ارزیابی میزان ترکیبات فنولی و خواص آنتی‌اکسیدانی برخی از اکوتیپ‌های آویشن شیرازی (*Zataria multiflora* Boiss.) در استان هرمزگان

سولماز معماری[۱]، علیرضا یاوری*[۱]، مهدی بیکدلو[۲]، طاهره سادات هاشمی[۱]
[۱*] گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس
[۲]گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک، اراک
*نویسنده مسئول: yavari@hormozgan.ac.ir

چکیده

گیاهان دارویی منابع ارزشمند آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی از قبیل برخی ترپنوئیدها و ترکیبات فنولی هستند و دارای پتانسیل بالا به‌عنوان جایگزینی مناسب برای آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی در کاهش استرس اکسیداتیو می‌باشند. لذا هدف از این تحقیق، بررسی و مقایسه میزان ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی برخی از اکوتیپ‌های آویشن شیرازی (*Zataria multiflora* Boiss.) در شرایط رویشگاه طبیعی آن می‌باشد. سرشاخه‌های گلدار ۵ اکوتیپ از استان هرمزگان شامل بستک، بندر خمیر، بشاگرد، تنگ زاغ و رودان جمع‌آوری گردید. سرشاخه‌های گلدار جمعیت‌های مختلف در سایه و دمای اتاق خشک گردید. جهت تهیه عصاره متانولی گیاهان مورد مطالعه، عصاره به روش خیساندن به‌دست آمد. مقادیر فنول تام با روش فولین سیوکالتو اندازه‌گیری و با استفاده از منحنی استاندارد براساس میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره اندازه‌گیری شد. میزان فلاونوئید کل با استفاده از روش رنگ‌سنجی اندازه‌گیری شده و منحنی استاندارد براساس میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره گزارش گردید. برای بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی از روش رادیکال DPPH استفاده شد. بیشترین و کمترین میزان فنول تام به‌ترتیب در نمونه‌های جمع‌آوری شده از تنگ زاغ (۳۷۸/۸۶ میلی‌گرم معادل گالیک اسید در گرم) و بندر خمیر (۱۵۸/۳۱ میلی‌گرم معادل گالیک اسید در گرم) مشاهده گردید. اختلاف بین بیشترین و کمترین اکوتیپ از نظر میزان فلاونوئید کل ۱۹/۰۸ میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره حاصل شد. بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در اکوتیپ رودان مشاهده گردید.

کلمات کلیدی: آویشن شیرازی، ترکیبات فنولی، آنتی‌اکسیدان، رویشگاه طبیعی، استان هرمزگان.

مقدمه

امروزه در راستای حذف و یا کاهش ترکیبات شیمیایی و سنتزی در مواد غذایی، تحقیقات زیادی برای جایگزینی مواد شیمیایی با منشأ طبیعی انجام شده است. در همین زمینه تلاش‌های زیادی برای یافتن آنتی اکسیدان‌های طبیعی از منابع گیاهی صورت گرفته است. اکسیداسیون لیپیدها در حین نگهداری و فرآوری غذاها نه تنها باعث از دست رفتن کیفیت تغذیه‌ای و هضمی غذا می‌شود، بلکه محصولات اکسیده شده‌ای مانند رادیکال‌های آزاد تولید می‌کند. رادیکال‌های آزاد تولید شده در سامانه‌های غذایی باعث اکسیداسیون خود به خودی و تولید ترکیبات شیمیایی نامطلوب و در نتیجه باعث تندی و بدطعمی ماده غذایی می‌شوند. همچنین رادیکال‌های آزاد در سامانه‌های بیولوژیکی و زیستی باعث بروز بسیاری از بیماری‌ها، به‌ویژه سرطان می‌شوند (Epsin *et al*., 2000). ویژگی آنتی اکسیدانی بستگی به حضور و غلظت انواع مختلف ترکیبات فنولی دارد. فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها، تانن‌ها و اسیدهای فنولی از مهمترین ترکیبات فنولی هستند. رادیکال‌های آزاد عامل اصلی بسیاری از بیماری‌ها هستند. آنتی اکسیدان‌ها رادیکال‌های آزاد و آسیب ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن را خنثی می‌کنند (Singh and Kumari, 2015).

