

اثر ارتفاع، حلال، نوع اندام گیاه و روش استخراج بر برخی ویژگی‌های فیتوشیمیایی گل ماهور تماشایی در مراتع چهارباغ استان گلستان

زهرا باقری^۱، محمدرحیم فروزه^{۲*}، معصومه مازندرانی^۳، هدی شهیری طبرستانی^۴ و صادق آتشی^۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۱۸ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۹/۰۹/۰۷

چکیده

استفاده از گیاهان دارویی مراتع و مواد فعال آنها به جهت اثرات درمانگری و صنعتی آنها بسیار با اهمیت می‌باشد. در این مطالعه به منظور بررسی اثر تیمارهای ارتفاع، اندام، حلال و روش استخراج بر برخی از ویژگی‌های فیتوشیمیایی عصاره گل ماهور تماشایی (*Verbascum speciosum* schard.) در مراتع چهارباغ استان گلستان، نمونه‌های گل و برگ این گونه از طبقات ارتفاعی ۲۱۰۰ - ۲۳۰۰ - ۲۵۰۰ - ۲۷۰۰ متری در سه تکرار جمع‌آوری گردید و با حلال‌های اتانول و متانول و با دو روش عصاره‌گیری شامل خیساندن و استفاده از ریزموج فراصوت عصاره‌گیری شدند. بنابر نتایج بیشترین میزان فنل کل (۱۱۹/۴۶ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در اندام گل، ارتفاع ۲۱۰۰ متر، حلال اتانول و روش عصاره‌گیری با ریزموج - فراصوت، بیشترین میزان فلاونوئید کل (۳۱/۰۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در اندام برگ، ارتفاع ۲۱۰۰ متر، حلال متانول و روش عصاره‌گیری با ریزموج - فراصوت و بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۸۱/۴۹ درصد) در اندام گل، ارتفاع ۲۱۰۰ متری، حلال اتانول و عصاره‌گیری به روش خیساندن مشاهده شد. همچنین تجزیه واریانس میزان IC₅₀ نمونه‌ها نشان داد که قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH به تنهایی یا اثر متقابل، در (P<0.01) تفاوت معنی‌داری داشت. نتایج مقایسه میانگین سه عامل ارتفاع، اندام و حلال بر میزان IC₅₀ نمونه‌ها نشان داد که گونه گیاهی مورد مطالعه در ارتفاع ۲۵۰۰ متری، در اندام گل و با نوع حلال متانول بیشترین میزان IC₅₀ و به تبع آن کمترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی را دارا است. با توجه به پراکنش گل ماهور در مناطق کوهستانی، به نظر می‌رسد گردآیدان ارتفاعی، نحوه استخراج و نوع اندام گیاهی تاثیر قابل توجهی در متابولیت‌های ثانویه مورد بررسی و خواص آنتی‌اکسیدانی این گیاه دارد؛ لذا به منظور تولید، بهره‌برداری، فراوری و استفاده از مواد موثره گیاه *Verbascum speciosum* در ترکیبات دارویی توجه به موارد مذکور توصیه می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: گل ماهور تماشایی، مراتع چهارباغ، فنل، فلاونوئید، آنتی‌اکسیدان، حلال.

^۱ - دانشجوی کارشناسی ارشد مرتعداری، گروه مرتعداری، دانشکده مرتع و آبخیزداری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

^۲ - استادیار گروه مرتعداری، دانشکده مرتع و آبخیزداری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

* نویسنده مسئول: rfroozeh@gmail.com

^۳ - دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی گرگان، گرگان، ایران.

^۴ - استادیار گروه صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

^۵ - کارشناس ارشد باغبانی، گروه علوم باغبانی، دانشکده تولیدات گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

مقدمه

کشور ایران به لحاظ شرایط اقلیمی و سایر فاکتورهای جغرافیایی خاص از تنوع گیاهی بسیار بالایی برخوردار می‌باشد به طوریکه بیش از ۸۰۰۰ گونه گیاهی را در خود جای داده است که مراتع خواستگاه بیشتر این گونه‌های گیاهی هستند. مراتع افزون بر تولیدات دامی دارای فوایدی همچون تولید گیاهان دارویی و صنعتی، تنظیم چرخه هیدرولیکی، پالایش آلاینده‌های محیطی، حفظ خاک، تلطیف آب و هوا و ایجاد روحیه و نشاط در انسان هستند (۲۵). این اکوسیستم‌ها طیف گسترده‌ای از تولیدات را برای بیشتر افراد مناطق روستایی و عشایری فراهم می‌کنند. در این میان گیاهان مرتعی علاوه بر تولید علوفه، قابلیت‌های دیگری نیز مانند کاربردهای خوراکی، دارویی، صنعتی و تزئینی دارند که جزء فرآورده‌های فرعی مراتع به شمار می‌آیند، که مراتع را ارزشمندتر می‌کنند (۲۶). گیاهان دارویی به گستره وسیعی از گیاهان اطلاق می‌شوند (بوته، درختچه و درخت) که در درمان بیماری‌ها و یا در پیشگیری از بروز آن مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۳) و یکی از منابع بسیار ارزشمند در گستره وسیع منابع طبیعی ایران هستند که در صورت شناخت علمی، کشت، توسعه و بهره‌برداری صحیح می‌توانند نقش مهمی در سلامت جامعه، اشتغالزایی و صادرات غیرنفتی داشته باشند (۴). گونه‌های گیاهی دارویی در اندام‌های خود دارای ترکیبات شیمیایی هستند و تاکنون تحقیقات زیادی پیرامون استخراج این ترکیبات و مواد موثره موجود با استفاده از روش‌های مختلف اسانس‌گیری و عصاره‌گیری انجام شده است. از این رو خواص درمانی گیاهان دارویی به مواد موثره موجود در اسانس و عصاره آنها نسبت داده شده می‌شود که ممکن است در ترکیب با سایر مواد مستخرجه یا به صورت انفرادی خاصیت درمانی خود را نشان دهند (۱۳)، ترکیب‌های فنلی در بسیاری از گیاهان وجود داشته و اهمیت زیادی در سلامت انسان دارند، فنل‌ها بزرگ‌ترین گروه از متابولیت‌های ثانویه گیاهان هستند و شامل فلاونوئیدها، تانن‌ها و آنتوسیانین می‌باشند (۶)، فلاونوئیدها یک گروه از مواد طبیعی متعلق به پلی فنل‌ها می‌باشند که وظایف اصلی آنها تولید ترکیبات رنگی مانند کلروفیل و کاروتنوئیدها و محافظت آن‌ها در مقابل اشعه ماورابنفش می‌باشد (۲۹). آنتی اکسیدان مولکولی است که

