University of Tehran Press

Iranian Journal of Horticultural Science

Online ISNN: 2008-482X

Homepage: http:// ijhs.ut.ac.ir/

Study of the Content of Phenolic, Flavonoid and Leiocarposide Compounds in Different Organs and Phenological Stages of *Solidago virga-urea* L.

Sepideh Parsafar[1] | Ghasem Eghlima[2]✉ | Mohammad Hossein Mirjalili[3] | Samad Nejad Ebrahimi[4] | Hassan Ghorbani Ghozhdi[5] | Javad Hadian[6]

1. Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran. E-mail: Sepideh.parsafar@gmail.com
2. Corresponding Author, Department of Agriculture, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran. E-mail: gh-eghlima@sbu.ac.ir
3. Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran. E-mail: m_mirjalili@sbu.ac.ir
4. Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran. E-mail: s_ebrahimi@sbu.ac.ir
5. Department of Agriculture, Faculty of Sciences, University of Gonabad, Gonabad, Iran. E-mail: hghorbani1955@yahoo.com
6. Department of Agriculture, Chilliwack Campus, BC, Canada. E-mail: javad.hadian@ufv.ca

Article Info

Article type:

Research Article

Article history:

Received: 3 July 2022

Received: 22 January 2023

Accepted: 25 January 2023

Published online: 21 March 2023

Keywords:

Total flavonoids,

HPLC,

Leiocarposide,

Developmental stage.

ABSTRACT

Solidago virga-urea L. is a valuable medicinal plant that has anti-inflammatory, antimicrobial, antispasmodic, diuretic and analgesic effects. In order to evaluate the phenolic and flavonoid compositions in different organs extract (rosette leaf, stem leaf and flower) and also in extracts obtained from different growth stages (before bloom, first bloom, full bloom and after bloom) of *S. virga-urea* L.'Phasa F type', two separate experiments were conducted in the form of a randomized complete block design with three replications. The experiment carried out in the Research Institute of Plants and Medicinal Raw Materials of Shahid Beheshti University of Tehran in 2019. Phytochemical properties including total phenol content, total flavonoids and leiocarposide content were measured by Folin–Ciocalteu, Aluminum Chloride method and high performance liquid chromatographic analysis, respectively. The results showed that among different organs, the highest amount of phenol (29.36 mg GAE.g-1 dry weight) was in flowers, flavonoids (8.63 mg RUT. g-1 dry weight) in rosette leaves, and leiocarposide (5.17 mg.g-1 dry weight) in stem leaves. Among the growth stages, the highest total phenol (28.84 mg GAE.g-1 dry weight) and total flavonoids (7.95 mg RUT. g-1 dry weight) were obtained in the full bloom stage, while the highest amount of leiocarposide (9.65 mg.g-1 dry matter) obtained before blooming. According to the results obtained from this study, the best organ and harvest time for having high amounts of total phenol, total flavonoids or leiocarposide can be chosen based on pharmaceutical and food industries requirements, in the climatic conditions of Tehran.

Cite this article: Parsafar, S., Eghlima, Gh., MIrjalili, M. H., Nejad Ebrahimi, S., Ghorbani Ghozhdi, H., & Hdian, J. (2023). Study of the Content of Phenolic, Flavonoid and Leiocarposide Compounds in Different Organs and Phenological Stages of *Solidago virga-urea L.* . *Iranian Journal of Horticultural Science*, 54 (1), 19-31. DOI: http//doi.org/10.22059/IJHS.2023.344855.2041

© The Author(s).

Publisher: University of Tehran Press.

DOI: http//doi.org/10.22059/IJHS.2023.344855.2041

Extended Abstract

Introduction

Solidago virga-urea L. is a valuable medicinal plant that has anti-inflammatory, antimicrobial, antispasmodic, diuretic and analgesic effects. *S. virga-urea* L a perennial rhizomatous plant with a height of 25-100 cm belonging to the Asteraceae family has a wide distribution throughout Europe, the temperate regions of Asia and North-West Africa. Its distribution in Iran is limited to the forest and open pasture areas of Golestan, Mazandaran and Gilan provinces. Herbal medicines containing *S. virga-urea* have been used for centuries to treat urinary tract diseases. These drugs have anti-inflammatory, antimicrobial, diuretic, antispasmodic and

sedative effects and are used to treat inflammation, infection, prevent the formation of kidney stones and help to remove urinary stones in a safe and secure manner. This study explores the effect of types of organs and growth stages on phytochemical compounds and active substances of *S. virga-urea*.

