





## Evaluation of Antioxidant Activity, Phenolic, and Flavonoid Content of *Tussilago farfara L.* in Different Altitudes and Phenological Stages

Mohammad Rahim Forouzeh<sup>1\*</sup> , Abolfazl Sharifian<sup>1</sup> , Hasan Yeganeh<sup>1</sup> , Hoda Shahiri Tabarestani<sup>2</sup> 

<sup>1</sup> Dept of Rangeland Management, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

<sup>2</sup> Dept of Food industry, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

### Article Info

#### Article type:

Research article

#### Article History:

Received: 04 December 2021

Revised: 01 March 2022

Accepted: 06 April 2022

Published Online: 04 October 2022

#### \* Correspondence to:

Mohammad Rahim Forouzeh  
Dept of Rangeland Management,  
Gorgan University of Agricultural  
Sciences and Natural Resources,  
Gorgan, Iran.

Email: forouzeh@gau.ac.ir

### ABSTRACT

**Introduction:** *Tussilago farfara L.* is a perennial forb belonging to the Asteraceae family. The leaves and flowers of this plant have medicinal properties, and its essential oil has been used for the treatment of dry coughs and inflammation of the mouth, throat, and respiratory tract. This study aimed to assess some phytochemical characteristics of *Tussilago farfara L.* and compare changes in this plant at different altitudes.

**Material & Methods:** To investigate the changes in the amount of the effective substance of the studied plant in the altitude gradient, altitude classes of 1100-2600 meters were considered in Golestan province, Iran, considering the presence and abundance of the species. In each phenological stage (before and after flowering time), plant samples were randomly collected in each altitude class and transferred to the laboratory. Total phenol content and flavonoid content were measured using the Folin-Ciocalteu and aluminum chloride methods, respectively. The antioxidant activity of the methanolic extract was also evaluated using the DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) reagent.

**Findings:** The results showed that the highest amounts of total phenol content, flavonoids, and antioxidant activity were observed at altitudes above 2200 meters, and there was a significant difference in plants (*Tussilago farfara L.*) grown in different altitudes in terms of phytochemical properties. Based on the comparison of phytochemical properties of this plant in different phenological stages, the highest content of total phenol and flavonoids were observed in the phenological stage of flowering and the highest (42.08%) antioxidant activity of leaves was observed in the vegetative stage.

**Discussion & Conclusion:** The results of this study can help activists in the field of medicinal plants to determine the appropriate height range and phenological stage in harvesting the leaves of this plant to achieve the highest levels of phenol content, flavonoids, and antioxidant activity.

**Keywords:** Antioxidants, Environmental factors, Flavonoids, Medicinal plants, Phenol

### ➤ How to cite this paper

Forouzeh MR, Sharifian A, Yeganeh H, Shahiri Tabarestani H. Evaluation of Antioxidant Activity, Phenolic, and Flavonoid Content of *Tussilago farfara L.* in Different Altitudes and Phenological Stages. Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2022;30(4): 15-26.

## بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و تعیین محتوای فنولی و فلاونوئیدی گیاه دارویی Tussilago farfara L. در طبقات ارتفاعی مختلف و مراحل فنولوژی

محمد رحیم فروزه\*<sup>۱</sup>، ابوالفضل شریفیان<sup>۱</sup>، حسن یگانه<sup>۱</sup>، هدی شهری طبرستانی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> گروه مدیریت مرتع، دانشکده مرتع و آبخیزداری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران

<sup>۲</sup> گروه شیمی مواد غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران

### چکیده

### اطلاعات مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۱۳

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۰/۱۲/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۱۷

تاریخ انتشار: ۱۴۰۱/۰۷/۱۲

نویسنده مسئول:

محمد رحیم فروزه

گروه مدیریت مرتع، دانشکده مرتع

و آبخیزداری، دانشگاه علوم

کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،

ایران.

Email: forouzeh@gau.ac.ir

**مقدمه:** گیاه علفی چندساله پای خر (Tussilago farfara L.) از خانواده Asteraceae است که برگ‌ها و گل‌های آن خاصیت دارویی دارد و از مواد مؤثر آن برای معالجه سرفه‌های خشک و درمان التهاب‌های دهان، گلو و مجاری تنفسی استفاده می‌شود؛ بنابراین، هدف از این مطالعه بررسی برخی ویژگی‌های فیتوشیمیایی گیاه پای خر (Tussilago farfara L.) و مقایسه تغییرات آن در طبقات ارتفاعی مختلف و مراحل فنولوژی است.

**مواد و روش‌ها:** برای بررسی روند تغییرات میزان ماده مؤثر گیاه مورد بررسی در گرادیان ارتفاعی، با توجه به حضور و فراوانی گونه، طبقات ارتفاعی ۱۱۰۰ تا ۲۶۰۰ متری در استان گلستان انتخاب شد. به منظور نمونه‌برداری از گیاه در مراحل فنولوژی (پیش از گلدهی، زمان گلدهی و پس از گلدهی) در هر طبقه ارتفاعی، به‌طور تصادفی از گیاه در هر یک از پنج طبقه ارتفاعی، نمونه‌ها جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل گردید. در پژوهش حاضر محتوای فنول کل با استفاده از روش فولین سیوکالتو، محتوای فلاونوئید با روش آلومینیوم کلرید و همچنین بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی تهیه‌شده با استفاده از معرف DPPH صورت گرفت.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد، بیشترین مقادیر محتوای فنول کل، فلاونوئید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در ارتفاعات بالاتر از ۲۲۰۰ متر است و اختلاف معنی‌داری میان طبقات ارتفاعی به لحاظ ویژگی‌های فیتوشیمیایی وجود داشت. یافته‌های تحقیق در بررسی و مقایسه خصوصیات فیتوشیمیایی گیاه در میان مراحل مختلف فنولوژی نشان داد، بالاترین مقدار محتوای فنول کل و فلاونوئید در مرحله فنولوژی گلدهی و بالاترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی برگ گیاه در مرحله رویشی با مقدار ۴۲/۰۸ درصد مشاهده شد.

**بحث و نتیجه‌گیری:** نتایج این مطالعه اطلاعات ارزشمندی در تعیین دامنه ارتفاعی و مرحله فنولوژی مناسب در برداشت برگ این گیاه، به‌منظور دستیابی به بالاترین مقادیر محتوای فنول، فلاونوئید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی، برای دسترسی فعالان در زمینه گیاهان را دارویی فراهم آورد.

**واژه‌های کلیدی:** آنتی‌اکسیدان، فنول، فلاونوئید، گیاهان دارویی، عوامل محیطی

← **استناد:** فروزه، محمد رحیم؛ شریفیان، ابوالفضل؛ یگانه حسن؛ شهری طبرستانی، هدی. بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و تعیین محتوای فنولی و فلاونوئیدی گیاه دارویی Tussilago farfara L. در طبقات ارتفاعی مختلف و مراحل فنولوژی. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، آبان ۱۴۰۱؛ ۳۰(۴): ۱۵-۲۶.