IrHC2019

آویشن شیرازی با نام علمی *Zataria multiflora* Boiss. به تیره نعناع (Lamiaceae) تعلق دارد که بیشتر در مناطق جنوبی ایران محدود به استان‌های اصفهان، یزد، کهکیلویه و بویراحمد، فارس، هرمزگان، خوزستان، کرمان، سیستان و بلوچستان و خراسان می‌باشد. این گونه با نام آویشن شیرازی یا آویشن برگ پهن شناخته می‌شود (جم‌زاد، ۱۳۸۸). پراکندگی این گیاه در جهان محدود بوده و منحصراً در ایران، افغانستان و پاکستان رویش دارد (مظفریان، ۱۳۹۱). گونه‌ی آویشن شیرازی از زمان‌های قدیم به صورت سنتی در درمان ناراحتی‌هایی چون سرماخوردگی، سردرد، دندان درد، التیام زخم و در پایین آمدن تب به صورت بخور، درمان سرخک و کاهش چربی و قند خون به صورت دم‌کرده مصرف می‌شود (سلطانی پور، ۱۳۷۸).

با توجه به اهمیت آویشن شیرازی از نظر خصوصیات دارویی، اقتصادی و نیز ترکیبات تشکیل دهنده‌ی خاصیت آنتی اکسیدانی در آن، هدف از این تحقیق، اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های متانولی آویشن شیرازی با آزمون‌های مختلف می‌باشد تا به‌توان این مواد را به‌عنوان جایگزین یا مکمل آنتی اکسیدان‌های سنتزی پیشنهاد داد.

مواد و روش‌ها

سرشاخه‌های گلدار گیاه آویشن شیرازی از مناطق مختلف استان هرمزگان شامل: رودان، بشاگرد، تنگ زاغ، بندر خمیر و بستک در زمستان سال ۱۳۹۶ و بهار سال ۱۳۹۷ جمع آوری گردید. شناسایی گونه توسط مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان هرمزگان صورت گرفت و با کد هرباریومی ۲۲۲۸ ثبت گردید. اطلاعات مربوط به رویشگاه‌های مورد مطالعه در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱- اطلاعات مربوط به رویشگاه‌های مورد مطالعه در استان هرمزگان

ردیف	محل جمع‌آوری	ارتفاع از سطح دریا (متر)	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	میانگین دمای سالیانه (°C)
۱	بستک	۴۰۲	۵۴' ۲۱"	۲۷' ۱۱"	۲۶/۷
۲	بندر خمیر	۲۲	۵۵' ۳۴"	۲۶' ۵۷"	۲۸/۶
۳	تنگ زاغ	۱۷	۵۶' ۱۸"	۲۷' ۱۱"	۲۶/۸
۴	رودان	۷۴	۵۶' ۱۶"	۲۷' ۱۹"	۲۸/۳
۵	بشاگرد	۱۷	۵۶' ۱۴"	۲۷' ۳۹"	۲۷/۰

سرشاخه‌های گلدار جمعیت‌های مختلف در سایه و دمای اتاق خشک گردید. جهت تهیه عصاره متانولی گیاهان مورد مطالعه، عصاره به روش خیساندن به‌دست آمد. بدین منظور، مقدار ۵۰ گرم پودر هر گیاه در داخل ارلن ۵۰۰ میلی لیتری ریخته شد و مقدار ۲۰۰ میلی‌لیتر متانول خالص به آن اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت روی شیکر با دور ۱۳۰ قرار گرفتند و پس از آن با عبور مخلوط از کاغذ صافی شماره ۳۰ عصاره متانولی اولیه حاصل گردید. در نهایت، عصاره حاصل با استفاده از دستگاه تقطیر در خلاء در دمای ۵۰ درجه تغلیظ شد. عصاره تغلیظ شده به ارلن منتقل و ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه گردید. در نهایت به منظور رسوب موم و مواد رزینی محلول آبی به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳ درجه سانتیگراد قرار گرفت و با عبور از کاغذ صافی فیلتر شد. واکنش‌های حاصله مجدداً با استفاده از دستگاه تقطیر در خلاء تغلیظ و با انتقال به انکوباتور با دمای ۵۰ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت خشک شدند.