Materials and methods

In order to evaluate the phenolic and flavonoid compositions in different organs extract (rosette leaf, stem leaf and flower) and also in extracts obtained from different growth stages (before bloom, first bloom, full bloom and after bloom) of *S. virga-urea* L.'Phasa F type', two separate experiments were conducted in the form of a randomized complete block design with three replications. *S. virga-urea* var. 'Phasa F type' seeds were obtained from Pharmasaat CO. (Germany). The experiment carried out in the Research Institute of Plants and Medicinal Raw Materials of Shahid Beheshti University of Tehran in 2019. In the first part of the research, different organs of the plant, including rosette leaves, stem leaves, and flowers were harvested at the full flowering stage. In the second part, sampling was done at four different phenological stages (before bloom, first bloom, full bloom, and after bloom), from the flowering branch of the plant. The samples were dried under shade and room temperature conditions. In order to extract phenolic and flavonoid compounds, 200 mg of dry plant samples were powdered, and then 10 ml of methanol was added to the sample and placed in an ultrasonic bath at room temperature for 30 minutes. Phytochemical properties including total phenol content, total flavonoids and leiocarposide content were measured by Folin–Ciocalteu, Aluminum Chloride method and high performance liquid chromatographic analysis, respectively.

Results

The results showed that among different organs, the highest amount of total phenol (29.36 mg GAE.g^{-1} dry weight) was in flowers، flavonoids (8.63 mg RUT. g^{-1} dry weight) in rosette leaves، and leiocarposide (5.17 mg.g^{-1} dry weight) in stem leaves. Due to medicinal importance of the studied compounds, all three organs (rosette leaves, stem leaves, and flowers) can be used depending on the needs of the pharmaceutical and food industries. Among the growth stages, the highest phenol (28.84 mg GAE.g-1 dry weight) and total flavonoids (7.95 mg RUT. g^{-1} dry weight) were obtained in the full bloom stage, while the highest amount of leiocarposide (9.65 mg.g^{-1} dry matter) obtained before blooming. According to the findings, it is recommended to harvest the flowering branches at the full flowering stage to obtain the maximum levels of total phenol and flavonoid, and at the early flowering stage to obtain the highest levels of leiocarposide.

Conclusion

The content of phenol, flavonoid and leiocarposide were varied in different organs and developmental stages. Therefore, it is concluded that the amount of active ingredients in this plant are never fixed and depends completely on environmental and soil factors, organ type, genetic diversity and plant phenology. According to the results obtained from this study, the best organ and harvest time for having high amounts of total phenol, total flavonoids or leiocarposide can be chosen based on pharmaceutical and food industries requirements, in the climatic conditions of Tehran.

نشریه علوم باغبانی ایران، دوره ۵۴، شماره ۱

انتشارات دانشگاه تهران

شاپا الکترونیکی: ۲۴۲۳-۷۹۳۰

Homepage: http://ijhs.ut.ac.ir//

بررسی محتوای ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و لئوکارپوزاید در اندام و مراحل فنولوژیکی مختلف گیاه دارویی *Solidago virga-urea* L.

سپیده پارسافر[۱] | قاسم اقلیما[۲] ✉ | محمد حسین میرجلیلی[۳] | صمد نژاد ابراهیمی[۴] | حسن قربانی قوژدی[۵] | جواد هادیان[۶]

۱. پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهیدبهشتی تهران، تهران، ایران. رایانامه: Sepideh.parsafar@gmail.com

۲. نویسنده مسئول، گروه کشاورزی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهیدبهشتی، تهران، ایران. رایانامه: gh-eghlima@sbu.ac.ir

۳. گروه کشاورزی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهیدبهشتی تهران، تهران، ایران. رایانامه: m_mirjalili@sbu.ac.ir

۴. گروه فیتوشیمی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهیدبهشتی تهران، تهران، ایران. رایانامه: s_ebrahimi@sbu.ac.ir

۵. گروه کشاورزی، دانشکده علوم، مجتمع آموزش عالی گناباد، گناباد، ایران. رایانامه: hghorbani1955@yahoo.com

۶. گروه کشاورزی، پردیس چیلیواک، دانشگاه فرزر والی، ب. سی.، کانادا. رایانامه: javad.hadian@ufv.ca

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقالهٔ پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۱۲
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۱۱/۰۲
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۰۵
تاریخ انتشار: ۱۴۰۲/۰۱/۰۱

کلیدواژه‌ها:
فلاونوئید کل، کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا، لئوکارپوزاید، مراحل نمو.