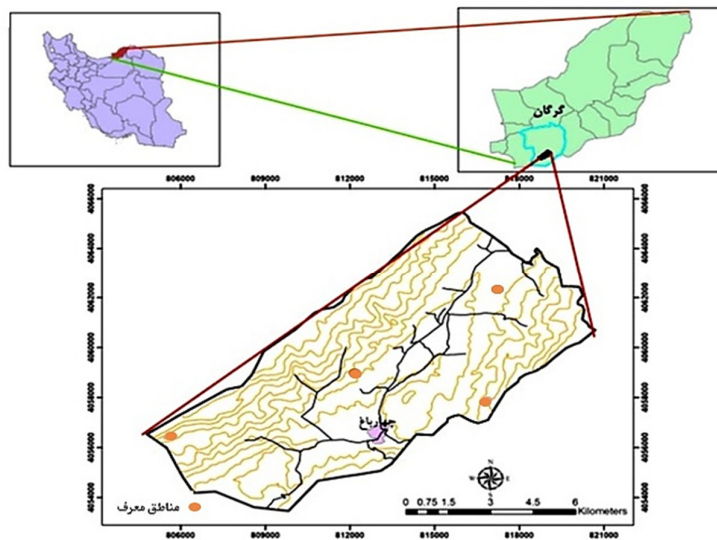
توانایی جلوگیری یا آهسته کردن واکنش اکسایشی سایر مولکول‌ها را که قادر به تولید رادیکال‌های آزاد هستند داراست (۲). امروزه آنتی اکسیدان‌های سنتزی متداول که در صنایع غذایی - دارویی برای افزایش دوره نگهداری و انبار کردن مواد و جلوگیری از اکسایش اسیدهای چرب استفاده می‌شود به دلیل سمیت و ناپایداری، سرطان زا بوده و باعث اختلال کار کبد و کاهش رشد سلول‌ها می‌گردند (۴۰) لذا تلاش می‌گردد آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی جایگزین این ترکیبات سنتزی شوند. گل ماهور در مناطق مختلف ایران به نام‌های علف خرگوش، خرگوشک، گل ماهور و علف ماهور نامیده می‌شود. تحقیقات تاکسونومیک نشان می‌دهد که جنس گل ماهور در ایران، ۴۱ گونه گیاه علفی چندساله و غالباً پرشاخه و بلند دارد که بیشتر در دامنه‌های کوهستانی می‌رویند که ۱۷ گونه آن انحصاری ایران است. گونه‌های گل ماهور معمولاً دوساله می‌باشند که در سال اول تنها در مرحله رشد رویشی باقی می‌مانند و در سال بعد، ساقه گل دهنده رشد کرده و مراحل رشد خود را به پایان می‌رساند. از گل‌های آن به عنوان داروی ضدسرفه و خلط آور و همچنین برای ناراحتی‌ها و عفونت‌های ریوی مانند برونشیت و سیاه سرفه استفاده می‌شود (۴۵). میزان کمی و کیفی مواد موثره موجود در گیاهان در هر منطقه تحت تاثیر عوامل محیطی (ارتفاع از سطح دریا، مقدارشیب و جهت آن، شرایط اقلیمی مانند نور، بارش، درجه حرارت، باد) و تنش‌های اکولوژیک در آن منطقه می‌باشد (۳۴). تغییرات گرادیان دما در اثر تغییر ارتفاع از مهمترین عامل موثر در تغییرات مربوط به ارتفاع محل زندگی نبات می‌باشد. به طوری که با افزایش و یا کاهش ارتفاع عواملی چون دما، رطوبت نسبی، سرعت باد، میزان آب در دسترس و حتی تابش دریافتی تغییر می‌یابد (۱۲) استخراج مواد موثره موجود در گیاهان به وسیله حلال‌های مختلف انجام می‌پذیرد، به طور کل روش استخراج مواد موثره گیاهی به نوع بافت گیاهی و ترکیبات گیاه بستگی دارد و مهمترین عاملی که در استخراج مواد متشکله گیاهان مورد توجه قرار می‌گیرد، حلال است که انتخاب آن به قسمت‌های مختلف یک گیاه و نیز مواد متشکله آن بستگی دارد. نحوه عصاره‌گیری از گیاهان به عنوان اولین مرحله کلیدی برای استخراج ترکیبات شیمیایی بسیار مهم است. اندام‌های

(ماسراسیون) با حلال‌های مختلف، اتانول و متانول مورد ارزیابی قرار گیرند تا با توجه به میزان متابولیت‌های ثانویه، شناسایی بهترین اندام، حلال و روش عصاره‌گیری با بالاترین میزان مواد فنلی، فلاونوئیدی و خواص آنتی‌اکسیدانی بتوان تاثیر هر کدام از عوامل تاثیرگذار بر مواد فنلی مشخص و این تحقیق بتواند مبنایی برای تحقیقات بعدی در این مورد باشد تا با کمترین هزینه و زمان ممکنه، مواد فنلی را با بیشترین میزان در گیاهان مختلف استخراج و مقایسه کرد.

مواد و روش

این پژوهش در مراتع چهارباغ استان گلستان واقع در ۲۰ کیلومتری جنوب شهر گرگان، با عرض جغرافیایی " ۴۴ ° ۳۵ ' تا " ۳۶ ° ۴۰ ' ۳۹ ' و طول جغرافیایی " ۲۸ ° ۳۹ ' تا " ۵۴ ° ۴۳ ' ۳۳ ' انجام گرفت. حداقل ارتفاع آن ۲۱۵۰ متر و حداکثر ارتفاع آن ۳۱۵۰ متر و مساحت آن بر مبنای نقشه های ۱:۵۰۰۰۰ سازمان نقشه‌برداری کشور ۴۳۰۲ هکتار و از مراتع ییلاقی گرگان می‌باشد، که در بین ناحیه رویشی هیرکانی و منطقه رویشی نیمه‌استپی قرار دارد (۴۷). تیپ غالب پوشش گیاهی مراتع این منطقه را (علف بره - چمن گندمی) *Agropyron trichophorum* (Link) و *Festuca ovina* L. - و کلاه میرحسن *Acanthophyllum microcephalum* تشکیل می‌دهند. خاک منطقه سطحی تا نیمه عمیق با بافت سبک تا نسبتاً سبک، همراه با سنگ و سنگریزه است. براساس یک دوره آماری ده ساله (۶۶-۷۷)، متوسط بارندگی سالانه ۳۰۵ میلی متر بوده که بیشترین بارندگی در بهمن ماه با ۴۴/۲ میلی متر و کمترین میزان بارندگی در تیرماه با ۱۲/۶ میلی متر می‌باشد. همچنین متوسط دمای سالیانه این منطقه در ارتفاع ۲۲۰۰ متری برابر ۷ درجه سانتی گراد و بیشترین درجه حرارت متوسط ماهانه مربوط به مرداد ماه معادل ۱۷/۳ درجه سانتی گراد می‌باشد (۳۲).

گیاهی و سیستم‌های حلالی انتخاب شده می‌تواند روی کمیت و نوع ترکیبات جدا شده تاثیر بگذارد، لذا انتخاب روش مناسب عصاره‌گیری می‌تواند کارایی استخراج مواد مؤثره موجود در گیاه را به طور چشم‌گیری افزایش دهد (۴۴). به همین دلیل، تقاضای زیادی برای روش‌های عصاره‌گیری جدید با زمان کوتاه‌تر، میزان مصرف حلال کمتر و محافظ محیط زیست وجود دارد. مرور منابع نشان داد که پیرامون بررسی اثر ارتفاع، حلال و روش استخراج بر ترکیبات ثانویه جنس ماهور تحقیقی انجام نگرفته بود. اما در بررسی گونه‌های دیگر نتایج مختلفی حاصل شده است. فروزه و همکاران (۲۰۱۹) نیز در بررسی اثر عوامل محیطی بر تغییرات ترکیبات شیمیایی اسانس بومادران (*Achillea milefolium*) به این نتیجه رسیدند که عملکرد گیاه بومادران تحت تاثیر شرایط محیطی از قبیل اقلیم، نوع خاک و ارتفاع از سطح دریا است (۱۳). نتایج حکیمی و گودرزی (۲۰۲۰) بیانگر این نکته بود که روش استخراج حلال-فراصوت از لحاظ کارایی و هزینه نسبت به روش حلال، روش مناسب‌تری جهت استخراج ترکیبات مرزه (*Satureja avromanica Maroofi*) می‌باشد (۱۶). همچنین نتایج آبرومندآذر و همکاران (۲۰۱۰) که به بررسی ترکیبات شیمیایی اسانس گیاه زنیان (*Carum copticum*) پرداختند نشان داد که دو روش اسانس‌گیری تقطیر با آب و استخراج با ریزموج بدون استفاده از حلال، هر کدام جداگانه می‌تواند درصد و نوع ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس این گیاه را تغییر دهد (۱). کبیری و سیدنژاد (۲۰۱۵) در مقایسه اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های مختلف برگ‌های گیاه بادرنجبویه (*Meliss officinalis*) با دو روش استخراج (غرقابی و ریزموج) و حلال‌های (آب، متانول ۸۰ درصد و اتانول ۵۰ درصد) به این نتیجه رسیدند که: در هر دو روش، عصاره اتانولی بیشترین راندمان و عصاره آبی کمترین راندمان را در استخراج ترکیبات فنلی دارا بوده است (۲۳). لذا در تحقیق حاضر سعی شد تا اندام‌های گل و برگ گیاه گل ماهور تماشایی در مراتع چهارباغ جمع‌آوری و بر اساس روش‌های مختلف عصاره‌گیری، استفاده از ریزموج و خیساندن



شکل ۱: موقعیت منطقه مورد مطالعه

روش نمونه‌برداری

ابتدا رویشگاه گل ماهور تماشایی (*Verbascum speciosum*) در مرتع چهارباغ استان گلستان شناسایی گردید و سپس در نقاط معرف رویشگاه نمونه‌برداری از اندام‌های گل و برگ این گونه صورت گرفت. در هر نقطه معرف با توجه به پراکنش، ابعاد و ضریب تغییرات تاج پوشش گونه گل ماهور، تعداد ۳۰ پلات به صورت تصادفی مستقر گردید. پارامترهای ارتفاع از سطح دریا و جهت جغرافیایی نیز با استفاده از GPS ثبت شد. نمونه‌های برگ و گل گیاه از منطقه مورد نظر، در زمان گلدهی گیاه در سه تکرار جمع‌آوری شد. نمونه‌ها پس از پاکسازی در هوای آزاد، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد در آون قرار گرفتند و سرانجام در پاکت‌های کاغذی نگهداری و جهت ارزیابی برخی خصوصیات فیتوشیمیایی همچون میزان فنل کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی به آزمایشگاه انتقال داده شدند.

