جمعیت های تحت مطالعه غنی ترین جمعیت از نظر محتوی ترکیبات فنلی محسوب می شود (جدول ۲). در مطالعات مختلف غربالگری، ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره های گیاهی غنی از ترکیبات فنلی مشخص شده است و عموماً فعالیت های آنتی اکسیدانی بالا را از طریق آزمایش های مختلف از قبیل: توانایی

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 بافت های گیاهی *E. angustifolium* شود (Monschein et al., 2015).

نتایج تجزیه و تحلیل GC/MS نشان داد که عمده ترکیبات شناسایی شده در جمعیت های تحت مطالعه فلاونوئیدها و ترکیبات فنلی است. تانن ها 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 تانن ها نیست. مطالعات نشان می دهد که پلی فنل ها ترکیبات اصلی در گیاه اپیلوبیوم هستند که از جمله آن فلاونوئیدها، اسید فنلیک و تانن ها جزو ترکیبات اصلی هستند (Granica et al., 2014). از ترکیبات فلاونوئیدی، مایرستین با مقدار متوسط ۱۳/۰۴ mg/gr در ماده خشک گیاه به ترتیب ترکیب غالب و عمده گروه ترکیبات فلاونوئیدی در جمعیت های *E. minutiflorum* بود. گزارش ها و نتایج مشابهی در خصوص غالب بودن و ترکیب عمده مایرستین در گروه ترکیبات فلاونوئیدی برای برخی گونه های اپیلوبیوم نیز ارایه شده است. بررسی میزان فلاونوئیدها در گونه های مختلف از سرده *Epilobium* نشان داده است که در *E. angustifolium* در مقایسه با گونه های دیگر گلیکوزید های کورستین ترکیب عمده و غالب فلاونوئیدها هستند در حالیکه در گونه های دیگر از جمله *E. hirsutum*, *E. roseum*, *E. fleischeri*, *E. dodonaei*, *E. tetragonum*, *E. montanum parviflorum* و چند گونه دیگر، مایرستین ترکیب عمده و غالب فلاونوئیدها 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 می دهد که در گونه *E. minutiflorum* نیز مانند اکثر گونه های سرده اپیلوبیوم مایرستین ترکیب عمده و غالب فلاونوئیدها است. دیگر ترکیبات عمده شناسایی شده در گروه فلاونوئیدها به ترتیب فراوانی مقدار تخمین زده شده کامفرول > کوئرستین > فلاونوئید ۱ > مایرستین 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

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، داده‌های آزمایشات فوتومتریک (ارایه شده در جدول ۲) در تأیید نتیجه گرفته شده است و بالا بودن ظرفیت آنتی‌اکسیدانی جمعیت شمشک را به دلیل غنی بودن از ترکیبات فنلی، تأیید می‌کند.

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، استیگماسترول، بتا-سیتوستول و گلایکوزیدهای آن و استرها در گونه‌های *E. parviflorum*, *E. angustifolium*, *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 تری‌ترین‌ها 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 تری‌ترین‌ها را دارا است این در حالی است که پژوهش‌های انجام شده به حضور اسید تری‌تریپونوئید به عنوان ترکیب مهم در قسمت‌های هوایی *E. angustifolium* اشاره کرده‌اند اما مطالعات اندکی در مورد تری‌ترین‌ها در سایر گونه‌های اپیلوبیوم وجود دارد (Glen et al., 1967; Granica et al., 2014)، لذا نتایج تحقیق حاضر از لحاظ حضور تری‌ترین‌ها 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 می‌توان 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 تحریک کننده 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 فیروبلاست 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 بیماری‌های التهابی پوست به مانند جراحات و زخم‌های بدن استفاده می‌شوند و بیان شده است که عصاره برگ و گل در این گیاه برای بسیاری از مشکلات پوستی نظیر آگزما، آکنه، سوختگی‌ها و زخم‌ها 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 شناسایی شده در جمعیت‌های *E. minutiflorum* با ارتفاع از سطح

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، داده‌های آزمایشات فوتومتریک (ارایه شده در جدول ۲) در تأیید نتیجه گرفته شده است و بالا بودن ظرفیت آنتی‌اکسیدانی جمعیت شمشک را به دلیل غنی بودن از ترکیبات فنلی، تأیید می‌کند.

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، استیگماسترول، بتا-سیتوستول و گلایکوزیدهای آن و استرها در گونه‌های *E. parviflorum*, *E. angustifolium*, *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 تری‌ترین‌ها 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 تری‌ترین‌ها را دارا است این در حالی است که پژوهش‌های انجام شده به حضور اسید تری‌تریپونوئید به عنوان ترکیب مهم در قسمت‌های هوایی *E. angustifolium* اشاره کرده‌اند اما مطالعات اندکی در مورد تری‌ترین‌ها در سایر گونه‌های اپیلوبیوم وجود دارد (Glen et al., 1967; Granica et al., 2014)، لذا نتایج تحقیق حاضر از لحاظ حضور تری‌ترین‌ها 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

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 دانشگاه علوم و تکنولوژی نروژ جهت فراهم آوردن بخشی از اجرای طرح تشکر می‌گردد.

### 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.
- Bazylo, 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., Piwowski, 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.

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 ترپینها بود (جدول ۳). به عبارتی افزایش محتوی ۳۰ ترکیب بخصوص در گروه فلاونوئیدها، فلیک 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 کوئرستین و نیز فلاونول را با افزایش ارتفاع نشان دهند و کوئرستین 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 آنتی‌اکسیدانی بالا مشخص شد. همچنین در نتایج به‌دست‌آمده 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 نگرفته‌اند و استانداردهای استفاده شده متفاوت هستند. علاوه بر این، 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 دی‌ترپینها، تری‌ترپینها، متیل استرها، معطر، اسید چرب اشباع

- 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., Jaendl, 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 oenothien 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 *Epilobium* 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., Tröst, 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 زیستی ۵: ۴۶۶-۴۷۸.