ارزیابی فیتوشیمیایی و آنتی اکسیدانی اسانس ریشه دو گونه *Achillea millefolium* L. و *Achillea biebersteinii* Afan. در رویشگاه طبیعی استان گیلان

فرشید رضایی[۱]، رشید جامعی[۲*]

[۱]گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ایران.

[۲]دانشیار، بخش بیوشیمی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۶/۲۶ ؛ تاریخ پذیرش:۱۳۹۶/۱۱/۲۳

چکیده

در سال‌های اخیر گزارش‌هایی از خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی ریشه برخی گونه‌های جنس بومادران (*Achillea*) ارائه شده است. این تحقیق با هدف ارزیابی عملکرد، تنوع فیتوشیمیایی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس ریشه دو گونه از بومادران هزار برگ (*Achillea millefolium* L.) و بومادران زرد (*Achillea biebersteinii* Afan.) انجام گرفت. بدین منظور این گیاهان در خرداد ماه ۱۳۹۵ از منطقه دوگاهه رودبار (۱۷۰۰ متری) واقع در استان گیلان جمع‌آوری شدند. پس از استخراج اسانس‌ها به روش تقطیر با آب (طرح کلونجر)، آنالیز اسانس به وسیله دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی (GC/MS) و جداسازی ترکیبات فنلی آنها با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) انجام شد. میزان فنل و فلاونوئید کل در اسانس‌ها به‌ترتیب با استفاده از معرف فولین سیو کالتو و کلرید آلومینیوم تعیین شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها نیز به روش ۲و۲ دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد، مواد موثره غالب در اسانس ریشه بومادران هزاربرگ به‌ترتیب شامل: ترپن‌های بتا- توجون (۱۸/۸۳ درصد)، دلتا- کادینن (۱۶/۸۷ درصد) و بورنئول (۱۴/۵۱ درصد) بودند در حالیکه مهمترین مواد موثره اسانس گیاه بومادران زرد به‌ترتیب ۱و۸- سینئول (۲۸/۸۲ درصد)، پی- سیمن (۱۵/۱۲ درصد) و کامفور (۸/۳۴ درصد) بودند. همچنین در این ارزیابی مشخص شد که گیاه بومادران هزار برگ با محتوای فلاونوئیدی کمتر (۵۴/۷۵ میلی گرم در هر میلی‌لیتر اسانس) در مقایسه با بومادران زرد (۷۲/۳۳ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر اسانس) از بیشترین درصد مهار رادیکال آزاد (۷۴ درصد) برخوردار بود.

واژه‌های کلیدی: اسانس، بتا-توجون، بومادران هزار برگ، بومادران زرد، محتوای فلاونوئیدی

*نویسنده مسئول:jamebio54@gmail.com

مقدمه

جنس بومادران (*Achillea*) متعلق به تیره کاسنی (Asteraceae) شامل ۱۳۰ گونه در جهان می‌باشد که بیشتر در اروپا و آسیا و قسمت‌هایی از آمریکای شمالی پراکنده هستند (Saeidnia et al., 2011). این جنس به‌دلیل سنتز مقادیر قابل توجهی متابولیت‌های ثانویه مخصوصا روغن‌های اسانسی از مهم‌ترین و ارزشمندترین گیاهان دارویی جهان بوده و کاربردهای گسترده‌ای در صنایع دارویی، آرایشی و بهداشتی دارند (Saeidnia et al., 2011). اسانس‌های گیاهی مخلوط پیچیده‌ای از مواد فرار و معطر هستند که در اندامهای مختلف گیاهان دارویی مانند برگ، گل، ساقه، دانه و ریشه یافت می‌شوند (Burt, 2004). کمیت و کیفیت مواد تشکیل دهنده اسانس‌ها می‌تواند تحت شرایط اقلیم، بافت خاک، مرحله رشد یا جمع‌آوری گیاه، سن و اندام‌های مختلف گیاه، متفاوت باشد (Rezaei et al., 2017; Ghani, 2008). خاصیت درمانی گیاهان دارویی اغلب مربوط به خصوصیات آنتی اکسیدانی آنها است. این ویژگی گیاهان اساساً مربوط به ترکیبات فنولی از قبیل فلاونوئیدها و اسیدهای فنل کربنیک است که می‌توانند باعث حفاظت سلول‌ها از آسیب‌های اکسیداتیو شوند (Figueroa et al., 2016; Baris et al., 2011). گزارشات مختلف نشان می‌دهند که مواد موثره گیاهان در طول رشد و نمو گیاه تحت تاثیر عواملی مانند ژنوتیپ و شرایط اکولوژیکی تغییر می‌کند (Saeidnia et al., 2011; Eghdami and Sadeghi, 2010; Rahimmalek et al., 2009)، بنابر این طبیعی است که خواص دارویی گیاه که وابسته به حضور این ترکیبات است نیز دچار تغییر شود. بومادران هزار برگ (*Achillea millefolium* L.) و بومادران زرد (*Achillea biebersteinii* Afan) دو گونه دارویی ارزشمند در این جنس هستند که پراکنش وسیعی در نواحی مختلف ایران دارند (Mozaffarian, 2009). در ایران که به‌عنوان یکی از مراکز اصلی تنوع این جنس در آسیا در نظر گرفته می‌شود، بیشتر تحقیقات بر روی شناسایی ترکیبات اسانس اندام‌های هوایی (برگ، گل و ساقه) این گیاهان دارویی متمرکز شده است (Abdossi and Kazemi, 2016; Gharibi et al., 2015; Rahimmalek et al., 2009; Ghani, 2008). ترکیب‌های اسانسی شناخته شده در این گیاهان در حال حاضر بیش از ۱۲۰ نوع ترکیب می باشد که از مهمترین آنها می‌توان به مونوترپن‌ها و سزکوئی ترپن‌های مختلف با غالبیت سینئول، کامفور، برنئول و کاریوفیلن اشاره کرد (Mockute and Judzentiene, 2003). برخی خواص آنتی‌اکسیدانی این جنس قبلاً در اسانس و بعضی عصاره‌های مختلف اندام‌های هوایی آنها گزارش شده است که این ویژگی بیشتر به حضور ترکیبات فنولی و سزکوئی ترپن‌های اکسیژن دار ارتباط داده شده است (Gharibi et al., 2015; Turkmenoglu et al., 2015). در چند سال اخیر گزارش‌هایی مبنی بر وجود انواع ترکیبات اسانسی و مواد موثره ارزشمند دیگر از ریشه گیاهان مذکور ارائه شده است که خاصیت دارویی این اندام را نشان می‌دهد (Lazarevic et al., 2010). بنابراین با توجه به این که اندام‌های مختلف گیاهان دارای ظرفیت متفاوتی برای تولید اسانس می‌باشند (Burt, 2004) و همچنین ریشه گیاهان دارویی جنس بومادران به‌عنوان یک منبع مهم اسانس (Lazarevic et al., 2010) در کشور ما نادیده گرفته شده است، تحقیق حاضر برای اولین بار از ایران و با هدف بررسی فیتوشیمیایی و آنتی‌اکسیدانی اسانس ریشه گونه‌های گیاهی بومادران هزار برگ (*Achillea millefolium* L.) و بومادران زرد (*Achillea biebersteinii* Afan)، در اقلیم معتدل در استان گیلان انجام شده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و منطقه مورد مطالعه: گونه‌های گیاهی بومادران هزار برگ (*Achillea millefolium* L.) و بومادران زرد (*Achillea biebersteinii* Afan.) در اواخر خردادماه سال ۱۳۹۵ در مرحله گلدهی از روستای داماش رودبار در استان گیلان جمع آوری شدند و ریشه‌های آنها بطور جداگانه در هرباریوم مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی استان گیلان خشک و نگهداری شدند. روستای ییلاقی داماش رودبار منطقه‌ای کوهستانی در شرق استان گیلان است و در ارتفاع ۱۷۵۰ متری از سطح آب‌های آزاد واقع است. این روستا در مختصات جغرافیایی ۴۹ درجه و ۴۸ دقیقه طول شرقی و ۳۶ درجه و ۴۴ دقیقه عرض شمالی در ۴۸ کیلومتری جنوب شرقی رودبار قرار گرفته است.