تهیه عصاره متانولی: نمونه‌ها پس از جمع‌آوری و انتقال به آزمایشگاه، در آون (BINDER ساخت کشور آلمان) با دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک و با استفاده از آسیاب برقی (IK ساخت آلمان) به خوبی پودر و از الک شماره ۱۸ گذرانده شدند. نمونه‌های (سه تکرار از گونه) الک شده با ترازوی دقیق (ساخت کشور ایران، شرکت پژوهشگران نانوفناوری، مدل |MD| ۴۰۹۶

۲۰۰) توزین و مقدار یک گرم از هر نمونه با ۵۰ میلی‌لیتر حلال متانول ۸۰ درصد خیسانده شد و پس از ۲۴ ساعت روی دستگاه شیکر (بهداد، ROTATOR 2002) ساخت کشور ایران، عصاره متانولی حاوی نمونه با استفاده از کاغذ صافی واتمن سایز ۰/۰۴ میکرون آلمان، صاف شد (۳۳). سپس عصاره خالص برای اندازه‌گیری فنل، فلاونوئید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های مورد نظر براساس استاندارد فیتوشیمیایی مورد استفاده قرار گرفت. به طور مشابه، روش خیساندن در حلال اتانول ۸۰ درصد نیز صورت گرفت.

عصاره‌گیری به کمک ریزموج - فراصوت: استخراج با کمک ریزموج - فراصوت یکی از انواع استخراج است که بر مبنای گرم شدن یک حلال آلی می‌باشد. در این روش ۱ گرم نمونه با ۱۰ میلی‌لیتر حلال اتانول و متانول در ارلن مایر قرار داده شد و از امواج ریزموج (مدل Sanyo) با توان ۷۰۰ وات و فرکانس ۳۰۰ گیگاهرتز به مدت ۵ تا ۲۰ دقیقه استفاده شد. سپس نمونه‌ها جهت برآورد تاثیر امواج فراصوت بر استخراج ترکیبات شیمیایی، به مدت ۱۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک (مدل Parsonic 2600) قرار گرفته و سرانجام به مدت ۲۴ ساعت روی شیکر با دور ۲۰۰ rpm قرار گرفت (۳۳).

اندازه‌گیری فنل کل: میزان فنل کل با استفاده از روش فولین سیوکالتیو اندازه‌گیری شد، بدین منظور ابتدا ۲۰

شد. بعد از ۳۰ دقیقه تاریکی، نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت شدند. به طور مشابه، همین روش برای عصاره اتانولی نیز انجام شد. اعداد بدست آمده از جذب نمونه توسط رابطه (۱) به درصد مهار تبدیل شد (۳۳).

رابطه (۱)

$100 \times (A_{control} - A_{sample}) / A_{control}$ = درصد مهار رادیکال آزاد
 $A_{control}$: جذب محلول کنترل در ۵۱۷ نانومتر
 A_{sample} : جذب محلول نمونه در ۵۱۷ نانومتر

پس از محاسبه درصد بازداری، منحنی کالیبراسیونی آن بر حسب غلظت ($\mu\text{g/ml}$) رسم شد و پس از به دست آمدن معادله خط نمودار ($y=ax+b$)، با جایگزین کردن عدد ۵۰ در محور y مقدار IC_{50} از محور X محاسبه و قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها براساس IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) گزارش شد (۴۱). برای مقایسه فعالیت عصاره‌ها از پارامتر IC_{50} استفاده شد. براساس اطلاعات حاصل، IC_{50} عصاره (غلظتی از عصاره بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، که برای احیای رادیکال DPPH به میزان ۵۰ درصد اولیه نیاز است) از منحنی درصد مهار در مقابل غلظت‌های مختلف عصاره به دست آمد. از شاخص IC_{50} به منظور بیان اثر مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد در روش DPPH استفاده گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

این مطالعه به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد، سرانجام داده‌های حاصل با استفاده از برنامه آماری SAS 9.1 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و مقایسه میانگین‌ها به روش LSD با ضریب اطمینان ۹۹ درصد ($P < 0.01$) به منظور نمایش حداقل اختلاف بین میانگین نمونه‌ها انجام شد. رسم نمودارها با نرم‌افزار 2013 Excel انجام شد.

نتایج

نتایج تجزیه واریانس چند متغیره ترکیب‌های فنلی، فلاونویدی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه گل ماهور تماشایی (جدول ۲) نشان داد که عوامل ارتفاع، اندام، حلال،

میکرولیتر از عصاره در لوله آزمایش و سپس ۱/۱۶ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر فولین سیوکالتیو افزوده شد. بعد از ۸-۱ دقیقه استراحت، ۳۰۰ میکرولیتر محلول کربنات سدیم ۲۰ درصد به محلول اضافه شد و بعد از هم زدن به مدت ۳۰ دقیقه در حمام بن ماری (بهداد، ایران) با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و در شرایط تاریکی قرار گرفت. در شاهد متانول خالص جایگزین عصاره متانولی گردیده، سپس در طول موج ۷۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر مرئی/فرابنفش (UNICO, UV/VIS 2800) قرائت شد. نتایج برحسب میلی‌گرم گالیک اسید در یک گرم نمونه خشک محاسبه گردید. معادله استاندارد $R^2=0.99$ $Y=0.053x-0.086$ براساس غلظت‌های متفاوت اسید گالیک (۳۰۰-۲۵۰-۲۰۰-۱۵۰-۱۰۰-۵۰ میلی‌گرم) محاسبه گردیده و میزان ترکیبات فنولی معادل اسیدگالیک در هر گرم پودر خشک اندازه‌گیری و بر حسب میلی‌گرم اسیدگالیک بر گرم وزن خشک گزارش شد (۳۳).

اندازه‌گیری فلاونوئید کل: برای محاسبه محتوی فلاونوئیدها از روش آلومینیوم کلرید استفاده شد، بدین منظور ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره متانولی و اتانولی ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلرید ۱۰ درصد، ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد. برای تهیه شاهد، متانول خالص جایگزین عصاره متانولی گردید. محلول حاصل ۳۰ دقیقه در شرایط تاریکی قرار داده شد و سپس در طول موج ۴۱۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت شد. معادله استاندارد متفاوت کوئرستین $R^2=0.99$ $Y=0.0081x-0.0611$ براساس غلظت‌های (۳۰۰-۲۵۰-۲۰۰-۱۵۰-۱۰۰-۵۰ میلی‌گرم) محاسبه گردید و میزان فلاونوئید بر حسب معادل کوئرستین در هر گرم پودر خشک گیاه تعیین شد (۳۳).