در قرن اخیر، به دلیل بروز عوارض جانبی و سپس ایجاد و افزایش روبه رشد بیماری‌های التهابی ناشی از مصرف داروهای شیمیایی، استفاده از گیاهان دارویی بومی در نواحی کوهستانی که از سابقه دیرینه در پیشگیری و درمان بیماری‌ها به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی برخوردارند، بسیار ضروری است و تحقیقات درباره استخراج ترکیب‌های فعال بیولوژیکی از گیاهان به‌سرعت در حال انجام است (۱). ارزش آن گیاهان بیشتر به‌سبب تولید و عملکرد ترکیبات شیمیایی ثانویه است که برخی از مهم‌ترین آن ترکیبات شامل آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، کومارین‌ها، تانن‌ها، ساپونین‌ها، تریپنوئیدها و ترکیبات فنلی است (۲). ظهور گونه‌های دارویی تحت تأثیر عوامل محیطی نظیر عوامل اقلیمی، توپوگرافی، خاک رویشگاه و همچنین روابط بین‌گونه‌ای است و بسته به نوع و نیازهای اکولوژیک گونه‌ها، یک یا چند عامل محیطی بیشترین اثر را در استقرار آن‌ها دارند (۳). میزان متابولیت‌های ثانویه تحت کنترل ژن‌ها است؛ اما مقدار، غلظت و تجمع آن‌ها به‌طور چشمگیری تحت تأثیر شرایط محیطی است (۴)؛ بنابراین، میزان و کیفیت مواد مؤثر یک گیاه دارویی در رویشگاه‌ها و مناطق مختلف تغییر می‌کند و علت این امر نوسان فعالیت متابولیکی گیاه تحت تأثیر عوامل مختلف محیطی است (۵).

استان گلستان در شمال ایران، با تنوع اقلیمی و جغرافیایی خاص، بستر مناسبی را برای رشد انواع گونه‌های دارویی بومی و خودرو از جمله گیاه پای خر ( *Tussilago farfara* L.) فراهم آورده است. پای خر گیاه علفی چندساله از خانواده کاسنی است. این گیاه گونه‌ای مهاجم است و در غرب و شمال آسیا، شمال آفریقا و اروپا گسترش دارد. پای خر در خاک‌های مرطوب باغ‌ها، به‌طور خودرو می‌روید و معمولاً در خاک‌های آهکی، مناطق مرطوب، علفزارها و مراتع، به‌صورت خودرو جوامع انبوهی را تشکیل می‌دهد. این گیاه در زمین‌هایی که اسیدیته آن بین ۴/۵ تا ۷/۵ باشد، پراکنش دارد. برگ‌ها دمبرگ دار و کرک دار و ساقه گل‌دهنده به طول ۱۵-۵ سانتیمتر، پوشیده با برگ‌های فلسی

شکل ارغوانی است. پای خر ریزوم‌های منشعب نازک دارد و گل‌های زرد (کاپیتول) در حال توسعه در اوایل بهار، پیش از برگ‌ها ظاهر می‌شوند. پراکندگی جغرافیایی آن در ایران، نواحی مرطوب استان‌های گلستان، مازندران و منطقه آذربایجان و ارتفاعات البرز است (۶).

برگ‌ها و گل‌های پای خر خاصیت دارویی دارند و از مواد مؤثر این گیاه برای معالجه سرفه‌های خشک و درمان التهاب‌های دهان، گلو و مجاری تنفسی استفاده می‌شود. مواد مؤثر پای خر خاصیت ضد عفونی‌کنندگی نیز دارد. عصاره پای خر دارای ترکیبات فعال زیستی مانند موسیلاژ (پلی ساکاریدهای محلول در آب) و فنولیک‌ها (فلاونوئیدها، تانن‌ها و اسیدهای فنولی) است. از عصاره پای خر در صنایع بهداشتی و آرایشی در تهیه شامپوهای گیاهی و کرم استفاده می‌شود (۴). پای خر یکی از گیاهان دارویی رایج استفاده‌شده در چین، شمال آفریقا، سبیری و اروپا است و جوانه گل آن بیش از ۲۰۰۰ سال است که برای درمان سرفه، خلط، برونشیت و شرایط مربوط به آسم به‌کار می‌رود (۷). برگ پای خر به‌طور سنتی برای درمان عفونت نایژه استفاده می‌شود (۸). برگ پای خر طیف گسترده‌ای از فعالیت علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی را به نمایش می‌گذارد و نتایج استفاده از این گیاهان در طب سنتی برای درمان بیماری‌های مختلف ریه و عفونت‌های تنفسی را تأیید می‌کند (۹). عصاره ریشه پای خر فعالیت ضد رادیکال بسیار پائینی در مقایسه با عصاره گل و برگ دارد (۱۰). عصاره پای خر حاوی ترکیبات باارزش آنتی‌اکسیدانی فعالی است که می‌تواند در پیشگیری یا کند کردن پیشرفت استرس‌های اکسیداتیو مختلف مفید باشد (۱۱).

از آنجا که اکوسیستم و عوامل اکولوژیک نقش عمده‌ای در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه دارند و با در نظر گرفتن اینکه استخراج و شناسایی متابولیت‌های ثانویه به‌عنوان شاخص مهم ارزیابی کیفیت گیاهان دارویی می‌تواند به روشن ساختن ارزش غذایی و دارویی و عوارض جانبی آن‌ها کمک شایانی کند؛ بنابراین، همواره باید به مطالعه تأثیر

دامنه های مشرف به راه ارتباطی شهرستان گرگان به شاهرود در استان گلستان برداشت شده است (شکل شماره ۲). منطقه مطالعه شده از ارتفاعات پایین و حد فاصل جنگل تا ارتفاعات بالا که حد فاصل مرتع است، امتداد می یابد (۶).