استخراج اسانس: برای تعیین درصد اسانس، از روش تقطیر با آب و از دستگاه کلونجراستفاده شد. برای این منظور از هر نمونه گیاهی، ۱۰۰ گرم ریشه خشک آسیاب شده به‌طور دقیق توزین شدند و اسانس آنها به‌مدت ۳ ساعت در آزمایشگاه دانشگاه ارومیه استخراج شد و بازده اسانس نیز بر اساس وزن خشک نمونه محاسبه گردید. اسانس‌های بدست آمده پس از رطوبت‌زدایی با سولفات سدیم بی آب تا زمان بررسی‌های کمی و کیفی، در ویال‌های شیشه‌ای استریل در بسته و در دمای ۴ درجه سلسیوس و تاریکی نگهداری شدند. در نهایت نیز اسانس‌ها جهت آنالیز کیفی به گروه شیمی دانشگاه تبریز ارسال گردید.

مشخصات دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف سنج جرمی (GC/MS): در این فرایند از دستگاه GC-MS Agilent 6890/5973 N ساخت کشور امریکا و با استفاده از ستون مویینه HP-5MS (به‌طول ۳۰ مترو قطر ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت فیلم ۰/۲۵ میکرومتر) ودمای محفظه تزریق ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. دمای اولیه ستون به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداشته شد و سپس تا ۲۶۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۰ درجه در دقیقه افزایش یافت. از گاز هلیم (H_e) با سرعت خطی یک میلی‌متر در دقیقه به‌عنوان حامل استفاده گردید. همچنین پارامترهای مربوط به آشکارسازی جرمی MS بدین شرح بود: انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت، دمای منبع یون ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد، ولتاژ دستگاه ۳۰۰۰ ولت، محدوده جرمی ۶۰۰-۳۰ و مقدار تزریق نمونه یک میکرولیتر. در نهایت شناسایی ترکیبات موجود در اسانس بوسیله مقایسه طیف‌های جرمی و زمان‌های بازداری (R_t) و اندیس کواتس (RI) بدست آمده با طیف‌های جرمی و زمان‌های بازداری و شاخص بازداری کواتس ترکیبات استاندارد موجود در بانک اطلاعاتی Wiley7n.1 و NIST 2008 صورت گرفت (Adams, 2001).

مشخصات دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC): در این آزمایش برای آنالیز ترکیبات فنلی از دستگاه HPLC مدل Knauer-2000 ساخت کشور آلمان استفاده شد. این سیستم داری آشکار ساز UV-Vis (با طول موج ۲۸۰ نانومتر) و ستون فاز معکوس C-18 ۵-۱۰۰ (طول ستون ۲۵ سانتی‌متر و قطر ستون ۴/۶ میلی‌متر و اندازه ذرات پایه ۵ میکرون) بود. همچنین ترکیب فاز متحرک به کار برده شده آب، استیک اسید ۲ درصد (A) و استونیتریل (B) بود. شستشوی ستون‌ها در شرایط ایزوکراتیک بدین شرح بود: در ۱۰ دقیقه اول بدون حضور محلول B، ۵ دقیقه بعدی ۰ تا ۲۰ درصد محلول B، در۱۰ دقیقه بعدی با ۲۰ تا ۲۵ درصد محلول B و در ۱۵ دقیقه بعدی با ۲۵ تا ۱۰۰ درصد محلول B انجام شد. در نهایت کروماتوگرام‌های حاصل از بارگذاری هر نمونه با کروماتوگرام‌های استاندارد مربوطه مقایسه و غلظت

ترکیبات بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن خشک محاسبه گردید (Rezaei et al., 2017).