چکیده

Solidago (علف طلایی اروپایی) از گیاهان ارزشمند دارویی است که دارای اثرات ضد التهاب، ضد میکروب، ضد اسپاسم، مدر و مسکن می‌باشد. به منظور بررسی میزان ترکیات فنلی و فلاونوئیدی عصاره علف طلایی اروپایی رقم فسا اف‌تایپ در اندام‌ها (برگِ روزت، برگِ ساقه و گل) و مراحل رشدی مختلف (مرحل قبل از گلدهی، ظهور آغازه‌های گل، گلدهی کامل و پس از گلدهی)، دو آزمایش جداگانه در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهیدبهشتی تهران در سال ۱۳۹۸ اجرا شد. خصوصیات فیتوشیمیایی شامل محتوای فنل کل، فلاونوئید کل و مقدار لئوکارپوزاید به ترتیب به روش فولین سیوکالتو، آلومینیوم کلراید و آنالیز کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا اندازه‌گیری شدند. نتایج نشان داد که در بین اندام‌های مختلف، بیشترین میزان فنل در گل (۲۹/۳۶ میلی‌گرم گالیک‌اسید در گرم ماده خشک)، فلاونوئید در برگ روزت (۸/۶۳ میلی‌گرم روتین در گرم ماده خشک) و لئوکارپوزاید در برگ ساقه (۵/۱۷ میلی‌گرم در گرم ماده خشک) انباشته است. در بین مراحل رشدی، بیشترین فنل (۲۸/۸۴ میلی‌گرم گالیک‌اسید در گرم ماده خشک) و فلاونوئید کل (۷/۹۵ میلی‌گرم روتین در گرم ماده خشک) در مرحله گلدهی کامل و بیشترین میزان لئوکارپوزاید (۹/۶۵ میلی‌گرم در گرم ماده خشک) در مرحله قبل از گلدهی بدست آمد. براساس نتایج این پژوهش می‌توان بهترین اندام و زمان برداشت مناسب جهت دستیابی به بالاترین میزان فنل کل، فلاونوئید کل و لئوکارپوزاید را براساس نیاز صنایع دارویی و غذایی در شرایط اقلیمی تهران انتخاب کرد.

استناد: پارسافر، سپیده؛ اقلیما، قاسم؛ میرجلیلی، محمدحسین؛ نژاد ابراهیمی، صمد؛ قربانی قوژدی، حسن؛ و هادیان، جواد (۱۴۰۲). بررسی محتوای ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و لئوکارپوزاید در اندام و مراحل فنولوژیکی مختلف گیاه دارویی *Solidago virga-urea* L. *نشریه علوم باغبانی ایران*، ۵۴ (۱)، ۳۱-۱۹
DOI: http//doi.org/10.22059/IJHS.2023.344855.2041