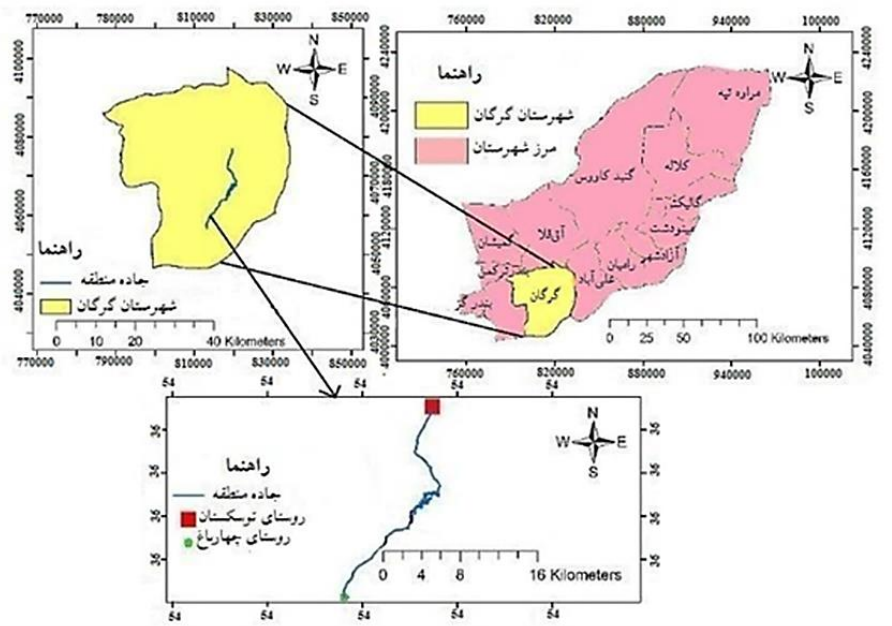


شکل شماره ۱. الف. گیاه پای خر؛ ب. رویشگاه گیاه در منطقه مطالعه شده

تغییرات اکوسیستم و عوامل اکولوژیک بر تولیدات متابولیتی گیاهان پرداخت. بدین منظور، مطالعات بسیاری در رابطه با عوامل اکولوژیک از جمله ارتفاع از سطح دریا بر خصوصیات مورفولوژیک گیاهان و همچنین عطر مایه و مواد مؤثر گیاهان صورت گرفته است؛ زیرا ارتفاع از سطح دریا نقش اساسی در رشد و تولید گیاهان در رویشگاه های طبیعی مختلف ایفا می کند و از جمله عوامل مهم و تعیین کننده در کمیت و کیفیت مواد مؤثر و ترکیبات شیمیایی در گیاهان محسوب می شود؛ از این رو، این مطالعه در نظر دارد به بررسی و مقایسه تغییرات متابولیت های ثانویه شامل محتوای فنول کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی اکسیدانی در طول گرادیان ارتفاعی پردازد.

### مواد و روش ها

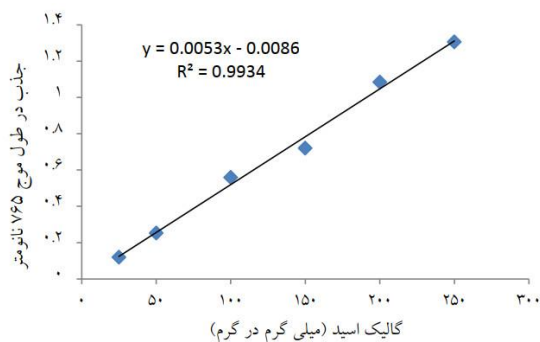
گیاه *Tussilago farfara* گیاهی است از خانواده کاسنی (Asteraceae) با ساقه زیرزمینی، برگ ها دمبرگ دار، با پهنکی به طول و عرض ۲۰-۸ سانتیمتر و کرک دار، ساقه عریان و گل دار به طول ۱۵-۵ سانتیمتر، به حالت میوه دار به طول تا ۳۰ سانتیمتر که در حالت ایستاده و پس از گلدهی به صورت سر به زیر مشاهده می شوند (شکل شماره ۱). این گیاه از منطقه بین توسکستان و سر علی آباد، از



شکل شماره ۲. موقعیت جغرافیایی منطقه مطالعه شده (۱۲)

سانتی گراد)، جذب آن‌ها در طول موج ۷۲۰ نانومتر نسبت به شاهد ثبت شد (دستگاه اسپکتروفتومتر تک‌پرتویی یووی ویزیبیل). اسید گالیک به‌عنوان استاندارد برای رسم منحنی استاندارد به کار رفت. محتوای فنول کل عصاره‌ها بر اساس میلی گرم معادل اسید گالیک بر گرم وزن خشک اندام گیاه بررسی شده گزارش گردید. منحنی استاندارد (شکل شماره ۳) بر اساس گالیک‌اسید با غلظت‌های ۵۰ تا ۲۵۰ ذره در میلیون رسم شد. با استفاده از معادله خط منحنی استاندارد، میزان ترکیبات فنولی معادل گالیک‌اسید در هر گرم پودر خشک اندازه‌گیری گردید.

*اندازه‌گیری محتوای فلاونوئید: میزان فلاونوئید کل به روش رنگ سنجی آلومینیوم کلراید و با استفاده از کوئرستین به‌عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد (۱۳). برای برآورد میزان فلاونوئید کل، ۵۰۰ میکرولیتر از هر عصاره داخل هر لوله آزمایش ریخته شد. ۲/۸ میلی لیتر آب مقطر به هر لوله اضافه گردید؛ سپس ۱/۵ میلی لیتر متانول (۸۰ درصد) به هر لوله افزوده شد. پس از آن، ۱۰۰ میکرولیتر محلول آلومینیوم کلراید (۱۰ درصد) و ۱۰۰ میکرولیتر محلول استات پتاسیم یک مولار اضافه گردید. جذب مخلوط پس از گذشت ۴۰ دقیقه، در طول موج ۴۱۵ نانومتر نسبت به شاهد اندازه‌گیری شد. شاهد حاوی همه ترکیبات ذکر شده در بالا بود؛ اما به‌جای عصاره، همان حجم حلال به آن اضافه گردید. میزان فلاونوئید کل عصاره‌ها بر اساس میلی گرم معادل کوئرستین بر گرم وزن خشک اندام‌های گیاه مطالعه شده گزارش شد. محلول‌های استاندارد با*



شکل شماره ۳. نمودار استاندارد فنول کل برحسب گالیک‌اسید

روش جمع‌آوری گیاه: برای بررسی روند تغییرات میزان ماده مؤثر گیاه بررسی شده در گرادیان ارتفاعی، با توجه به حضور و فراوانی گونه، طبقات ارتفاعی ۱۱۰۰، ۱۴۰۰، ۱۸۰۰، ۲۲۰۰ و ۲۶۰۰ متری در رویشگاه مدنظر انتخاب گردید. برداشت اندام برگ از گیاه در طول گرادیان ارتفاعی در رویشگاه مدنظر صورت گرفت. ملاک تعیین مناطق انتخاب شده وجود اختلاف طبقات ارتفاعی در شیب و جهت یکسان بود. به‌منظور نمونه‌برداری از گیاه در مراحل فنولوژی (پیش از گلدهی، زمان گلدهی و پس از گلدهی)، در هر طبقه ارتفاعی به‌طور تصادفی از برگ گیاه برداشت و در مجموع، ۳ نمونه از پنج طبقه ارتفاعی جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شد.