سنجش محتوای فنل کل: برای انجام این آزمایش به ۲۰ میکرولیتر از اسانس‌های گیاهی، ۱میلی‌لیتر معرف فولین- سیوکالتئو (ده برابر رقیق شده) اضافه گردید. پس از ۵ دقیقه، ۰/۸ میلی‌لیترکربنات سدیم (۷/۵ درصد) به محلول اضافه شد. بعد از ۳۰ دقیقه جذب محلول در دمای اتاق و در طول موج ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. محتوای فنل کل با استفاده از منحنی استاندارد بر اساس میلی گرم اکی والان‌های گالیک اسید در گرم عصاره تعیین شد (Kahkonen et al., 1999).

سنجش محتوای فلاونوئیدی کل: برای انجام این آزمایش از روش رنگ سنجی و با استفاده از کلرید آلومینیوم با اندکی تغییر در روش استفاده شد. ۲۰ میکرولیتر از اسانس‌های گیاهی با ۱ میلی‌لیتر آب مقطر رقیق سازی شده و ۷۵ میکرولیتر نیتریت سدیم (۵ درصد) به آن‌ها اضافه شد. پس از ۵ دقیقه، ۰/۱۵ میلی‌لیتر کلرید آلومینیم (۱۰ درصد) به محلول اضافه گردید و بعد از ۶ دقیقه از انجام واکنش ۰/۵ میلی‌لیترهیدروکسید سدیم (یک مول بر لیتر) اضافه شده و با آب مقطر به حجم نهایی ۳ میلی‌لیتر رسانده شد. جذب محلول حاصل بلافاصله در طول موج ۵۱۰ نانومتراندازه گیری شد. محتوای فلاونوئیدی کل با استفاده از منحنی استاندارد بر اساس میلی گرم اکی والان‌های کوئرسیتین در گرم عصاره تعیین گردید (Shin et al., 2007).

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی با رادیکال پایدار DPPH: برای انجام آزمایش ابتدا باید غلظت‌های مختلفی از ترکیبات عصاره‌ها فراهم کرد. آماده‌سازی لوله‌های محتوی عصاره‌ها بر مبنای وزنی (w) صورت گرفت. بدین‌صورت لوله‌های محتوی ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ میکروگرم عصاره را تهیه کرده و حجم آنها بوسیله محلول DPPH به ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس غلظت‌های مختلف عصاره پس از بهم زدن به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی تثبیت شدند. در نهایت میزان جذب آنها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Biowave S2100, UK) در طول موج ۵۱۷ نانومتر در مقابل محلول بلانک اندازه گیری شدند. در نهایت درصد مهارکنندگی هر یک از عصاره‌ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (Zijia et al., 2009).

$$DPPH\ (\%) = [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$$

در این فرمول A_0 جذب محلول کنترل و A_1 جذب محلول‌های حاوی اسانس‌ها بود. همچنین در این تحقیق IC_{50} (غلظت مهار ۵۰ درصد) اسانس‌ها از منحنی درصد مهار بدست آمد و برای اطمینان و دقت بیشتر آزمایش‌ها به‌صورت سه تکرار انجام پذیرفت و میانگین آنها گزارش گردید.

تجزیه و **تحلیل آماری**: همه سنجش‌های شیمیایی در سه تکرار انجام شدند و نتایج بصورت مقادیر میانگین و خطای استاندارد میانگین (SE) بیان شدند. مقایسه میانگین بین گونه‌های گیاهی مورد مطالعه با استفاده از آنالیز واریانس یک سویه (ANOVA) در سطح آماری ۵ درصد ($p<۰/۰۵$) بررسی و مقایسه شدند (آزمون Tukey).

نتایج

پس از آنالیز اسانس‌ها برای اولین بار از شمال ایران در اسانس سبز رنگ (با بازده ۳/۶ درصد) ریشه گیاه بومادران هزار برگ ۲۰ ترکیب (۹۷/۴۶ درصد) شناسایی گردید که از بین آنها ۹ ترکیب شیمیایی از نوع مونوترپنی (۶۴/۵۲ درصد) و ۱۱ ترکیب دیگرسزکوئی ترپنی (۳۲/۹۴ درصد) بودند. همچنین در این ارزیابی بتا- توجون با بیشترین مقدار(۱۸/۸۳درصد)، به‌عنوان ترکیب شاخص و دلتا-