مقادیر فنول تام با روش فولین سیوکالتو اندازه‌گیری شد. عصاره با غلظت ۱۰ mg/ml تهیه شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از هر عصاره با ۲/۵ میلی‌لیتر واکنش‌گر ۰/۲ نرمال فولین سیوکالتو مخلوط و به مدت ۵ دقیقه هم زده شد. سپس ۲

IrHC2019

میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم ۲۰ درصد با غلظت ۷۵ گرم در لیتر اضافه شد. جذب نمونه‌ها پس از ۲ ساعت قرار دادن نمونه‌ها در دمای اتاق با دستگاه اسپکتروفتومتر ماورای بنفش در ۷۶۰ نانومتر در مقابل بلانک (متانول) اندازه‌گیری شد.

مقادیر فنول تام عصاره با استفاده از منحنی استاندارد براساس میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره اندازه‌گیری شد (Ordone *et al*., 2008).

میزان محتوای فلاونوئید کل عصاره با روش رنگ‌سنجی ارزیابی شد. عصاره با غلظت ۱۰ mg/ml تهیه شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره در ۱/۵ میلی‌لیتر متانول حل و ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد به آن اضافه شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر محلول پتاسیم استات ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر به این مخلوط اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری گردید. جذب مخلوط حاصل در طول موج ۴۱۵ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر دوگانهٔ مرئی- ماورای بنفش اندازه‌گیری شد. میزان فلاونوئید با استفاده از منحنی استاندارد براساس میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره گزارش گردید (Chang *et al*., 2002).

برای بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی از روش رادیکال DPPH استفاده شد (Kartal *et al*., 2007). اساس این روش به دام‌اندازی رادیکال‌های DPPH (دی فنیل پیکریل هیدرازیل) بر مبنای توانایی هیدروژن‌دهی است. این روش به منظور ارزیابی فعالیت رادیکال آزاد به کار می‌رود و از مزایای آن عدم وابستگی به قطبیت نمونه است. ۱ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ میلی‌مولار DPPH به ۱ میلی‌لیتر از عصاره اضافه و مخلوط حاصل به خوبی تکان داده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در اتاق تاریک قرار داده شد. سپس جذب مخلوط توسط دستگاه اسپکتروفتومتر UV در ۵۱۷ نانومتر با بلانک متانول قرائت شد.

آسکوربیک اسید به عنوان استاندارد استفاده گردید. در نهایت، مقدار به دام‌اندازی رادیکال DPPH با فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد مهار} = (B_0\text{-}B_1/B_0) \times 100$$

B_0: جذب محلول کنترل منفی؛ B_1: جذب مخلوط واکنش.

آزمایش به‌صورت طرح کاملاً تصادفی و با ۳ تکرار انجام شد. داده‌ها پس از جمع‌آوری با نرم‌افزار SPSS بررسی و تحلیل شدند. مقایسهٔ میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD ($p<0.01$) صورت پذیرفت.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد اثر تیمارها (رویشگاه‌های مختلف) روی مقادیر فنول تام، فلاونوئید کل و مهار رادیکال‌های آزاد در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بوده است. بیشترین و کمترین میزان فنول تام به‌ترتیب در نمونه‌های جمع‌آوری شده از تنگ زاغ (۳۷۸/۸۶ میلی‌گرم معادل گالیک اسید در گرم) و بندر خمیر (۱۵۸/۳۱ میلی‌گرم معادل گالیک اسید در گرم) مشاهده گردید (جدول ۲). محتوای فلاونوئید کل که به روش رنگ‌سنجی ارزیابی شد، برای اکوتیپ‌های بندر خمیر، بشاگرد، بستک، تنگ زاغ و رودان به ترتیب ۶۱/۳۳، ۶۰/۲۵، ۴۴/۰۰، ۴۲/۴۰ و ۴۲/۲۵ میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره بود (جدول ۲). در پژوهشی شرافتی چالشتری و همکاران (۱۳۹۱) با بررسی میزان فنول کل و فلاونوئید تام عصاره هیدرو الکلی آویشن شیرازی جمع‌آوری شده از جنوب استان چهارمحال و بختیاری مقدار آنها را به ترتیب ۲۸۳/۴۳ میلی‌گرم معادل گالیک اسید در گرم و ۱۳۱/۲۳ میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره گزارش نمودند.