*عصاره‌گیری: از نمونه‌های گیاهی مناطق معرف، پس از خشک شدن عصاره‌گیری گردید. یک گرم از پودر نمونه در لوله آزمایش ریخته شد. ۱۰ میلی‌لیتر از متانول ۸۰ درصد به هر یک از نمونه‌ها اضافه گردید. نمونه‌ها روی شیکر (مدل بهداد ساخت ایران) به مدت ۲۴ ساعت گذاشته شد؛ سپس به مدت ۱۵ دقیقه با دمای ۳۴ درجه سانتی‌گراد، در حمام اولتراسونیک قرار گرفت و پس از آن، به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ گردید. درنهایت، نمونه‌ها از کاغذ صافی واتمن عبور داده و صاف شد.*

*محتوای فنولی: میزان فنول کل بر اساس روش رنگ سنجی فولین سیوکالتو و با استفاده از گالیک‌اسید، به‌عنوان استاندارد اندازه‌گیری گردید (۱۳). برای برآورد میزان فنول کل، ۲۰ میکرولیتر از نمونه عصاره درون لوله آزمایش ریخته شد (با استفاده از نمونه‌گیر). ۱/۱۶ میلی لیتر آب مقطر به هر نمونه اضافه گردید. ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالتو (۵۰ درصد) به نمونه افزوده شد. ۳۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم (۲۰ درصد) اضافه گردید. پس از قرار دادن عصاره در بن‌ماری (مدل بهداد ساخت ایران) و گذشت ۳۰ دقیقه (حمام آب گرم با ۴۰ درجه*



آزاد:

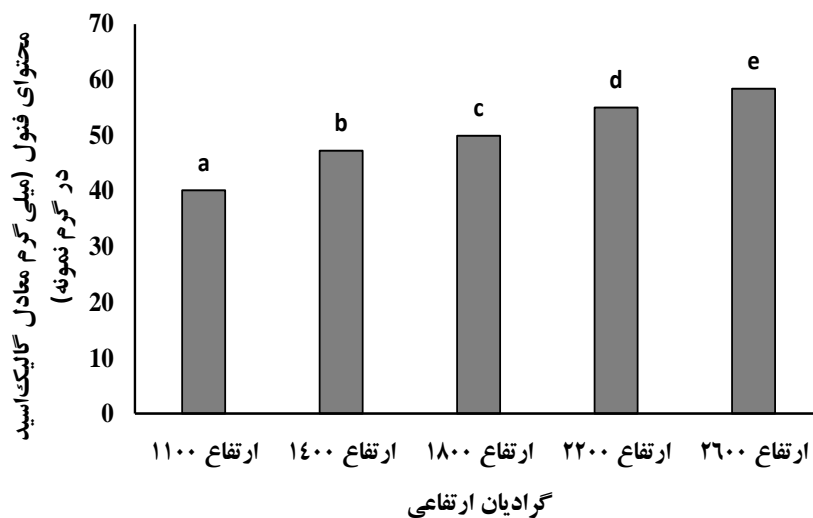
$$I(\%) = \left[ \frac{A_{blank} - A_{sample}}{A_{blank}} \right] \times 100$$

که در آن،  $A_{blank}$  جذب نمونه شاهد (بدون عصاره گیاهی) و  $A_{sample}$  جذب نمونه بود.

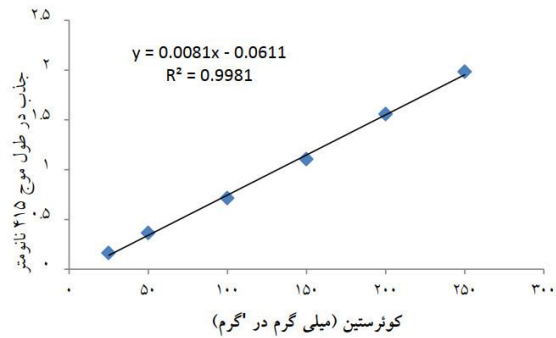
آنالیز آماری: تجزیه و تحلیل داده‌ها در محیط نرم‌افزار SPSS با به‌کارگیری آنالیز واریانس یک‌طرفه ANOVA، با استفاده از آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد انجام شد.

### یافته‌ها

تغییرات ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدان گیاه پای خر در طول گرادیان ارتفاع: در مقایسه میزان فنول کل در میان طبقات مختلف ارتفاعی از ۱۱۰۰ تا ۲۶۰۰ متر، اختلاف معناداری ( $P < 0.05$ ) میان همه طبقات مشاهده گردید (شکل شماره ۵). پایین‌ترین میزان فنول کل با مقدار ۴۰/۱۳ میلی‌گرم معادل گالیک‌اسید در گرم ماده خشک، در پایین‌ترین حد ارتفاعی یعنی ۱۱۰۰ متر دیده شد و با افزایش ارتفاع، مقدار آن افزایش یافت، به‌طوری‌که در ارتفاع ۲۶۰۰ متر میزان به آن به ۵۸/۳۹ میلی‌گرم معادل گالیک‌اسید در گرم ماده خشک رسید.



شکل شماره ۵. میزان محتوای فنول کل برگ پای خر در طول گرادیان ارتفاعی

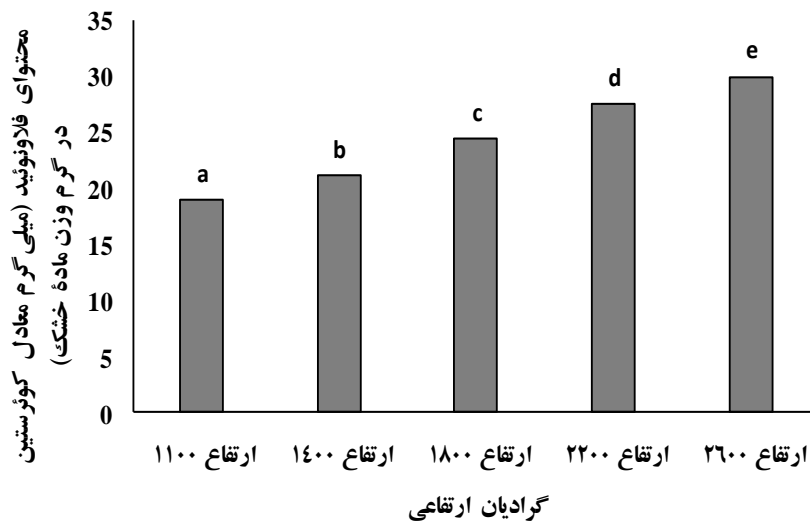


شکل شماره ۴. نمودار استاندارد فلاونوئید کل بر حسب کوئرستین

غلظت ۵۰ تا ۲۵۰ ذره در میلیون از کوئرستین تهیه گردید. منحنی استاندارد (شکل شماره ۴) بر اساس غلظت‌های مختلف کوئرستین ترسیم و میزان فلاونوئید کل با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه شد.