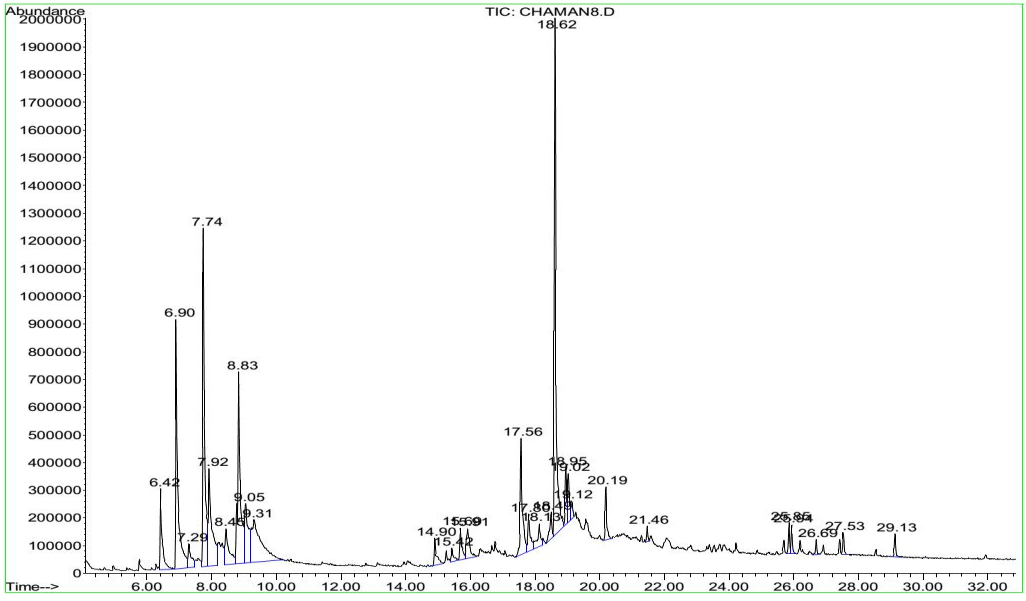
کادینن (۱۶/۸۷درصد)، بورنئول (۱۴/۵۱درصد)، آرتیمزیاکتون (۱۱/۷۳درصد) و ایزوبورنئول (۸/۴۹ درصد)، به‌عنوان ترکیبات عمده و اصلی اسانس گونه گیاهی مذکور شناسایی شدند (جدول۱ و شکل۱). همان‌طور که از جدول ۱ (شکل ۲) مشاهده می‌شود از آنالیز اسانس آبی‌رنگ (با بازده ۳/۵ درصد) ریشه بومادران زرد ۲۵ ترکیب (۹۷/۱۲ درصد) شناسایی گردید که از بین آنها ۱۱ ترکیب شیمیایی از نوع مونوترپنی (۷۵/۱۹ درصد) و ۱۴ ترکیب دیگرسزکوئی ترپنی (۲۱/۹۳درصد) بودند. همچنین در این ارزیابی ۱و ۸- سینئول (۲۸/۸۲درصد) به عنوان ترکیب شاخص اسانس، و پی- سیمن (۱۵/۱۲درصد)، کامفور (۸/۳۴ درصد)، آلفا- ترپینن (۶/۰۲ درصد) و کریزانتنون (۵/۲۳ درصد) عمده‌ترین ترکیب‌های اسانس گونه مذکور بودند.

به‌دلیل اهمیت ترکیب‌های فنلی در گیاهان و تاثیر آنها برسلامتی انسان (Figueroa et al., 2016) و همچنین برای بررسی ظرفیت دارویی اسانس‌های مورد نظر، شناسایی و تعیین مقدار ۹ ترکیب فنلی با روش کروماتوگرا فی مایع با کارایی بالا (HPLC) انجام شد. همان طور که در جدول ۲ مشخص است ترکیبات فنلی از نظر نوع و مقدار متفاوت هستند. در اسانس ریشه بومادران هزار برگ ۶ ترکیب فنولی شناسایی شدند که شاخص‌ترین آنها سیناپیک اسید و سیرینژیک اسید با مقادیر ۷/۷±۰/۰۶ و ۳/۰۳±۰/۰۶ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک بودند. همچنین اسیدهای فنولی فرولیک، گالیک و روتین شناسایی نشدند. در اسانس ریشه بومادران زرد از بین ۷ ترکیب فنولی سیناپیک اسید (۱۳/۳۱±۰/۴ میلی‌گرم بر گرم) و سیرینژیک اسید (۱۰/۲±۰/۱ میلی‌گرم بر گرم) به‌عنوان بیشترین ترکیب‌های فنلی ارزیابی شدند. بر خلاف گونه قبلی روتین که نوعی فلاونوئید گلیکوزیده است در این اسانس تشخیص داده شد.

جدول ۱: مقایسه مواد تشکیل‌دهنده اسانس (بر حسب درصد) ریشه‌های بومادران هزار برگ و بومادران زرد.

ترکیب	اندیس بازداری (RI)	*A. millefolium*	*A. biebersteinii*
Myrcene	۹۹۰	-	۰/٤
Yomogi alcohol	۹۹۸	۱/۴۵	–
α-Terpinene	۱۰۱۷	–	۶/۲
Verbenone	۱۰۲۵	۲/۱۵	–
p-Cymene	۱۰۲۷	۱/۱۴	۱۵/۱۲
1,8-Cineol	۱۰۳۴	۳/۱۸	۲۸/۸۲
Artemisia ketone	۱۰۶۳	۱۱/۷۳	۲/۵۲
β-Thujone	۱۱۱۶	۱۸/۸۳	–
Chrysanthenon	۱۱۲۵	–	۵/۲۳
Camphor	۱۱۴۵	۲/۷۸	۸/۳۴
Isoborneol	۱۱۵۸	۸/۴۹	–
Borneol	۱۱۶۷	۱۴/۵۱	–
Terpinen-4-ol	۱۱۷۶	–	۳/۵۱
α-Terpino	۱۱۸۸	–	۳/۱۵
Isopiperitenon	۱۲۷۰	–	۱/۵۲
Thymol	۱۲۸۹	–	۱/۲۲