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش درصد مهار رادیکال آزاد PPH^۱ برای اندازه‌گیری میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH (دی فنیل پیکریل هیدرازیل)، ابتدا یک میلی‌لیتر از عصاره متانولی با یک میلی‌لیتر DPPH با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار مخلوط گردید. برای نمونه شاهد یک میلی‌لیتر متانول خالص به جای یک میلی‌لیتر عصاره متانولی قرار داده شد و برای بلانک از متانول خالص استفاده

¹- (DPPH) 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

فعالیت آنتی‌اکسیدانی معنی‌دار ($P < 0.01$) بوده، در صورتی که بر میزان فلاونوئید کل اثر معنی‌داری نشان نداد ($P > 0.05$). اثر متقابل اندام و حلال و اندام و روش استخراج بر میزان فنل و فلاونوئید ($P < 0.01$) و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی ($P < 0.05$) اثرات معنی‌داری نشان داد.

روش استخراج هر کدام به طور جداگانه با اطمینان ۹۹ درصد بر فنل، فلاونوئید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل این گیاه اثر معنی‌دار داشت. اثرات متقابل ارتفاع و اندام، ارتفاع و حلال، ارتفاع و روش استخراج بر روی همه ویژگی‌های اندازه‌گیری شده اثر معنی‌دار ($P < 0.01$) نشان داد و همچنین اثر متقابل ارتفاع، اندام و حلال، بر میزان فنل و

جدول ۱: تجزیه واریانس متابولیت‌های ثانویه اندام‌های گیاه گل ماهور تماشایی در ارتفاعات مختلف مراتع چهارباغ استان گلستان با استفاده از حلال‌ها و روش‌های مختلف عصاره‌گیری

منابع تغییرات	درجه آزادی	فنل کل (میلی‌گرم معادل گالیک اسید بر گرم وزن خشک)	فلاونوئید کل (میلی‌گرم معادل کوئرستین بر گرم وزن خشک)	فعالیت آنتی‌اکسیدان به روش DPPH (درصد)
ارتفاع	۳	۶۲۸۲/۳۷**	۳۳/۲۵**	۳۹۱/۳۹**
اندام	۱	۱۴۸۱/۶۵**	۱۵۰/۵۶**	۱۳۷۴/۱۴**
حلال	۱	۵۵۴۶/۷۸**	۳۲۰/۸۶**	۱۸۶۳/۲۳**
روش استخراج	۱	۱۰۴۷/۲۸**	۱۰۳۷/۷۱**	۲۳۱۲۴/۶۸**
ارتفاع*اندام	۳	۱۱۱۴/۲۳**	۳۱/۶۶**	۱۲۰۶/۲۶**
ارتفاع*حلال	۳	۳۳۲/۸۶**	۲۲۶/۷۹**	۸۷۹/۲۵**
ارتفاع*روش استخراج	۳	۶۶/۴۶*	۱۹/۲۷**	۱۲۵۶/۹۸**
اندام*حلال	۱	۱۲۳۳۰/۶۶**	۳۲۲/۲۸**	۶۱۴/۵۵*
اندام*روش استخراج	۱	۱۹۶۹۳/۸۶**	۶۶۹/۹۱**	۴۰۷/۷۲*
ارتفاع*اندام*حلال	۳	۲۷۴/۴۸**	۹/۰۳ ^{ns}	۶۹۱/۶۷**
ارتفاع*اندام*روش استخراج	۳	۴۹۴/۷۸**	۳۶/۲۷**	۳۱۸/۰۳*
اندام*حلال*روش استخراج	۲	۱۱۹۸/۲۵**	۳۳۳/۶۸**	۲۶۲۰/۶۸**
ارتفاع*اندام*حلال*روش استخراج	۶	۸۴۲/۵۰**	۵۷/۳۶**	۶۰۰/۲۴**
خطا	۶۴	۱۴/۳۳	۵/۰۱	۱۰۸/۱۸
ضریب تغییرات	-	۵/۲۷	۱۱/۸۷	۲۱/۳

^{ns}: غیرمعنی‌دار

*: معنی‌دار در سطح ۵ درصد

** : معنی‌دار در سطح ۱ درصد

میزان فلاونوئید کل (۳۱/۰۷ میلی‌گرم معادل کوئرستین بر گرم وزن خشک) در اندام برگ، ارتفاع ۲۱۰۰ متر، حلال متانول و روش عصاره‌گیری با ریزموج - فراصوت و بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH (۸۱/۴۹ درصد) در اندام گل، ارتفاع ۲۱۰۰ متری، حلال اتانول و عصاره‌گیری به روش خیساندن مشاهده شد.

مقایسه میانگین اثر ارتفاع، اندام، حلال و روش استخراج بر ترکیبات ثانویه عصاره گیاه گل ماهور تماشایی به ترتیب در جداول ۳، ۴ و ۵ نشان داده شد. بیشترین میزان فنل کل (۱۱۹/۴۶ میلی‌گرم معادل گالیک اسید بر گرم وزن خشک) در اندام گل، ارتفاع ۲۱۰۰ متر، حلال اتانول و روش عصاره‌گیری ریزموج - فراصوت، بیشترین

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر میزان ارتفاع، نوع اندام، نوع حلال و روش استخراج بر میزان فنل، فلاونوئید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل گیاه گل ماهور تماشایی

فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل به روش DPPH (درصد)	فلاونوئید کل (میلی‌گرم معادل کونستین بر گرم وزن خشک)	فنل کل (میلی‌گرم معادل گالیک اسید بر گرم وزن خشک)		تیمار		ارتفاع (m)
		روش استخراج	حلال	اندام	روش استخراج	
۸۱/۴۹ ^a	۱۲/۷۸ ^{m-p}	۴۱/۵۸ ^a	خیسندن	گل	اتانول	۲۱۰۰
۴۱/۳۹ ^{gh}	۲۵/۵۱ ^{b-f}	۱۱۹/۴۶ ^a	امواج ماکروویو	گل	اتانول	۲۱۰۰
۲۶/۵۳ ^{hi}	۲۷/۱۱ ^{b-e}	۲۰/۳۸ ^{pq}	خیسندن	گل	متانول	۲۱۰۰
۱۷/۴۹ ^{ij}	۱۱/۷۶ ^{n-q}	۵۰/۴۱ ^l	امواج ماکروویو	گل	متانول	۲۱۰۰
۱۷/۴۹ ^a	۱۵/۷۵ ^{klm}	۱۱۸/۵۳ ^a	خیسندن	برگ	اتانول	۲۱۰۰
۲۸/۷۰ ^{hi}	۲۷/۹۸ ^{abc}	۸۴/۶۹ ^d	امواج ماکروویو	برگ	اتانول	۲۱۰۰
۳۳/۶۱ ^{hi}	۸/۵۹ ^{qr}	۸۶/۴۹ ^d	خیسندن	برگ	متانول	۲۱۰۰
۶۰/۹۸ ^{b-f}	۲۸/۲۵ ^{ab}	۸۵/۳۰ ^d	امواج ماکروویو	برگ	متانول	۲۱۰۰
۷۹/۷۷ ^a	۷/۲۱ ^r	۳۱/۷۸ ^o	خیسندن	گل	اتانول	۲۳۰۰
۳۱/۷۹ ^{hi}	۱۲/۲۰ ^{m-q}	۱۰۲/۷۸ ^b	امواج ماکروویو	گل	اتانول	۲۳۰۰
۵۲/۴۰ ^{efg}	۲۴/۴۰ ^{c-f}	۱۹۴/۱۲ ^{pq}	خیسندن	گل	متانول	۲۳۰۰
۲۷/۵۴ ^{hi}	۲۷/۰۳ ^{b-e}	۷۰/۴۶ ^{gh}	امواج ماکروویو	گل	متانول	۲۳۰۰
۷۱/۷۸ ^{a-d}	۱۳/۹۹ ^{k-o}	۵۶/۸۶ ^{jk}	خیسندن	برگ	اتانول	۲۳۰۰
۲۲/۴۶ ^{ij}	۱۶/۵۳ ^{kl}	۷۰/۰۵ ^{sh}	امواج ماکروویو	برگ	اتانول	۲۳۰۰
۶۹/۲۵ ^{a-e}	۱۴/۹۱ ^{k-n}	۱۱۵/۳۷ ^a	خیسندن	برگ	متانول	۲۳۰۰
۱۹/۹۸ ^{ij}	۳۱/۰۷ ^a	۸۳/۷۰ ^{de}	امواج ماکروویو	برگ	متانول	۲۳۰۰
۷۷/۲۵ ^{ab}	۱۰/۵۵ ^{o-r}	۴۳/۴۳ ^{mn}	خیسندن	گل	اتانول	۲۵۰۰
۲۸/۸۴ ^{hi}	۱۷/۳۸ ^{ijk}	۱۰۵/۱۲ ^b	امواج ماکروویو	گل	اتانول	۲۵۰۰
۸۰/۴۷ ^a	۲۳/۸۰ ^{efg}	۱۷/۸۳ ^q	خیسندن	گل	متانول	۲۵۰۰
۵۷/۸۳ ^{c-g}	۲۳/۰۳ ^{fgh}	۶۷/۰۱ ^{hi}	امواج ماکروویو	گل	متانول	۲۵۰۰
۷۶/۰۳ ^{ab}	۱۳/۸۴ ^{k-o}	۶۱/۹۷ ^{ij}	خیسندن	برگ	اتانول	۲۵۰۰
۲۳/۶۵ ^{ij}	۲۷/۰۶ ^{b-e}	۹۳/۷۷ ^c	امواج ماکروویو	برگ	اتانول	۲۵۰۰
۷۳/۹۹ ^{abc}	۱۳/۶۸ ^{l-o}	۱۱۵/۹۳ ^a	خیسندن	برگ	متانول	۲۵۰۰
۲۰/۳۶ ^{ij}	۲۷/۶۱ ^{a-d}	۸۵/۱۲ ^d	امواج ماکروویو	برگ	متانول	۲۵۰۰
۷۸/۹۶ ^a	۹/۴۱ ^{pqr}	۵۵/۰۰ ^{kl}	خیسندن	گل	اتانول	۲۷۰۰
۵۶/۷۱ ^{d-g}	۱۶/۵۱ ^{jkl}	۷۵/۲۵ ^{fg}	امواج ماکروویو	گل	اتانول	۲۷۰۰
۵۱/۵۳ ^{fg}	۲۰/۴۱ ^{ghi}	۲۴/۶۸ ^p	خیسندن	گل	متانول	۲۷۰۰
۵۱/۴۵ ^{fg}	۱۲/۵۸ ^{m-p}	۴۹/۱۴ ^m	امواج ماکروویو	گل	متانول	۲۷۰۰
۹۴/۸۰ ^{a-f}	۲۰/۰۳ ^{hij}	۸۴/۲۱ ^{de}	خیسندن	برگ	اتانول	۲۷۰۰
۹/۳۵ ^j	۲۵/۷۴ ^{b-f}	۷۸/۴۸ ^{ef}	امواج ماکروویو	برگ	اتانول	۲۷۰۰
۳۲/۹۸ ^{hi}	۱۲/۶۵ ^{m-p}	۹۹/۳۸ ^{bc}	خیسندن	برگ	متانول	۲۷۰۰
۳۴/۰۳ ^{hi}	۲۴/۰۸ ^{def}	۸۴/۸۵ ^d	امواج ماکروویو	برگ	متانول	۲۷۰۰