اندازه‌گیری آنتی‌اکسیدان: برای برآورد فعالیت آنتی‌اکسیدان از روش DPPH استفاده گردید (۱۳). ۵۰۰ میکرولیتر از هر عصاره داخل هر لوله آزمایش ریخته شد. ۰/۵ میلی‌لیتر معرف DPPH به هر محلول اضافه گردید. محلول آماده شده به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفت؛ سپس میزان جذب آن در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفتومتر قرائت شد. درنهایت، با استفاده از معادله شماره ۱، درصد به دام اندازی رادیکال‌های آزاد DPPH اندازه‌گیری گردید.

معادله شماره ۱. درصد به دام اندازی رادیکال‌های



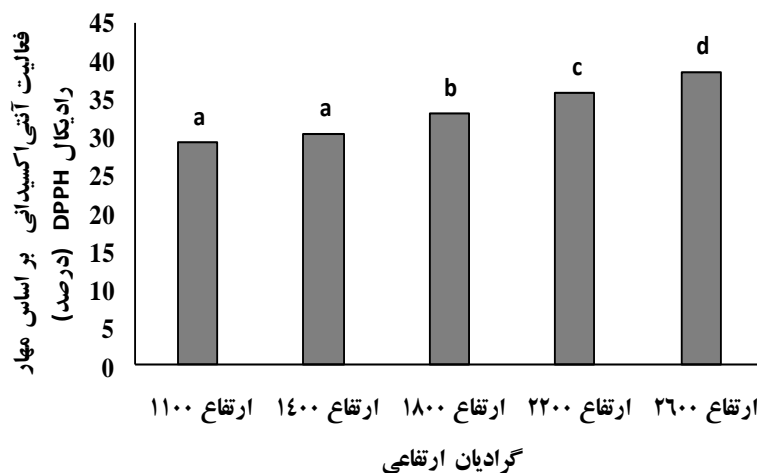
شکل شماره ۶. میزان محتوای فلاونوئید کل برگ پای خر در طول گرادبان ارتفاعی

مختلف ارتفاعی از ۱۱۰۰ تا ۲۶۰۰ متر، اختلاف معناداری از ۱۱۰۰ تا ۲۶۰۰ متر، اختلاف معناداری (P<0.05) میان همه طبقات ارتفاعی مشاهده گردید (شکل شماره ۷). پایین ترین میزان فعالیت آنتی اکسیدانی با مقدار ۲۹/۲۱ درصد، در پایین ترین طبقه ارتفاعی یعنی ۱۱۰۰ متر از سطح دریا دیده شد و با افزایش ارتفاع، مقدار فعالیت آنتی اکسیدانی بر اساس مهار رادیکال DPPH افزایش یافت، به طوری که در ارتفاع ۲۶۰۰ متر از سطح دریا، مقدار آن به ۳۸/۵۴ رسید.

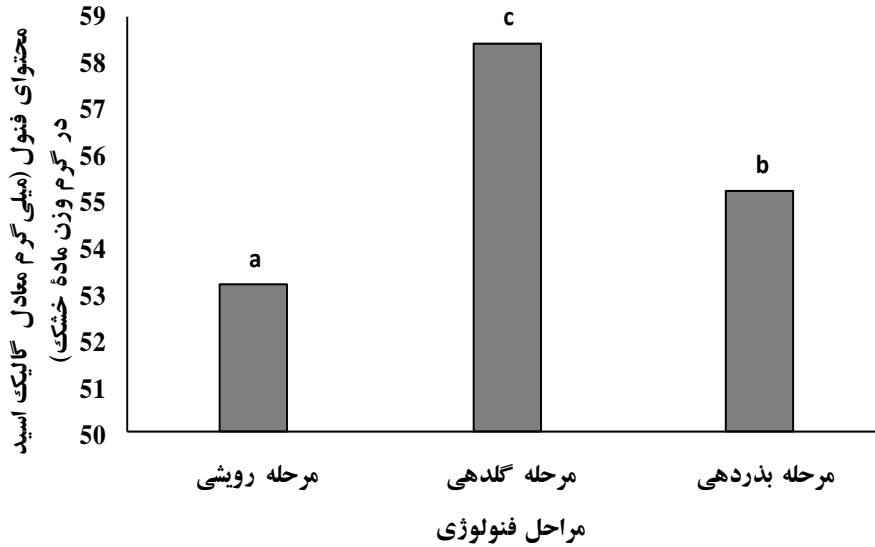
تغییرات ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی اکسیدان گیاه پای خر در مراحل رویشی: در مقایسه مراحل مختلف

در مقایسه میزان فلاونوئید کل در میان طبقات ارتفاعی از ۱۱۰۰ تا ۲۶۰۰ متر، اختلاف معناداری (P<0.05) میان همه طبقات ارتفاعی مشاهده گردید (شکل شماره ۶). پایین ترین میزان فلاونوئید کل با مقدار ۱۹/۰۱ میلی گرم معادل کوئرستین در گرم ماده خشک، در پایین ترین حد ارتفاعی یعنی ۱۱۰۰ متر از سطح دریا دیده شد. با افزایش ارتفاع، مقدار فلاونوئید کل افزایش پیدا کرد، به طوری که مقدار آن در ارتفاع ۲۶۰۰ متر، به ۲۹/۹۸ میلی گرم معادل کوئرستین در گرم ماده خشک رسید.

در مقایسه میزان فعالیت آنتی اکسیدانی در میان طبقات



شکل شماره ۷. میزان فعالیت آنتی اکسیدانی برگ پای خر بر مبنای درصد مهار رادیکال DPPH در طول گرادبان ارتفاعی

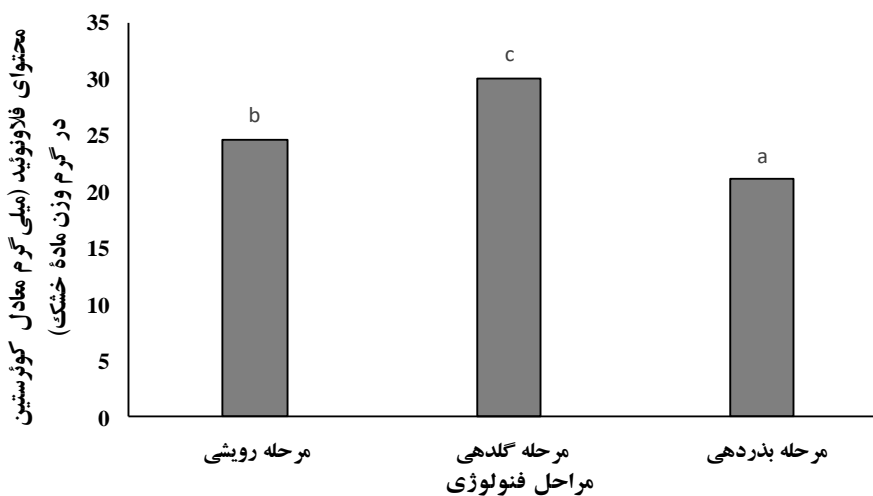


شکل شماره ۸. میزان محتوای فنول کل برگ پای خراطی مراحل فنولوژی

در مقایسه مراحل مختلف فنولوژی به لحاظ محتوای فلاونوئید کل نیز اختلاف معنی داری ( $P < 0.05$ ) میان مراحل رویشی، گلدهی و بذردهی مشاهده گردید (شکل شماره ۹). بر اساس نتایج، پایین ترین میزان فلاونوئید کل با مقدار ۲۱/۰۱ میلی گرم معادل کوئرستین در گرم وزن ماده خشک، در مرحله بذردهی و بالاترین مقدار آن در مرحله گلدهی، با مقدار ۲۹/۹۸ میلی گرم معادل کوئرستین در گرم وزن ماده خشک دیده شد.