α-Cubebene	۱۳۵۱	۰/۸۹	۲/۳۱
α-Copaene	۱۳۷۶	–	۲/۵۵
α-Gurjunen	۱۴۰۷	۱/۲۸	–
β-Caryophyllene	۱۴۱۸	۰/۵	۰/۵
α-Guaiene	۱۱۴۲	۰/۵۸	–
Aromadendrene	۱۴۴۵	–	۲/۸۱
α-Humulene	۱۴۵۵	–	۰/۸۱
Germacrene D	۱۴۸۳	–	۱/۲
Valencene	۱۴۹۱	–	۱/۸
Bicyclogermacrene	۱۴۹۲	–	۰/۸
Ledene	۱۵۰۱	۰/۹۸	–
α–Bulnesene	۱۵۰۳	–	۰/۸۲
γ-Cadinene	۱۵۱۵	۱/۹۹	۰/۵۱
δ-Cadinene	۱۵۲۵	۱۶/۸۷	۰/۶
Caryophyllene oxide	۱۵۸۲	۶/۳۵	۰/۸
Isoaromadendrene epoxide	۱۶۰۲	۳/۵۱	–
β-Selinenol	۱۶۴۴	۱/۵۴	۲/۵۴
α-Santalol	۱۶۸۱	۳/۵۶	–
Zierone	۱۷۷۲	–	۳/۸۸
Oxygenated monoterpenes	۶۴/۵۲	۵۳/۴۷	
Monoterpene hydrocarbons		۰	۲۱/۷۲
Oxygenated sesquiterpene	۹/۸۵	۷/۲۲	
Sesquiterpene hydrocarbons	۲۳/۰۹	۱۴/۷۱	
Total	**۹۷/٤٦**	**۹۷/۱۲**	

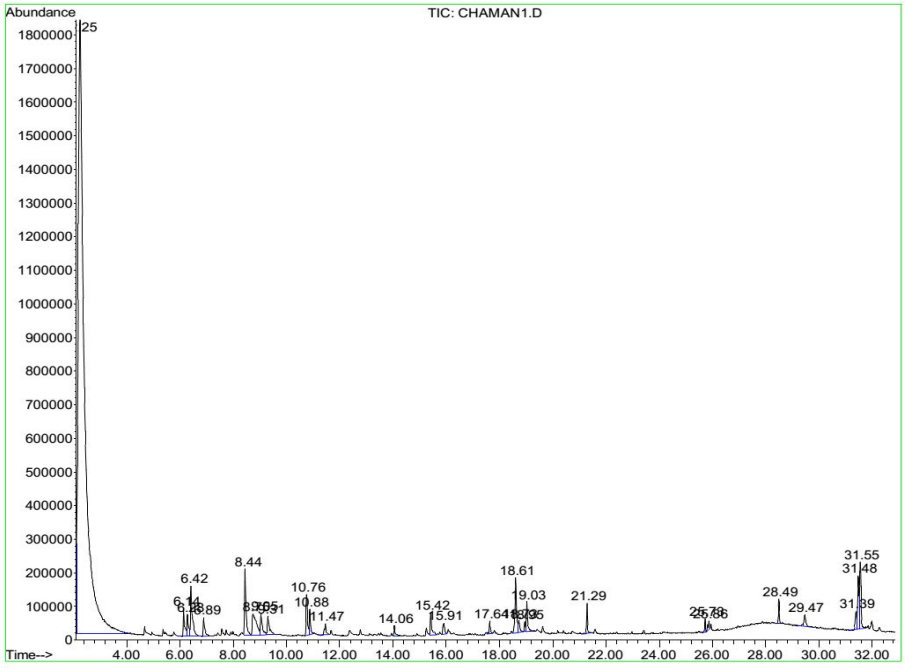


شکل ۱: کروماتوگرام اسانس ریشه بومادران هزار برگ (*Achillea millefolium* L.)

جدول ۲: مقایسه انواع ترکیبات فنلی موجود در اسانس (میلی‌گرم بر گرم) ریشه‌های بومادران هزار برگ و بومادران زرد.

ترکیبات فنلی	منحنی استاندارد	*A. millefolium*	*A. biebersteinii*
Rutin	Y=۲۰۱۱۹۲۸x –۱۳۹۲۹۵۶	-	۱/۸± ۰/۰۸
Galic acid	Y=۲۳۷۲۰۰۸/۶x – ۱۵۷۶۹۵۲/۱	-	-
Caffeic acid	Y=۱۲۷۸۴۰۶/۲x – ۱۸۵۳۱۵۳/۷	۲/۹۸± ۰/۱	-
4-Hydroxy benzoic acid	Y=۷۶۲۸۹۵x –۷۳۳۳۱۷	۲/۸۵± ۰/۰۷^{b}	۵/۱۸± ۰/۶^{a}
Vanillic acid	Y=۳۱۵۹۰۵۰/۴x –۲۹۶۰۹۳	۰/۲۱± ۰/۰۱^{a}	۰/۲۱± ۰/۰۲^{a}
P-coumaric acid	Y=۸۲۸۸۷x –۵۹۰۴۱	۱/۴۴± ۰/۰۵^{b}	۴/۲۹± ۰/۳^{a}
Syringic acid	Y=۱۳۵۷۱/x – ۳۶۸۲/۹	۳/۰۳± ۰/۰۶^{b}	۱۰/۲± ۰/۱^{a}
Ferulic acid	Y=۱۶۵۱۳۸x –۱۳۶۵۵۳	–	۳/۳۹± ۰/۱
Sinapic acid	Y=۱۶۵۱۳۸x –۱۳۶۵۵۳	۷/۷± ۰/۰۶^{b}	۳۱/۱۳± ۰/۴^{a}

بر طبق آزمون توکی در هرردیف حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار و حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است ($p<0.05$, N=3).



شکل۲: کروماتوگرام اسانس ریشه بومادران زرد (*Achillea biebersteinii* Afan)

جدول ۳: مقایسه محتوای فنل کل (TPC) و فلاونوئید کل (TFC) و ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی در دو گیاه بومادران هزار برگ و بومادران زرد.