*حروف مشترک بیانگر عدم تفاوت معنی دار در میانگین تیمار است.

نتایج مقایسه میانگین سه عامل ارتفاع، اندام و حلال بر میزان IC₅₀ نمونه‌ها نشان داد که گونه گیاهی مورد مطالعه در ارتفاع ۲۵۰۰ متری، در اندام گل و با نوع حلال متانول بیشترین میزان IC₅₀ را دارا است (جدول ۵). بر این اساس هرچه میزان IC₅₀ بیشتر باشد، قدرت بازدارنده عصاره کمتر بوده است.

مقایسه میزان IC₅₀ نمونه‌ها یعنی مقدار آنی اکسیدان لازم برای کاهش رادیکال آزاد DPPH تا حد ۵۰ درصد غلظت اولیه، نشان داد که قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH تحت تاثیر سه عامل ارتفاع، اندام و نوع حلال به تنهایی یا اثر متقابل، در (P<0.01) معنی‌داری داشت (جدول ۳).

جدول ۳- تجزیه واریانس میزان IC₅₀ عصاره گل ماهور تماشایی

IC ₅₀	درجه آزادی	منابع تغییرات
۲۱۹۶/۶۳**	۳	ارتفاع
۲۴۷۶/۳۴**	۱	اندام
۵۲۷۸/۹۴**	۱	حلال
۵۸۲/۷۱**	۳	ارتفاع*اندام
۳۱۹/۹۰**	۳	ارتفاع*حلال
۵۹۶/۶۱**	۱	اندام*حلال
۶۴۳/۸۰**	۳	ارتفاع*اندام*حلال
۵۰/۴۱	۳۲	خطا
۱۴/۸	-	ضریب تغییرات

**مغنی دار در سطح ۱ درصد *مغنی دار در سطح ۵ درصد NS: غیرمغنی دار

جدول ۴- مقایسه میانگین سه عامل ارتفاع، نوع اندام و نوع حلال بر میزان IC₅₀ عصاره گل ماهور تماشایی

IC ₅₀	تیمار		
	حلال	اندام	ارتفاع (m)
۵۱/۱۹ ^c	اتانول	گل	۲۱۰۰
۷۸/۹۳ ^{ab}	متانول	گل	۲۱۰۰
۲۸/۴۲ ^{gh}	اتانول	برگ	۲۱۰۰
۵۱/۴۹ ^c	متانول	برگ	۲۱۰۰
۳۵/۰۰ ^{gh}	اتانول	گل	۲۳۰۰
۱۵/۲۴ ^{ij}	متانول	برگ	۲۳۰۰
۱۳/۴۷ ^j	اتانول	برگ	۲۳۰۰
۴۷/۰۱ ^{ef}	متانول	گل	۲۳۰۰
۵۶/۳۷ ^{de}	اتانول	گل	۲۵۰۰
۸۲/۶۸ ^a	متانول	گل	۲۵۰۰
۳۸/۴۵ ^{fg}	اتانول	برگ	۲۵۰۰
۵۳/۲۱ ^c	متانول	برگ	۲۵۰۰
۴۸/۹۶ ^{ef}	اتانول	گل	۲۷۰۰
۷۰/۳۶ ^{bc}	متانول	گل	۲۷۰۰
۲۵/۵۱ ^{hi}	اتانول	برگ	۲۷۰۰
۶۶/۲۴ ^{cd}	متانول	برگ	۲۷۰۰

*حروف مشترک بیانگر عدم تفاوت مغنی دار در میانگین تیمار است.

بحث و نتیجه گیری

سنجش ترکیبات فنلی می‌تواند بر میزان استخراج ترکیبات فنلی تاثیرگذار باشد (۲۰). این تحقیق به منظور بررسی اثر ارتفاع، حلال و روش استخراج بر خصوصیات فیتوشیمیایی گل ماهور تماشایی انجام گرفت. نتایج بررسی‌ها نشان داد که عامل ارتفاع بر میزان ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و آنتی‌اکسیدانی گل ماهور تماشایی تاثیرگذار بوده است به طوری که بالاترین میزان فنل در برگ گیاهان در ارتفاع ۲۱۰۰ متری، بالاترین میزان فلاونوئید کل در برگ گیاهان در ارتفاع ۲۳۰۰ متری و بیشترین درصد مهار رادیکال DPPH در گل گیاهانی که در ارتفاع ۲۱۰۰ متری تعیین شد. به طور مشابه با نتایج تحقیق حاضر، در پژوهشی پیرامون اثر ارتفاع بر برخی متابولیت‌های ثانویه گیاه آقطی (*Sambucus ebulus L.*) در سه شهر استان گلستان، نتایج