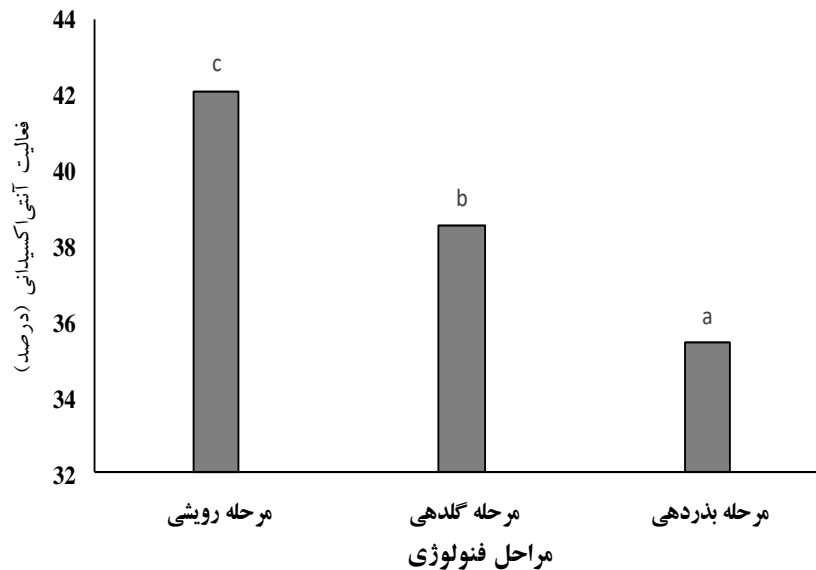
مقایسه میزان فعالیت آنتی اکسیدانی بر اساس مهار رادیکال DPPH نشان داد، اختلاف معناداری ( $P < 0.05$ )

فنولوژی به لحاظ محتوای فنول کل، اختلاف معناداری ( $P < 0.05$ ) میان مراحل رویشی، گلدهی و بذردهی مشاهده گردید (شکل شماره ۸). بر اساس نتایج، بالاترین سطح محتوای فنول کل با مقدار ۵۸/۳۹ میلی گرم معادل گالیک اسید در گرم وزن خشک، در مرحله گلدهی دیده شد (شکل شماره ۷). گفتنی است، مراحل بذردهی (با مقدار ۵۵/۲۱ میلی گرم معادل گالیک اسید در گرم وزن ماده خشک) و رویشی (۵۳/۱۹ میلی گرم معادل گالیک اسید در گرم وزن ماده خشک) به ترتیب محتوای فنول کل پایین تری داشتند.



شکل شماره ۹. میزان محتوای فلاونوئید کل برگ پای خراطی مراحل فنولوژی





شکل شماره ۱۰. میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی برگ پای خر بر اساس مهار رادیکال DPPH طی مراحل فنولوژی

گیاهان است و کاهش نور در طول رویش گیاه سبب کاهش اندازه گل‌ها و درنهایت، کاهش مقدار مواد شیمیایی مؤثر در آنها شده است (۱۸، ۱۹). برخی از پژوهشگران نیز با اثبات وجود ارتباط میان ویژگی‌های روشنیابی و تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی بیان کردند که در بسیاری از گیاهان، افزایش زمان نوردی باعث افزایش ترکیبات و تغییر در ساختار عطرمایه می‌شود (۱۴، ۱۳). بررسی اثر عوامل محیطی بر تغییرات ترکیبات شیمیایی عطرمایه گونه دارویی بومادران نیز نشان داده است که مهم‌ترین عوامل محیطی مؤثر بر تغییرات میزان عطرمایه گونه بومادران به ترتیب دما (۰/۸۶۱) و ارتفاع از سطح دریا (۰/۵۶۵-) بوده است (۱۵).

در توضیح تغییرات ترکیبات فعال زیستی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان باید گفت که گیاهان سازوکارهای شیمیایی و ساختاری متعددی را نمو داده‌اند تا در برابر آسیب‌ها خود را حفظ کنند. پلی‌فنول‌ها طبقه گسترده‌ای از ترکیبات آلی با ویژگی آنتی‌اکسیدانی هستند که تقریباً در همه گیاهان موجود در ارتفاعات شناسایی شده است (۲۰). این گیاهان در ارتفاعات برای مقابله با تابش‌های فرابنفش ترکیبات فنولی خود را افزایش می‌دهند (۲۱). کارایی فرایند فتوسنتز، تولید گونه‌های فعال شیمیایی و دامنه‌ای که برگ‌ها در گیاهان دچار خسارت نوری می‌شوند، تحت

میان مراحل مختلف فنولوژی شامل فاز رویشی، گلدهی و بذردهی وجود دارد (شکل شماره ۱۰). پایین‌ترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی بر اساس مهار رادیکال DPPH با مقدار ۳۵/۴۳ درصد، در مرحله بذردهی و بالاترین میزان آن در مرحله رویشی، با مقدار ۴۲/۰۸ درصد تعیین شد.

### بحث و نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه افزایش محتوای فنل کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدان با افزایش ارتفاع از ۱۱۰۰ متر تا ۲۶۰۰ را نشان داد. این بخش از نتایج با یافته‌های برخی محققان داخل و خارج ایران همخوانی داشت (۱۴، ۱۵). علت کلی این مسئله می‌تواند تغییرات ایجادشده در محیط ناشی از افزایش ارتفاع باشد؛ زیرا افزایش ارتفاع باعث ایجاد تغییرات در درجه حرارت و مقدار رطوبت می‌شود. افزایش ارتفاع با کاهش دما، افزایش شدت نور و افزایش شدت وزش باد همسو است (۱۶). برخی پژوهشگران نیز به این نتیجه رسیده‌اند که گونه‌های گیاهی که در یک ارتفاع مطلوب از سطح دریا هستند، بیشترین فعالیت متابولیت‌های ثانویه را دارند (۱۷، ۲۵). دلیل این مسئله همچنین می‌تواند به صورت اختصاصی، ناشی از دریافت تابش بیشتر نور خورشید در ارتفاعات باشد؛ زیرا افزایش زمان تابش نور مؤثرترین عامل در ترکیبات شیمیایی