وجود اختلاف در بین اکوتیپ‌های مختلف آویشن شیرازی مورد بررسی در این تحقیق می‌تواند به‌دلیل اختلاف از سطح دریا و بالا بودن متوسط درجه حرارت سالیانه در رویشگاه‌های مختلف مورد بررسی در استان هرمزگان باشد.

IrHC2019

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر تیمار (رویشگاه‌های مختلف) روی مقادیر فنول تام، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آویشن شیرازی

ردیف	محل جمع‌آوری	فنول تام	فلاونوئید کل	DPPH
۱	بستک	۳۰۱/۷۱ ± ۳۲/۴۱ b	۴۲/۲۵ ± ۱/۵۰ b	۸۵/۳۷ ± ۴/۱۳ b
۲	بندر خمیر	۱۵۸/۳۱ ± ۱/۳۶ c	۴۴/۰۰ ± ۰/۸۹ b	۴۹/۹۷ ± ۳/۶۳ d
۳	تنگ زاغ	۳۷۸/۸۶ ± ۶/۸۵ a	۴۲/۳۹ ± ۳/۱۸ b	۶۰/۱۹ ± ۱۱/۲۸ c
۴	رودان	۲۱۵/۰۷ ± ۲۴/۰۴ c	۶۰/۲۵ ± ۰/۶۳ a	۹۶/۹۱ ± ۷/۳۶ a
۵	بشاگرد	۲۹۲/۵۶ ± ۱۳/۷۰ b	۶۱/۳۳ ± ۴/۹۱ a	۶۱/۰۴ ± ۹/۴۱ c

*حروف مشابه در هر ستون نشان دهنده عدم معنی‌داری با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۱ ٪ می‌باشد.

رادیکال DPPH یک رادیکال آزاد پایدار با اتم مرکزی نیتروژن است که با احیا شدن و تولید مولکول پایدار DPPH-H از ارغوانی به زرد تغییر رنگ می‌دهد. غلظت مهار ۵۰ درصد IC_{50} در عصاره متانولی بستک، بندر خمیر، بشاگرد، تنگ زاغ و رودان به ترتیب ۸۵/۳۷، ۴۹/۹۷، ۶۰/۱۹، ۹۶/۹۱ و ۶۱/۰۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد (جدول ۲). فعالیت به دام اندازی رادیکال دی فنیل پیکریل هیدرازیل در عصارهٔ اکوتیپ تنگ زاغ بیشترین و در عصارهٔ بندر خمیر کمترین مقدار را دارا بود. در نتایج حاصل از تحقیقات امیری در سال ۲۰۱۱ بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی آویشن کوهی، مقدار IC_{50} را ۱۲۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش نموده است که این میزان IC_{50} از تمام اکوتیپ‌های مورد مطالعه در این تحقیق بیشتر است. علت این اختلاف را می‌توان به عوامل مختلفی چون تفاوت شرایط آب و هوایی، خاک، ارتفاع، روش استخراج، نوع حلّال و ... نسبت داد.

منابع

جم‌زاد، ز. ۱۳۸۸. آویشن‌ها و مرزه‌های ایران، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، ۱۷۲ صفحه.

سلطانی‌پور، م. ۱۳۷۸. جمع‌آوری و شناسایی گیاهان دارویی استان هرمزگان. معاونت تحقیقات و آموزش وزارت جهاد کشاورزی.