نمونه‌ها	محتوای فنل کل	محتوای فلاونوئید کل	فعالیت آنتی اکسیدانی	
	mg (GAE/g)	mg (QE/g)	DPPH (%)	IC_{50} (µg/mL)
A. millefolium	۱۰۸/۱ ± ۰/۵^{a}	۵۴/۷۵ ± ۲/۵^{b}	۷۴/۸۷ ± ۰/۹^{b}	۲۹/۷۵ ± ۰/۹^{b}
A. biebersteinii	۱۰۶/۹۴ ± ۰/۸^{a}	۷۲/۳۳ ± ۲/۱^{a}	۵۱/۴۶ ± ۰/۷^{c}	۴۲/۲۳ ± ۰/۵^{a}
Gallic acid	-	-	۹۳/۱۲ ± ۰/۴^{a}	۰/۱۵ ± ۰/۰۱^{c}
Ascorbic acid	-	-	۹۲/۳۰ ± ۰/۲^{a}	۰/۱۶ ± ۰/۰۱^{c}

بر طبق آزمون توکی در هر ستون حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار و حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است ($p<0.05$, N=3).

تاکنون هیچ گزارشی در مورد خصوصیات آنتی‌اکسیدانی اسانس ریشه این دو گیاه از ایران و خارج ارائه نشده است اما به دلیل اهمیت آنها در صنایع غذایی و دارویی این ویژگی‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند. با توجه به جدول ۳ مشاهده می‌شود که محتوای فنل کل در اسانس ریشه بومادران هزار برگ با مقدار ۰/۵±۱۰۸/۱ میلی‌گرم اکی والان‌های اسیدگالیک بر گرم اندکی بیشتر از میزان فنول کل در اسانس بومادران زرد با مقدار ۰/۸±۱۰۶/۹ میلی‌گرم اکی والان‌های اسیدگالیک بر گرم این گیاه می‌باشد اما بین میزان ترکیبات فنولی کل مشاهده شده در اسانس این دو گیاه از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری مشاهده نمی‌شود ($P<0/05$). مقایسه آماری محتوای فلاونوئیدی کل در اسانس‌های ذکر شده تفاوت معنی‌داری را نشان می‌دهد. به‌طوری‌که مقدار آن در اسانس بومادران هزار برگ ۲/۵±۵۴/۷۵ میلی‌گرم اکی والان‌های کوئرسیتین بر گرم و در اسانس بومادران زرد ۲/۱±۷۲/۳۳ میلی گرم اکی والان‌های کوئرسیتین بر گرم بوده است. جدول ۳ مشخص می کند که اسانس ریشه بومادران هزار برگ (۷۴ درصد) درصد مهار رادیکال آزاد بالاتری نسبت به اسانس بومادران زرد (۵۱ درصد) دارد و با افزایش غلظت در اسانس هر دو گیاه درصد مهار رادیکال آزاد DPPH افزایش می یابد. آنالیز داده‌ها نشان داد که از نظر قدرت مهارکنندگی، اسانس‌های مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری با یکدیگر داشتند.

بحث

با توجه به نتایج بدست آمده مشخص شد که اسانس‌های ریشه بومادران هزار برگ و بومادران زرد دارای ترکیبات فنلی متفاوت با غالبیت مشتقات اسید هیدروکسی بنزوئیک می باشند (جدول۲). همچنین در این مطالعه ارزیابی توان آنتی اکسیدانی اسانس‌ها انجام گرفت و نتایج بررسی‌ها نشان داد که این گونه‌ها دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی می‌باشند و اینکه با توجه به نتایج این آزمایش‌ها مشخص شد که اسانس بومادران هزاربرگ با محتوای فنلی بیشتر فعالیت آنتی‌اکسیدانی بهتری نسبت به اسانس بومادران زرد دارا می باشد (جدول۳). تجزیه و شناسایی اسانس ریشه دو گیاه بومادران هزار برگ و بومادران زرد نشان داد که بیشترین نوع ترکیبات اسانسی آنها از گروه مونوترپن‌های اکسیژن دار است و در برخی ترکیبات اساسی مانند پی- سیمن، ۱و۸- سینئول، کامفور، گاما- کادینن، دلتا- کادینن و کاریو فیلن اکساید مشترک هستند (جدول۱). بررسی مقالات مختلف نشان می دهد که تعداد کمی گزارش در خصوص خواص فیتوشیمیایی ریشه جنس بومادران وجود دارد و اسانس ریشه گیاهان مورد نظر تاکنون مورد بررسی قرار نگرفته است. نتایج حاصل از پژوهش‌های مختلف نشان داده‌اند که ترکیبات فنلی موجود در گیاهان یکی از بهترین منابع آنتی اکسیدانهای طبیعی هستند (Gharibi et al., 2015; Djurdjevic et al., 2013). معمولاً مکانیسم ترکیبات فنلی برای فعالیت آنتی‌اکسیدانی، خنثی کردن رادیکال‌های آزاد لیپید و ممانعت از تجزیهٔ پراکسیدهای هیدروژن به رادیکال‌های آزاد است و اینکه غلظت و تنوع پلی فنول‌ها در اندامهای گیاه، به گونه، نوع اندام و مرحلهٔ رشد گیاه بستگی دارد (Figueroa et al., 2016; Turkmenoglu et al., 2015). در برخی گزارشات علمی خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی اسانس گونه‌های مختلف جنس بومادران به ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی نسبت داده شده است (Polatoglua et al., 2013). بررسی‌های فیتوشیمایی پلاتاگلو و همکاران از ترکیه (Polatoglua et al., 2013) و همچنین قریبی و همکاران از ایران (Gharibi et al., 2015) در زمینه