تأثیر دسترسی به نور و مواد مغذی قرار می‌گیرند. انرژی نوری جذب‌شده تحت شرایط نور شدید فراتر از ظرفیت نرخ آنزیم فتوسنتز است. حتی گیاهانی که بیشترین سرعت رشد را دارند و دارای بالاترین نرخ فتوسنتز هستند، نیز نمی‌توانند بیش از نیمی از نوری را استفاده کنند که برگ‌های آن‌ها طی ساعت‌های اوج تابش نور خورشید جذب می‌کند (۲۲). سایر گیاهان معمولی ممکن است در حدود ۱۰ درصد از نور جذب‌شده برای فرایند فتوسنتز را استفاده کنند (۲۳). مقدار ۲۲ تا ۵۱ درصد انرژی نوری مازاد، بدون هیچ‌گونه خطری، در چرخه‌گزارتوفیل در گیاهان سازگار با سایه و خورشید از بین می‌رود؛ در نتیجه این چرخه و فرایندهای این‌چنینی تخمین‌زده می‌شود که در حدود ۸-۲ درصد از انرژی خورشیدی جذب‌شده کماکان می‌تواند مازاد باشد (۲۴).

نتایج مطالعات نشان داده است که تحت شرایط نور شدید، مقدار فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش پیدا می‌کند (۲۵). به لحاظ کارکردی، این پاسخ گیاهان منطقی به نظر می‌رسد؛ زیرا از این طریق می‌توانند گونه‌های فعال شیمیایی را خنثی کنند یا اثر آن‌ها را فرو بنشانند و به‌موجب آن، خسارت نوری بالقوه را کاهش دهند. شواهد فراوانی وجود دارد که نشان می‌دهد، دامنه‌ای از ترکیبات فنلی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی دارند و ممکن است گیاهان را در برابر خسارت نوری حفظ کنند. فلاونوئیدها که ترکیبات فنولی با وزن مولکولی پایین هستند، خواص آنتی‌اکسیدانی قوی دارند و ممکن است به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌های فیزیولوژیکی در گیاهان عمل کنند (۲۶). مطالعات مکرراً نشان داده است که غلظت ترکیبات فنولی برگ در گیاهان تحت شرایط نور شدید یا کمبود مواد مغذی افزایش پیدا می‌کند (۲۸، ۲۷).

نتایج این مطالعه مقادیر بالاتر محتوای فنول کل و فلاونوئید کل در مرحله گلدهی و مقادیر بالاتر فعالیت آنتی‌اکسیدانی در مرحله رویشی، در مقایسه با سایر مراحل را نشان داد. مطالعات بسیاری نشان داده است که گیاهان علفی اوج ترکیبات فنولی در مراحل زایشی خود

را دارند (۳۰، ۲۹). علت این مسئله در گیاهان علفی می‌تواند افزایش رخ داده در فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیلایز (PAL) در مرحله زایشی باشد که موجب افزایش ترکیبات فنولی در مرحله گلدهی می‌شود (۳۱). به‌طورکلی، سنتز و تجمع متابولیت‌های ثانویه پیچیده است و تحت تأثیر عامل‌های داخلی (ژن‌های تنظیم‌کننده و آنزیم‌ها) و عوامل بیرونی (نور، دما، آب، شوری و...) قرار می‌گیرد (۳۲).

تغییرات در محتوای ترکیبات فنولی طی مراحل فنولوژی می‌تواند با رخداد تغییرات بیوشیمیایی و تفاوت در پاسخ گیاهان نسبت به تنش‌های محیطی در مراحل مختلف فنولوژی مرتبط باشد؛ همچنین دما عامل محیطی مهمی است که مراحل فنولوژی گیاه و تولید متابولیت‌های ثانویه را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۳۳). پایش محتوای فیتوشیمیایی و کیفیت آن‌ها در مراحل فنولوژی گیاه می‌تواند نشان‌دهنده الگوهای تجمع این ترکیبات باشد؛ همچنین تعیین مرحله فنولوژی مناسب برای برداشت گیاهان، در کسب بالاترین ترکیبات شیمیایی با بهترین کیفیت برای صنعت دارو یا غذا کمک می‌کند (۳۵).

### تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از طرح پژوهشی با شناسه ۱۰-۴۱۲-۹۸ با حمایت مالی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان به انجام رسیده است؛ همچنین هیچ‌کدام از نویسندگان این مطالعه، افراد و یا دستگاه‌ها تعارض منافی برای انتشار این مقاله ندارند. بدین وسیله، نویسندگان از حمایت‌های معاونت پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان در جهت به انجام رسیدن این تحقیق مراتب تشکر و قدردانی خود را اعلام می‌نمایند.

### تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ تضادی در منافع ندارند.

## References

- Crozier A, Clifford MN, Ashihara H. Plant secondary metabolites. Blackwell Publisher. 2006; P.383. doi: 10.1086/519595
- Akinmoladun AC, Emmanuel Afor EM, Farombi EO. Phytochemical constituent and antioxidant activity of extract from the leaves of *Ocimum gratissimum*. J Sci Res Essay 2007; 2: 163-66. doi: 10.5897/SRE.9000731
- Foroozeh MR, Heshmati Gh, Barani H. Ethnographic plant of edible and medicinal species of Dilgan rangeland, Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad provinces. J Anthropol res 2014; 1: 109-23. (In Persian). doi: 10.22054/QJK.2020.50142.1192
- Omid Beigi R. Production and processing of medicinal plants. Astan Quds Razavi Publications. 2014; P.397. (In Persian)
- Yousefi M, Nazeri V, Mirza M. Effects of environmental conditions on the quantity and quality of *Salvia leriifolia* Benth. essential oil. Iranian J Med Aromatic Plants 2014; 30: 861-78. doi: 10.22092/ijmapr.2015.11922
- Mozaffarian V. Recognition of Medicinal and Aromatic Plants of Iran. Tehran: Contemporary Culture Publications. 2017; P.1444. (In Persian)
- Wu QZ, Zha DX, Xiang J, Zhang M, Zhang CF, Xu XH. Antitussive, expectorant, and anti-inflammatory activities of four caffeoylquinic acids isolated from *Tussilago farfara*. J Pharm Biol 2015; 54:1117-24. doi: 10.3109/13880209.2015.1075048
- Lebada R, Schreier A, Scherz S, Resch Ch, Krenn L, Kopp B. Uantitative Analysis of the Pyrrolizidine Alkaloids Senkirkine and Senecionine in *Tussilago farfara* L. by Capillary Electrophoresis. J Phytochem Analysis 2000; 11: 366-369. doi: 10.1002/1099-1565(200011/12)11:6<366::AID-PCA538>3.0.CO;2-1
- Turker AU, Usta C. Biological screening of some Turkish medicinal plant extracts for antimicrobial and toxicity activities. J Nat Prod Res 2008; 22: 136-46. doi: 10.1080/14786410701591663
- Dobravalskyte D, Talou T, Venskutonis R. Activity of natural antioxidants extracted from greater calamint, sweet cicely and coltsfoot cultivated in Lithuania and in France. In Conference Proceedings of the 6th Baltic Conference on Food Science and Technology FOODBALT-2011, Jelgava, Latvia, 5-6 May, 2011. Innovations for food science and production. University of Agriculture, Faculty of Food Technology. 2011; 73-8.
- Sharafzadeh S. Pyrethrum, Coltsfoot, Dandelion. Important Medicinal Plants from Asteraceae Family. Australian J Basic Applied Sci 2011; 5: 1787-91.
- Mohsenipour SowmehSarai H, najafinejad A, Hosseinalizadeh M, Forouzeh MR, Parsakhoo A. The Role of Vegetation on Debris Slope Stability (Case study: Tuskestan-Chaharbagh Road, Golestan Province). Bernath J Med Aroma Plant 2020; 27: 185-200. doi: 10.22069/JWSC.2020.17799.3338
- Mashayekhi K, Atashi S. The analyzing methods in plant physiology. Agricultural Education Research Publications. 2016; 326 p.
- Foroozeh M, Mirdeylami Z. The effect of environmental factors on essential oil composition of *Achillea millefolium* L. J Rangeland 2019; 4: 596-609. (In Persian)
- Jaimand K, Rezaei MB. Chemical constituents of essential oils from *Mentha longifolia* (L.) Hudson var. *asiatica* (Boriss.) Rech. f. from Iran. J Essential Oil Res 2002; 14: 107- 8. doi: 10.1080/10412905.2002.9699786
- Spitaler R, Schlorhauser PD, Ellmerer EP, Merfort I, Bortenschlager S, Stuppner H, et al. Altitudinal variation of secondary metabolite profiles in flowering heads of *Arnica montana* cv. ARBO. Phytochemistry 2006; 67: 409-17. doi: 10.1016/j.phytochem.2005.11.018
- Sugiharto B, Miyata K, Nakamoto H, Sasakawa H, Sugiyama T. Regulation of expression of carbon-assimilating enzymes by nitrogen in maize leaf. Plant Physiol 1990; 92: 963-9. doi: 10.1104/pp.92.4.963
- Tao J, Zhang Y, Dong J, Fu Y, Zhu J, Zhang G, et al. Elevation-dependent relationships between climate change and grassland vegetation variation across the Qinghai-Xizang Plateau. Int J Climatol 2015; 35: 1638-47. doi: 10.1002/joc.4082
- Lattanzio V, Lattanzio VM, Cardinali A. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. J Phytochem 2006; 66: 23-67.
- Close DC, McArthur C. Rethinking the role of many plant phenolics—protection from photodamage not herbivores. J Oikos 2002; 99: 166-72. doi: 10.1034/j.1600-0706.2002.990117.x
- Roukos C, Koutsoukis C, Akrida-Demertzi K, Karatassiou M, Demertzis GP, Kandrelis S. The effect of altitudinal zone on soil properties, species composition and forage production in a subalpine grassland in northwest Greece. Applied Ecology Environmen Res 2017; 15(1): 609-626. doi: 10.15666/aeer/1501\_609626
- Demmig-Adams B, Adams WI, Logan BA, Verhoeven AS. Xanthophyll cycle-dependent energy dissipation and flexible photosystem II efficiency in plants acclimated to light stress. J Function Plant Biol 1995; 22:249-60. doi: 10.1071/PP9950249
- Demmig-Adams B, Adams III, Barker DH, Logan BA, Bowling DR, Verhoeven A.S. Using chlorophyll fluorescence to assess the fraction of absorbed light allocated to thermal dissipation of excess excitation. J Physiologia Plantarum 1996; 98: 253-64. doi: 10.1034/j.1399-3054.1996.980206.x
- Polle A, Rennenberg H. Field studies on Norway spruce trees at high altitudes: II. Defence systems against oxidative stress in needles. New Phytologist 1992; 121: 635-42.
- Sánchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. J Sci Food Agricult 1998; 76: 270-76. doi: 10.1002/(SICI)1097-0010(199802)76:2<270::AID-JSFA945>3.0.CO;2-9
- Bryant JP, Chapin FS, Reichardt PB, Clausen TP. Response of winter chemical defense in Alaska paper birch and green alder to manipulation of plant carbon/nutrient balance. Oecologia 1987;

- 72:510-14.
27. Mole S, Ross JAM, Waterman PG. Light-induced variation in phenolic levels in foliage of rain-forest plants. I. Chemical changes. *J Chem Ecol* 1988; 14: 1–21. doi: 10.1007/BF01022527
  28. Sellami IH, Maamouri E, Chahed T, Wannes WA, Kchouk ME, Marzouk B. Effect of growth stage on the content and composition of the essential oil and phenolic fraction of sweet marjoram (*Origanum majorana* L.). *J Indust Crops Prod* 2009; 30: 395-402. doi: 10.1016/j.indcrop.2009.07.010
  29. Fernando IDNS, Abeysinghe DC, Dharmadasa RM. Determination of phenolic contents and antioxidant capacity of different parts of *Withania somnifera* (L.) Dunal. from three different growth stages. *J Industrial crops and products* 2013; 50:537-539. doi: 10.1016/j.indcrop.2013.08.042
  30. Andreotti C, Costa G, Treutter D. Composition of phenolic compounds in pear leaves as affected by genetics, ontogenesis and the environment. *J Sci horticult* 2006; 109:130-37. doi: 10.1016/j.scienta.2006.03.014
  31. Li Y, Kong D, Fu Y, Sussman M R, Wu H. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. *J Plant Physiol Biochem* 2020; 148: 80-9. doi: 10.1016/j.plaphy.2020.01.006
  32. Vlasisavljević S, Kaurinović B, Popović M, Vasiljević S. Profile of phenolic compounds in *Trifolium pratense* L. extracts at different growth stages and their biological activities. *J food proper* 2017; 20: 3090-3101. doi: 10.1080/10942912.2016.1273235
  33. Esmaeili H, Karami A, Maggi F. Essential oil composition, total phenolic and flavonoids contents, and antioxidant activity of *Oliveria decumbens* Vent.(Apiaceae) at different phenological stages. *J Clean produc* 2018; 198: 91-5. doi: 10.1016/j.jclepro.2018.07.029
  34. Farhadi N, Babaei K, Farsaraei S, Moghaddam M, Pirbalout AG. Changes in essential oil compositions, total phenol, flavonoids and antioxidant capacity of *Achillea millefolium* at different growth stages. *J Indust Crops Prod* 2020; 152:112570. doi: 10.1016/j.indcrop.2020.112570.