گیاه گل ماهور یکی از گونه‌های مطرح دارویی برای بیماری‌های عفونی است که در مراتع ایران گسترش دارد این گیاه به طور مرسوم برای درمان سرفه همچنین به عنوان تسکین‌دهنده و درمان آسم، برونشیت، درمان عفونت‌های پوستی، التهاب، زخم، سوختگی، عفونت گوش، نقرس و بواسیر استفاده می‌شود. تعیین میزان ترکیبات مؤثره و ارزش آنتی‌اکسیدانی در گیاهان دارویی به دلیل کاربرد وسیع آنها در صنایع مختلف از جمله غذایی، دارویی، آرایشی-بهداشتی، صنعتی و ... از اهمیت بالایی برخوردار است (۴۳) و عوامل متعددی مانند نمونه گیاهی (نوع گونه، جمعیت، اندام مورد استفاده، مرحله نمو)، شرایط محیطی گیاه (ساختار خاک، شرایط اقلیمی، ارتفاع و تنش‌ها) و روش‌های

حاکمی از آن بود که ترکیبات اندام‌های مختلف گیاه آقطی با افزایش ارتفاع افزایش می‌یابد، بطوریکه برگ گیاهانی که در ارتفاعات پایین تر رشد کرده بودند بیشترین میزان فنل، گل گیاهان در ارتفاعات کم، بیشترین میزان فلاونوئید و میوه این گیاهان نیز در ارتفاعات متوسط بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی را دارا بودند (۲۴). در تحقیق دیگری که به منظور بررسی اثر ارتفاع و اکوتیپ بر روی برخی متابولیت‌های ثانویه گیاه دارویی آقطی در سه استان گلستان، مازندران و گیلان انجام شد، بیشترین میزان فلاونوئید در بین سه اندام، در برگ گیاه آقطی و در منطقه توسکستان با ارتفاع کمتر از سطح دریا نسبت به دو منطقه دیگر در استان گلستان مشاهده گردید (۳۶). همچنین نتایج تحقیقات چورلی و همکاران (۱۳۹۵) در بررسی خصوصیات مورفولوژیکی، آنتی‌اکسیدانی و میزان اسانس گیاه دارویی چای کوهی (*Stachys lavandulifolia Vahl.*) در رویشگاه‌های استان‌های سمنان، خراسان شمالی و رضوی مشخص شد که بیشترین میزان فنل کل را شاهرود و کمترین را مشهد داشت که دلیل آن را می‌توان ارتفاع بالای منطقه شاهرود دانست (۸) زیرا از فاکتورهای تعیین کننده حاکم بر بوم‌نظام‌ها، ارتفاع از سطح دریا است. تغییرات ارتفاع و پستی و بلندی‌ها، درجه حرارت و مقدار رطوبت را مستقیماً و رشد گیاه را غیرمستقیم تحت تاثیر قرار می‌دهد و این از اثر ارتفاع بر میزان بارندگی، رطوبت نسبی و درجه حرارت ناشی می‌شود، بنابراین کمیت و کیفیت گیاهان نیز به تبعیت آن تغییر خواهد کرد. لذا تغییر در ارتفاع محل زندگی می‌تواند بسیاری از واکنش‌های اکوفیزیولوژیکی را دستخوش تغییر نماید (۲۱). نتایج این تحقیق نشان داد که تفاوت در نوع حلال‌ها و تفاوت در روش استخراج عصاره بر میزان استخراج ترکیبات فنولی تاثیر می‌گذارند، بطوری که با انتخاب حلال اتانول، مواد فنلی و با فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتر و با انتخاب حلال متانول مقدار قابل توجهی ترکیبات فلاونوئیدی از گیاه ماهور استحصال شده است (جدول ۳) که با نتایج عزیزیان شرمه و همکاران (۱۳۹۶) نیز در بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های مختلف گیاه کاه مکی (*Cymbopogon olivieri* (Boiss.) Bor.) از استان سیستان و بلوچستان بیان کردند

که فعالیت آنتی‌اکسیدانی و میزان فنل و فلاونوئید کل از بیشترین به کمترین به صورت عصاره متانولی > عصاره اتانولی بوده است (۷). برعکس این نتایج در تحقیق گواهی و همکاران (۱۳۹۸) در بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌باکتریایی و تعیین محتوی فنلی و فلاونوئیدی کل عصاره‌های آبی و متانولی گیاه بشقابی (*Scutellaria peginensis*) مشخص کرد که بیشترین میزان فنل و فلاونوئید کل توسط عصاره متانولی به دست آمد (۱۵). همچنین نتایج داوری نژاد و همکاران (۲۰۱۷) در بررسی تاثیر حلال‌های مختلف بر میزان ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی میوه عناب (*Ziziphus jujube Miller.*) حاکمی از آن است که در استخراج ترکیبات فنل و فلاونوئید کل، استون ۵۰ درصد بهترین عملکرد را در میان سایر حلال‌های به کار رفته داشته است (۹) لذا چنین استنباط می‌شود که حلال اتانول جهت استخراج ترکیبات موثره این گیاه کارایی بیشتری دارد و از آنجا که درجه قطبیت بالاتری دارد، ترکیبات قطبی بیشتری از گیاه را در خود حل می‌کند. (جدول ۳). طبق نتایج این تحقیق بالاترین میزان فنل و فلاونوئید کل، در گیاهانی که با روش ریزموج و بیشترین درصد مهار رادیکال DPPH در گیاهانی که با روش خیساندن عصاره گیری شدند، تعیین شد که با نتایج خاقانی و همکاران (۲۰۱۲) در بررسی تاثیر روش‌های مختلف عصاره‌گیری بر میزان ترکیبات فنلی گیاه پونه کوهی (*Mentha pulegium*)، اینس^۱ و همکاران (۲۰۱۳) در مقایسه روش‌های استخراج همرفتی، فراصوت و خیساندن برای استخراج ترکیبات فنلی گیاه بادرنجبویه (*Mellisa officinalis*) و قربانی و همکاران (۲۰۱۷) در بررسی تاثیر شرایط عصاره‌گیری با امواج فراصوت بر عملکرد و خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه رازیانه (*Foeniculum vulgare*) مطابقت داشت. همچنین عنایتی و همکاران (۱۳۹۶) در مقایسه روش‌های مختلف عصاره‌گیری در استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی گیاه سنا (*Cassia angustifolia*) دریافتند که در بین روش‌های مختلف عصاره‌گیری شامل خیساندن با دو نوع حلال اتانول ۹۶ و ۶۰ درصد، روش خیساندن با حلال اتانول ۹۶ درصد به عنوان مناسب‌ترین شیوه عصاره‌گیری از گیاه سنا می‌باشد.

1- Ince

diocia L. که در آن میزان استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی برگ و ساقه با استفاده از ریزموج با توان ۶۰۰ وات در مقایسه با روش سنتی بیشینه بود، موید این مطلب است. در طول تخریب بافت‌ها و عصاره‌گیری با روش ریزموج - فراصوت، احتمال تشکیل رادیکال‌های آزاد از مولکول‌های حلال نیز وجود دارد. بنابراین ممکن است یکی از دلایل پایین بودن میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره حاصل از روش ریزموج - فراصوت در این پژوهش در مقایسه با روش دیگر، مصرف بخشی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها برای حذف رادیکال‌های آزاد تولید شده طی عصاره‌گیری با روش ریزموج - فراصوت باشد (۱۸). همچنین طبق این تحقیق مشخص شد که مقادیر IC_{50} عصاره متانولی گل گیاه ماهور در طبقه ارتفاعی ۲۵۰۰ متر دارای مقادیر بیشتر و فعالیت آنتی‌اکسیدانی کمتر است، بطوریکه در ارتفاع کمتر فعالیت آنتی‌اکسیدانی این گونه بیشتر است. نتایج خلاصی اهوازی و همکاران (۲۰۱۶) نشان داد که گیاه کنگر فرنگی (*Gundelia tournefortii L.*) در ارتفاع کمتر ۲۱۰۰-۱۹۰۰ متر IC_{50} دارای مقادیر کمتر و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بهتر و در ارتفاع ۲۷۰۰-۲۵۰۰ متر IC_{50} دارای مقادیر بیشتر و فعالیت آنتی‌اکسیدانی کمتر بوده است. عوامل بسیار زیادی از جمله آب، هوا، خاک، ارتفاع، اختلاف در گونه‌های مختلف، روش‌های استخراج و روش‌های اندازه‌گیری‌های فعالیت آنتی‌اکسیدانی‌ها در میزان متابولیت‌های ثانویه گیاهی از جمله فنل کل، فلاونوئید کل و خواص فعالیت آنتی‌اکسیدانی دخالت دارند. در نهایت، با مقایسه یافته‌های این تحقیق و دیگران مشخص شد که عامل ارتفاع از سطح دریا بر خصوصیات فیتوشیمیایی گونه مورد بررسی نیز موثر بود و یک همبستگی معنی‌داری با برخی از این خصوصیات نشان داد. در صورتی که هدف، برداشت درصد بالایی از ترکیبات فنل و فلاونوئیدی گل ماهور تماشایی است، جمع-آوری این گونه در ارتفاعات پایین و عصاره‌گیری با حلال اتانول و روش استخراج ریزموج-فراصوت توصیه می‌شود. با توجه به نتایج تحقیق حاضر پیشنهاد می‌شود به منظور استفاده بهینه از گیاهان دارویی و استخراج بهتر مواد مؤثره به این عوامل توجه بیشتری گردد.