عملکرد دارویی اندام‌های هوایی گیاهان بومادران هزار برگ و بوماران زرد و همچنین ارتباط آنها با میزان ترکیبات پلی فنلی و خواص آنتی اکسیدانی صورت گرفته است که نتایج تحقیق حاضر را مورد تایید قرار می‌دهد. بنابراین نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که اسانس ریشه هر دو گیاه به‌دلیل حضور ترکیبات پلی فنلی متفاوت و فراوان دارای فعالیت آنتی اکسیدانی قابل توجهی بوده و می‌توانند به‌عنوان آنتی اکسیدان‌های طبیعی در صنعت غذایی و دارویی مورد توجه قرار گیرند. یافته‌های این تحقیق در جدول ۱ (شکل‌های ۱ و ۲) بیانگر آن است که کمیت و کیفیت مواد موثره اسانس ریشه در شرایط مختلف، در دو گیاه مورد تحقیق متفاوت است. به‌طوری‌که مواد ترپنی بتا- توجون و دلتا- کادینن بیشترین مواد موثره اسانس در ریشه گیاه بومادران هزار برگ و ۱و۸- سینئول و پی- سیمن مهمترین ترکیب در گیاه بومادران زرد بوده است. نتایج بررسی قریبی و همکاران (Gharibi at al., 2015) بر روی ترکیب شیمیایی اسانس اندام‌های هوایی بومادران هزاربرگ از استان البرز نشان داد که بازده اسانس این گیاه ۰/۴۶ درصد (در ۵۰ گرم وزن خشک نمونه) و ترکیبات عمده آن برنئول (۳۵/۹ درصد)، کامفور (۱۸/۸ درصد) و جرماکرن- دی (۱۲/۳ درصد) بودند. در تحقیق دیگری خیری و همکاران (Kheiry et al., 2012) اسانس اندام‌های هوایی چندین جمعیت رویشگاهی بومادران هزار برگ ایران را بررسی کردند و نشان دادند که ترکیبات عمده در این گونه گیاهی از گروه مونوترپن‌های اکسیژن دار بودند. درگزارشی از ترکیه ۵۷ ترکیب از اسانس برگ و گل گیاه بومادران هزار برگ معرفی شده است که سزکوئی ترپن‌های اکسیژن داری مانند آلفا بیزا بولول (۱۱/۷ درصد) و کاریوفیلن اکساید (۷/۷ درصد) مواد غالب این ترکیبات بودند (Turkmenuglu et al., 2015).

همچنین نتایج تحقیق حاضر نشان داد که ترکیبات موجود در اسانس ریشه گیاه بومادران زرد با ترکیبات موجود دراسانس این گونه خودرو در سایر نقاط ایران تفاوت دارد. در تحقیقی در ایران گزارش شده است که ۱و۸- سینئول (۳۲/۸۲ درصد)، کارواکرول (۱۰/۵۸ درصد) و پیپریتون (۷/۳۴ درصد) عمده ترین ترکیبات ترپنی اسانس (با بازده وزنی ۰/۸ درصد) این گیاه هستند (Ghani et al., 2009). همچنین در نتایج پژوهش آنها مشخص شد که ترکیبات مونوترپنی اکسیژن دار (۷۵/۸۵ درصد) بیشترین مواد شیمیایی و سزکوئی ترپن‌ها (۲/۱۸ درصد) کمترین مواد شیمیایی تشکیل دهنده اسانس بودند. در حالیکه در بررسی ما میزان مونوترپن‌های اکسیژن دار کمتر بوده (۵۳/۴۷ درصد) و سزکوئی ترپن‌ها نیز فراوانتر بودند (۲۱/۹۳ درصد). کمیت و کیفیت مواد تشکیل دهنده اسانس بومادران زرد رویش یافته در شمال کشور نیز با موارد گزارش شده از کشورهای دیگر متفاوت است، به‌طوری‌که در گزارشی از ترکیه مجموع مونوترپن‌ها در حدود ۶۶ درصد و مجموع سزکوئی ترپن‌ها در حدود ۱۱ درصد ذکر شده اند که از بین آنها ترکیب پی- سیمن (۱۸/۶ درصد) به عنوان اصلی ترین و هگزا دکانوئید اسید (۱۱/۲ درصد) و بتا- دسمول (۱۰ درصد) به عنوان عمده ترین ترکیبات ترپنی شناخته شده‌اند (Turkmenoglu et al., 2015). همچنان که مشخص است نتایج بدست آمده تنوع فیتوشیمیایی بالایی را در مقایسه با میزان اسانس و نوع ترکیب‌های تشکیل دهنده نمونه‌های مناطق مختلف ایران و سایر نقاط دنیا نشان می‌دهد. تفاوت‌های مشاهده شده در این تحقیقات می‌تواند مربوط به تفاوت‌های محیطی و ژنتیکی از جمله اختلاف در نوع اندام گیاه باشد (Kleinwachter and Selmar, 2015). تفاوت در ترکیب اسانس‌های

مختلف، خصوصیات آنتی‌اکسیدانی آنها را تحت تاثیر قرار می‌دهد. (Turkmenoglu et al., 2015).