شرافتی چالشتری، ر.، رفیعیان کوپائی، م.، رکنی، ن.، مرتضایی، س. و شرافتی چالشتری، ع. ۱۳۹۱. بررسی خواص آنتی اکسیدانی عصاره هیدرو الکلی آویشن شیرازی و اثر ضد میکروبی آن بر روی استافیلوکوکوس ارئوس. مجله علوم پزشکی مازندران، ۲۲(۱): ۸۸-۹۴.

مظفریان، و. ۱۳۹۱. فرهنگ نام‌های گیاهان ایران. انتشارات فرهنگ معاصر، ۷۴۰ صفحه.

Amiri, H. 2011. Essential oil composition and anti-oxidant properties of three Thyme species. Evidence-Based complementary and alternative medicine. Article ID: 728065:8.

Chang, Y.L., Kim, D.O., Lee, K.W., Lee, H.J. and Lee, C.Y. 2002. Vitamin C equivalent anti-oxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. Journal of Agricultural and food chemistry, 50(13): 3713-3717.

Epsin, J.C., Soler-Rivas, C., Wichers, H.J. 2000. Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2, 2-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48: 648-56.

Kartal, N., Sokmen, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., and Sokmen, A. 2007. Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure. Food Chemistry, 100(2): 584-589.

Ordone, A.A.L., Gomez, J.D. and Vattuone, M.A. 2008. Antioxidant activities of Sechium edule swartz extracts. Food Chemistry, 97: 452-458.

Singh, R. and Kumari, N. 2015. Comparative determination of phytochemicals and antioxidant activity from leaf and fruit of *Sapindus mukorrossi* Gaertn. – A valuable medicinal tree. Industrial Crops and Products, 73: 1–8.

IrHC2019

Evaluation of Phenolic Compounds and Antioxidant Activities of Different Ecotypes of *Zataria multiflora* Boiss. in Hormozgan Province

Soolmaz Meamari[1], Alireza Yavari*[1], Mahdi Bikdeloo[2], Tahereh Sadat Hashemi[1]
[1] Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran
[2*] Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Arak, Arak, Iran
Corresponding Author: yavari@hormozgan.ac.ir

Abstract

The use of natural anti-oxidants is one of the easiest ways to reduce cell destructive reactions. Plants are considered as rich sources of natural anti-oxidants such as terpenoids, phenolic acids and etc. The present study was aimed to evaluate total phenolic compounds and anti-oxidant activities of *Zataria multiflora* Boiss. ecotypes from their natural habitats. The aerial parts of *Z. multiflora* were collected in the following locations of Hormozgan province: Bastak, Bandare-e-Khamir, Bashagard, Tang-e-Zagh and Roudan. The samples were air-dried at room temperature and then were powdered and macerated with aqueous pure methanol in a ratio 10:1 (v/w) by 48 h, resulting liquids were filtered and concentrated under vacuum evaporator to get the crude hydroalcoholic extracts of *Z. multiflora*. Subsequently, the total polyphenol, flavonoid and antioxidant content were determined. The total phenol content (TPC) was measured according to Folin-Ciocalteu method. TPC was expressed as Gallic acid equivalent per gram of dry weigh. Total flavonoid content (TFC) was quantified using the colorimetric method with aluminum chloride and TFC amounts in extract were expressed as quercetin equivalent per gram of dry weight. Anti-oxidative activity of *Z. multiflora* leaves was evaluated using the method of DPPH free-radical scavenging activity. The maximum and minimum amounts of total phenol were observed in Tang-e-Zagh (378.86 mg/g) and Bandar-e-Khamir (158.31 mg/g), respectively. The maximum difference flavonoid was 19.08 eq/g which observed between Bandar-e-Khamir and Roudan ecotypes. Results showed that the most antioxidant activity was in Roudan ecotype.

***Keywords*:** *Zataria multiflora*, Phenolic compounds, Anti-oxidant, Natural habitat, Hormozgan province.

IrHC2019