روند استخراج ترکیبات فنولی یک فاکتور مهم در تعیین خصوصیات آنتی‌اکسیدانی عصاره است. دما، حلال، زمان عصاره‌گیری، قدرت استخراج و روش استخراج تاثیر بارزی در محتویات عصاره خواهد گذاشت. این تفاوت‌ها وابسته به تمایل این ترکیبات به حلال مورد نظر برای عصاره‌گیری و مخصوصاً قطبیت آن است (۳۹). استخراج مواد با روش خیساندن به طور قابل ملاحظه‌ای تحت تاثیر حلال صورت می‌گیرد و با توجه به نوع ترکیباتی که باید استخراج شوند، حلال آن انتخاب می‌شود. در مورد استخراج ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدانی، هرچه میزان قطبیت حلال بیشتر باشد میزان ماده استخراج شده نیز افزایش می‌یابد (۲). شاید یکی از دلایل بهتر بودن نتایج عصاره‌گیری به روش خیساندن استفاده از حلال اتانول ۸۰ درصد به عنوان حلال عصاره‌گیری در این پژوهش باشد. همچنین انتخاب روش استخراج، می‌تواند کارایی استخراج مواد ثانویه موجود در گیاه را به میزان چشمگیری افزایش دهد. معمولاً عصاره‌گیری از گیاهان دارویی با روش‌های معمول خیساندن و سوکسله که از جمله معروفترین روش‌های استخراج برای جداسازی ترکیبات آلی گیاهان دارویی می‌باشند به زمان زیاد، درجه حرارت بالا و حجم زیادی از حلال نیاز دارد. طی دهه‌های گذشته، مشخص شد در روش ریزموج - فراصوت با افزایش قابلیت نفوذ در سلول‌های گیاهی فرایند استخراج مواد درون سلولی با سهولت و سرعت بیشتری انجام می‌گیرد. همچنین این روش باعث کاهش مصرف زمان، آب و انرژی و در نتیجه کاهش هزینه‌ها و افزایش بازده استخراج می‌شود (۳۵). وقتی ریزموج در کنار تکنیک فراصوت قرار می‌گیرد کارایی روش مذکور را بالا می‌برد، همچنین می‌تواند بر کمیت و کیفیت مواد استخراجی از سلول گیاهی تاثیر گذار باشد و دلیل اصلی این موضوع را به تخریب سازمان یافته دیواره سلولی مرتبط می‌دانند. همچنین فراصوت باعث افزایش سینتیک و بهبود کیفیت عصاره می‌شود (۱۸). طبق نتایج این تحقیق نیز در کنار روش‌های استخراج ریزموج، تکنیک فراصوت اعمال شد و باعث استخراج بیشتر مواد فنلی و فلاونوئیدی شد (جدول ۳) که نتایج مطلب و همکاران (۲۰۱۵) در مقایسه عصاره‌گیری به کمک ریز موج و عصاره‌گیری سنتی از گیاه گزنه (*Urtica*

References

1. Abromandazar, P., Z. Motaghian, A. Sharifan & K. Larijani, 2010. Investigating the effect of extraction method on chemical composition and antimicrobial activity of herbal essential oils (*Carum copticum*). *Food Science and Nutrition*, 7(2): 10-18.
2. Akhbari, M., Z. Aghajani, E. Karimi & A. Mazochi, 2016. [Study of chemical compounds of essential oil and Antioxidant and antimicrobial activity of oily compounds of *menthe longifolia*]. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 6: 9- 44.
3. Amiri, H., 2015. Composition and antioxidant activity of the essential oil and methanolic extract of *Ziziphora clinopodioides* Lam in preflowering stage. *Journal Kerman University Medical Sciences*, 16: 79-86.
4. Aryanfar, M., D. Akbari Nodehi, KH. Hemmati & M. Rostampoor, 2018. Effect of height and direction on essential oil yield and some phytochemical properties of medicinal species *Artemisia aucheri* Boiss *Artemisia sieberi* Besser. In the pastures of South Khorasan. *Journal of Rangeland Research*, 200-207.
5. Asgari, S., P. Khadiv Parsi, S. Rezazadeh & P. Pirali Hamedani, 2011. Experimental Optimization of Solid-Liquid Extraction. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering (NSMSI)*, 30(3): 61-68.
6. Azizi, M., R. Chizzola, A. Ghani & F. Oroojalian, 2010. Composition at different development stages of the essential oil of four *Achillea* species grown in Iran. *Natural product communications, an international Journal for Communications and Reviews covering all Aspects of Natural Products Research*, 5(2): 175-350.
7. Azizian shermeh, A., M. Taherizadeh, M. Valizadeh & H. Zaboli, 2017. Investigation of antimicrobial and antioxidant activities and phytochemical compounds of essential oils and extracts of (*Cymbopogon olivieri* (Boiss.) Bor.) from Sistan and Baluchestan province. *Journal of Sabzevar University of Medical Sciences*, 25(2): 101-111.
8. Chorli, S., S. Khorasani Nezhad, KH. Hemati & B. Kashefi, 2016. Evaluation of morphological, antioxidant and essential oil content of medicinal plant (*Stachys lavandulifolia* Vahl.) In the habitats of Semnan, North Khorasan and Razavi provinces. *Journal of Plant Environmental Physiology*, 11(41):41-52.
9. Davarinezhad, G.H., F. Taghinezhad & J. Asili, 2017. The effect of different solvents on the amount of phenolic compounds and antioxidant activity of jujube fruit (*Ziziphus jujube* Miller.). *Journal of Horticultural Sciences*, 31(1): 158-166.
10. Enayati, N., R. Ghaffarzagdegan, R. Hajiaghahi & M. Vazirian, 2017. Comparison of different extraction methods in extracting the active ingredients of (*Cassia angustifolia*). *Quarterly Journal of Medicinal Plants*, 64(4): 160-168.
11. Fazelinasab, B., M. Rahnama & A. Mazarei, 2017. [Correlation between Antioxidant Activity and Antibacterial Activity of Nine Medicinal Plant Extracts]. *Journal of Mazandaran University Medical Science*, 27(149): 63-78.
12. Fille cache, A., A. Aliabadi, H. Farzane, M. Borzooei & A. Adadrasi, 2012. Ecology study of (*Salvia leriifolia*) in Sabzevar. *Congress of Horticultural Sciences*. Bu-Ali Sina University.
13. Froozeh, M.R. & S.Z. Mirdeylami, 2019. Investigating the effect of environmental factors on changes in the chemical composition of medicinal species essential oil (*Achillea millefolium*). *Rangeland Scientific Research Journal*, 13(4):596-609.
14. Ghorbani, M., M. Abonajmi, M. Javid-Ghorbani & A. Arab-Hosseini., 2017. In the study of the effect of extraction conditions with ultrasonic waves on the yield and antioxidant properties of fennel plant extract (*Foeniculul vulgare*). *Journal of Science and Technology*, 21:12-24.
15. Govahi, M. F. Ghorbani, M. Ranjbar, S. Rahaii & H. Azizi, 2019. In the study of antioxidant, antibacterial activity and determination of phenolic and flavonoid content of all aqueous and methanolic extracts of (*Scutellaria pekinensis*). *Journal of Ilam University of Medical Sciences*, 27(3): 91-100.
16. Hakimi, L. & M. Goodarzi, 2020. The Effect of Extraction Method on Phenolic and Flavonoid Compounds and Antioxidant Activity of (*Satureja avromanica* Maroofi.). *Plant Produce*, 43(1): 117-128.
17. Handley, A.J., 2000. Extraction methodes in organic analysis. John Wiley and Sons, Incorporated, 320p.
18. Ince A.E., S. Sahin & S.G. Sumnu, 2013. Extraction of phenolic compounds from *Melissa* using microwave and ultrasound. *Agriculture and Forestry*, 37: 69-75.
19. Iranbakhsh, A.R., S.M. Hamdi & M. Assadi, 2010. Flora, life forms and Chorotypes of plants of Garmsar region in Semnan province, Iran, *Pajouhesh and Sazandegi*.79: 179-199.
20. Jafari-Fotami, E. M. Mazandarani, M. Akbarloo & M.R. Froozeh, 2016. Investigation of the most important ecological needs, chemical compositions of essential oils, phenols, total flavonoids and antioxidant activity of medicinal plants *Phlomis herba-venti* along with the floristic spectrum of species in Hezar Jerib region. *Journal of Ecophytochemistry of Medicinal Plants*, 4(4):24-36.