نتیجه‌گیری نهایی

این کار تحقیقی اولین گزارش در مورد ترکیب شیمیایی و فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس ریشه دو گیاه بومادران هزار برگ و بومادران زرد با رشد طبیعی در شمال ایران می‌باشد. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که بخش عمده ترکیبهای تشکیل دهنده اسانس ریشه این گیاهان، مونوترپن‌های اکسیژن دار بودند. همچنین این ارزیابی مشخص کرد که اسانس‌ها علاوه بر دارا بودن پتانسیل آنتی اکسیدانی بالا دارای ترکیبات فنولی با غالبیت مشتقات اسید هیدروکسی بنزوئیک می باشند. بنابراین با توجه به نتایج ثابت شد که اسانس‌های مورد مطالعه منبع بسیار قوی از ترکیبات فعال زیستی ارزشمند بوده و می‌توانند در زمینه علوم پزشکی و صنایع غذایی مورد توجه و بررسی بیشتری قرار گیرند.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه ارومیه و با همکاری مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی استان گیلان انجام شده است که بدینوسیله تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1.Abdossi, V. and Kazemi, M. 2016. Bioactivities of *Achillea millefolium* essential oil and its main terpenes from Iran. International Journal of Food Properties, 19(8): 1798-1808.

2.Adams, R.P. 2001. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy: Carol Stream, IL Allured Publishing Co. 8(16): 76-81.

3.Bariş, D., Kizil, M., Aytekin, C., Kizil, G., Yavuz, M., Çeken, B. and Ertekin, A. 2011. In vitro antimicrobial and antioxidant activity of ethanol extract of three *Hypericum* and three *Achillea* species from Turkey. International Journal of Food Properties, 14: 339–355.

4.Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. International Journal of Food Microbiolog, 94: 223-253.

5.Djurdjevic, L., Gajic, G., Jaric, S., Kostic, O., Mitrovic, M. and Pavlovic, P. 2013. Analysis of benzoic and cinnamic acid derivatives of some medicinal plants in serbia. Archives of Biological Sciences, 65: 603-609.

6.Eghdami, A. and Sadeghi, F. 2010. Determination of total phenolic and flavonoids contents in methanolic and aqueous extract of *Achillea Millefolium*. The Organic of Chemistry, 2: 81-84.

7.Figueroa, F., Marhuenda, J., Cerda, B., Zafrilla, P., Martínez-Cacha, A., Tejada, L., Villano, D. and Mulero, J. 2016. HPLC-DAD Determination and availability of phenolic compounds in 10 genotypes of walnuts. International Journal of Food Properties, 20(3):1-33.

8.Ghani, A., Azizi, M., Hassanzadeh-Khayyat, M. and Pahlavanpour, A.A. 2008. Essential oil composition of *Achillea eriophora, A. nobilis, A. biebersteinii* and *A. wilhelmsii* from Iran. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 11(5): 460-467.

9.Gharibi, S., Tabatabaei, B. and Saeidi, G. 2015. Comparison of essential oil composition, flavonoid content and antioxidant activity in eight *Achillea* species. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 18(6): 1382-1394.

10.Kahkonen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K. and Kujala, T.S. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47(10): 3954-3962.

11.Kheiry, A., Sefidkon, F., Delshad, M., Fattahi Moghaddam, M.R. and Izadi, A. 2012. Phytochemical variation of

essential oils of *Achillea millefolium* L. from different habitats of Iran. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 28 (4):767-779.

12. Kleinwachter, M. and Selmar, D. 2015. New insights explain that drought stress enhances the quality of spice and medicinal plants: potential applications. Agronomy for Sustainable Development, 35(1): 121-131.
13. Lazarevic, J., Radulovic, N., Zlatkovic, B. and Palic, R. 2010. Composition of *Achillea distans* Willd. subsp. *distans* root essential oil. Natural Product Research, 24 (8): 718-731.
14. Mockute, D. and Judzentiene, A. 2003. Variability of the essential oils composition of *Achillea millefolium* ssp. millefolium growing wild in Lithuania. Biochemical Systematics and Ecology, 31(9):1033-1045.
15. Mozaffarian V. 2009. A Dictionary of Iranian Plant Names, Farhang Moaser Publishers. Tehran, Iran.
16. Polatoglua, K., Karakoc, O.C. and Goren, N. 2013. Phytotoxic, DPPH scavenging, insecticidal activities and essential oil composition of *Achillea vermicularis*, *A .teretifolia* and proposed chemotypes of *A. biebersteinii* (Asteraceae). Industrial Crops and Products, 51(1): 35- 45.
17. Rahimmalek, M., Sayed-Tabatabaei, B.E., Etemadi, N., Goli, S.A.H., Arzani, A. and Zeinali, H. 2009. Assessment of genetic diversity among and within *Achillea* species using amplified fragment length polymorphism (AFLP). Biochemical Systematics and Ecology, 37(4): 354-361.
18. Rezaei, F., Jamei, R., Heidari, R. and Maleki, R. 2017. Chemical composition and antioxidant activity of oil from wild *Achillea setacea* and *A. vermicularis*. Intenational Journal of Food Properties, 20(7): 1522-1531.
19. Saeidnia, S., Gohari, A.R., Mokhber-Dezfuli, N. and Kiuchi, F. 2011. A Review on Phytochemistry and medicinal properties of the genus *Achillea*. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences,19(3): 173-186.
20. Shin, Y., Liu, R.H., Nock, J.F., Holliday, D. and Watkins, C.B. 2007. Temperature and relative humidity effects on quality, total ascorbic acid, phenolic and flavonoid concentrations, and antioxidant activity of strawberry. Postharvest Biology and Technology, 45(3):349-357.
21. Turkmenoglu, F.P., Tuncay, O., Akaydin, G., Hayran, M. and Demirci, B. 2015. Characterization of volatile compounds of eleven *Achillea* species from Turkey and biological activities of essential oil and methanol extract of A. hamzaoglui Arabac & Budak. Molecules, 20(6): 11432-458.
22. Zijia, Z., Liping, L., Jeffrey, M., Tao, W. and Zhengtao, W. 2009. Antioxidant phenolic compounds from walnut kernels (*Juglans regia* L.). Food Chemistry, 113: 160-165.