21. Jahantab, S., M. Sharafatmandrad, B. Fathi, R. Karami Barzalabad & A. Afrigan, 2015. Investing some characteristics of the medicinal plant species *Smyrniun cordifolium* Boiss. In Boyer aahmad region. *Journal of Plant Environmental Physiology*, 10(39): 55 – 65.
22. Jovancevic, M., J., Balijagic, N. Menkovic, K. Savikin, G. Zdunic, T. Jankovic & M. Dekic- Ivankovic., 2014. Analysis of phenolic compounds in wild populations of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) from Montenegro. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(6): 910-914.
23. Kabiri S. & S.Z. Sayyedlangi., 2015. Comparison of antioxidant effect of different extracts from (*Melissa officinalis*) leaves with immersion and microwave assisted extractions and its oxidative stability on soybean oil. *Innova Food Technology*, 2:23-38.
24. Kaghazloo, Z., S. Hemati & S. Khorasaninezhad, 2017. Elevation effect on some secondary metabolites of various organs of the (*Sambucus ebulus* L.) in three cities of Golestan province. *Journal of Plant Environmental Physiology*, 12(47): 1-13.
25. Karimian, V., M.R. Vahabi, Fazilati & M. Tarkesh-Esfahani, 2012. The effect of ecological factors on the chemical composition of *Verbascum songaricum* Schrenk. *Journal of Herbal Medicine*, 3(3): 191-198.
26. Karimian, V., M.R. Vahabi, M. Fazilati, & M. Tarkesh-Esfahani, 2013. Investigation of ecological and morphological characteristics of rabbit plant *Verbascum cheirantifolium* Boiss.) In the rangeland ecosystems of Dena city, 1(1):33-48.
27. Khaghani, F., S.Z. Mehrinezhad & A.A. Sari, 2018. Evaluation of the effect of different extraction methods on the amount of phenolic compounds of (*Mentha pulegium*). Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, 146-148.
28. Khalasi-Ahvazi, L., G.H. Heshmati, P. Zofen & M. Akbarloo, 2016. The effect of environmental factors on the antioxidant activity of plant species (*Gundelia tournefortii* L.) at different stages of growt. *Rangeland Scientific Research Journal*, 2(10):237-246
29. Khazae, F.A., HR. Etebarian, A. Roustae & A. Alizadeh, 2011. Study of changes in peroxidase enzyme and total phenol in golden delicious apple fruits inoculated with an antagonistic isolate of *pseudomonas fluorescens* and *penicillium expansum* the causal agent of apple blue mould. *Seed International Journal of Plant Production*, (4): 419-443.
30. Khorasani-Esmaeili A., R.M. Taha, S. Mohajer & B. Banisalam, 2015. Antioxidant activity and total phenolic and flavonoid content of various solvent extracts from in vivo and in vitro grown *Trifolium pratense* L. (Red Clover). *BioMed Research International*, 12: 1-11.
31. Lawrence K, R. Lawrence, D. Parihar, R. Srivastava & R. Charan, 2012. Anioxidant activity of palmarosa essential oil (*Cymbopogon martini*) grown in north Indian plains. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2(2): 765-768.
32. Mahmoodzadeh Tilami, Z. A. Sattarian & M. Mazandarani, 2014. Investigation of the effect of some ecological factors on the quantity and quality of essential oil of Fraction medicinal plant in Chaharbagh rangelands of Golestan province. Thesis for master's degree (Ms.c). 66p.
33. Mashayekhi, K. & S. Atashi, 2014. The analyzing methods in plant physiology (surveys before and after harvest), Gorgan. 310p.
34. Mazandarani, M., M. Ghasemali & M. Ghaforian, 2015. Investigation of ecological needs, floristic, phytochemical and antioxidant spectra of different extracts of medicinal plants (*Nepeta cataria* L.) in Golestan and Mazandaran provinces. *Journal of Ecophytochemistry of Medicinal Plants*, 3(12):40-57.
35. Mohammadhosseini, M., 2016. A Comprehensive Review on new methods for processing, separation and identification of the essential oils. Islamic Azad University of Shahrood Press, Shahrood, Iran. 61-73.
36. Mohammadi pour, S., K.H. Hemati & P. Ebrahimi, 2014. The effect of height on the secondary metabolites of *Sambucus ebulus* L. Msc. Thesis of Gorgan University Agricultural Sciences and Natural Resources, 115p.
37. Motaleb, G.R., M.R. Lohrasbi-Dashtaki & M. Nejati-Yazdi, 2015. Comparison of extraction with the help of microwave and traditional extraction of (*Urtica dioica* L.) plant and evaluation of its antioxidant activity by method HPLC and DPPH. *Journal of Plant Research*, 28(2).
38. Motamedi, J., A. Alijanpour & A. Banj-shafie, A. 2016. Report of comprehensive project of recognition and utilization of byproducts of rangelands and forests of West Azerbaijan province. Vice Research of Urmia University, 150p.
39. Mozdastan, SH. M.A. Ebrahimzadeh & M. Khalili, 2015. Comparison of the importance of different extraction methods on the antioxidant activity of *Myrtus communis* leaves. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*, (127): 10-24.
40. Mussatto S.I., L.F. Ballesteros, S. Martins & J.A. Teixeir, 2011. Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. *Separation Purification Technology Journal*, 83: 9-173.

41. Pan, G., C. Yu & J. Qiao, 2012. Optimization of ultrasound-assisted extraction (UAE) of flavonoids (FC) from hawthorn seed (HS). *Ultrason Sonochemistry*, 19(3): 486-90.
42. Saboura A., A. Ahmadi, A. Zeynali & M. Parsa, 2014. Comparison between the contents of phenolic and flavonoid compounds and aerial part antioxidant activity in *Scutellaria pinnatifida* in two north Iranian populations. *Journal of Rafsanjan University Medical Sciences*, 13(3): 249-66.
43. Safi, Z., K. Saeidi, Z. Lorigooini & H.A. Shirmardi, 2016. Evaluation of total phenols and antioxidant activity of Mullein (*Verbascum songaricum*) ecotypes. *Journal of Shahrekord University of Medical Sciences*, 17:56-62.
44. Samsam Shariat, H., 2007. Extraction and extraction of active ingredients of medicinal plants. Manny Press, 258p.
45. Sotoodeh, A., F. Attar & L. Civeyrel, 2015. *Verbascum shahsavarensis* (Scrophulariaceae), a new species for Flora of Iran. *Phytotaxa*, 203(1): 76-80.
46. Stoilova, A., A. Krastano, P. Dtoyanova, P. Senev & S. Farfova, 2010. Antioxidant activity of ginger extract (*Zingiber Officinale*). *Food Chemistry*, 102: 764- 770.
47. Yari, R., G.A. Heshmati & H. Rafiei, 2019. Identifying and determining the potential of medicinal, industrial and edible plants of Chaharbagh summer pastures in Golestan province. *Rangeland Scientific Research Journal*, 13(3): 350-367.