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

DOI: http//doi.org/10.22059/IJHS.2023.344855.2041

مقدمه

جنس *Solidago* شامل تقریباً ۱۲۰ گونه در جهان است که مهم‌ترین گونه‌های کشت شده شامل *S. cutleri*، *S. canadensis*، *S. caesias*، *S. bicolor*، *S. graminifolia*، *S. shortii*، *S. virga-urea*، *S. rigida* و *S. riddellii* می‌باشد. *S. virga-urea* ، *S. gigantea* و *S. canadensis* از نظر کاربرد در طب سنتی بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند (Sakaguchi *et al*., 2018). علف طلایی (*S. virga-urea* L.)، گیاهی چند ساله و ریزوم‌دار به ارتفاع ۱۰۰– ۲۵ سانتیمتر متعلق به تیره کاسنی (Asteraceae)، از جمله گیاهان با ارزش دارویی است. پراکندگی جهانی این گیاه در سراسر اروپا، نواحی معتدله آسیا و شمال غرب آفریقا بوده (Semple *et al*., 2020) و در ایران نیز دامنه انتشار آن محدود به نواحی جنگلی و باز مرتعی استان‌های گلستان، مازندران و گیلان می‌باشد (Mozaffarian, 2012). داروهای گیاهی حاوی علف طلایی اروپایی طی قرن‌ها برای درمان بیماری‌های دستگاه ادراری مورد استفاده قرار گرفته‌اند. این داروها دارای اثرات ضد التهاب، ضد میکروبی، مُدر، ضد اسپاسم و مسکّن می‌باشند و برای درمان التهاب، عفونت، پیشگیری از تشکیل سنگ کلیه و کمک به دفع سنگ‌های ادراری به‌صورت ایمن و بی‌خطر مورد استفاده قرار گرفته‌اند. اثرات فارماکولوژیک این گیاه، عمدتاً به خاطر وجود ترکیبات شیمیایی ساپونین‌ها، فنولیک اسیدها، فلاونوئیدها و به خصوص لئوکارپوزاید می‌باشند (Yaneva *et al*., 2020). لئوکارپوزاید محدود به گونه علف طلایی اروپایی می‌باشد و در سایر گونه‌های این جنس مشاهده نشده است. فرمول مولکولی لئوکارپوزاید $C_{۲۷}H_{۳۴}O_{۱۶}$ و وزن مولکولی آن ۶۱۴/۵۵ و نام علمی این ترکیب 2'-Hydroxybenzyl-3-methoxybenzoate-2',4-diglucoside می‌باشد (Fursenco *et al*., 2020).

از آنجایی که میزان مواد موثره گیاه متناسب با میزان رشد آن متغیر است لذا تعیین بهترین اندام و زمان برداشت به منظور دستیابی به میزان مطلوب متابولیت‌های ثانویه در راستای تامین گیاه مناسب برای صنایع دارویی از اهمیت به‌سزایی برخودار است و همچنین با در نظر گرفتن اهمیت این گیاه در صنعت داروسازی به دلیل داشتن ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی، این پژوهش جهت بررسی تغییر ترکیبات فیتوشیمیایی در مراحل رشدی و اندام های مختلف گیاه علف‌طلایی به اجرا درآمد.

پیشینه پژوهش

متابولیت‌های ثانویه گیاهان و فعالیت بیولوژیکی آن‌ها به عوامل ژنتیکی (Karray-Bouraoui *et al*., 2009)، شرایط اقلیمی (Sampaio *et al*., 2016) و مرحله فنولوژیکی (Esmaeili *et al*., 2018) وابسته است. تغییرات عوامل محیطی غیرزنده در دوره رشد گیاه بر مسیرهای متابولیسم متابولیت‌های ثانویه تأثیر می‌گذارد که ممکن است منجر به تفاوت در خواص دارویی و درمانی گیاه برداشت شده در مراحل مختلف فنولوژیکی شود (Sampaio *et al*., 2016). تأثیر مرحله فنولوژیکی بر ترکیبات فیتوشیمیایی در بومادران (*Achillea aucheri*)(Afshari & Rahimmalek, 2018)، مریم‌گلی مصری (*Salvia aegyptiaca*) (Farhat *et al*., 2015)، آفتابگردان مکزیکی (*Tithonia diversifolia*)(Pretti *et al*., 2018)، شبدر قرمز (*Trifolium pretense*) (Vlaisavljević *et al*., 2017)، رزماری (*Rosmarinus officinalis*)(Alipour & Saharkhiz, 2016) و شمعدانی عطری (*Pelargonium graveolens*)(Boukhris *et al*., 2015) گزارش شده است. پایش محتوای فیتوشیمیایی و کیفیت آن‌ها در مراحل رشد فنولوژیک می‌تواند الگوی تجمع این ترکیبات را نشان دهد. همچنین تعیین مرحله فنولوژی مناسب برای برداشت گیاه می‌تواند به دستیابی به بالاترین ترکیبات فیتوشیمیایی با کیفیت مطلوب برای صنایع دارویی یا غذایی کمک کند (Farhadi *et al*., 2020). مواد موثره در اندام‌های مختلف گیاه ثابت نیست و متناسب با مراحل رشد گیاه و شرایط متفاوت محیطی متغیر است (Asadi *et al*., 2020). مراحل فنولوژی و نوع اندام تاثیر معنی‌داری بر محتوای ترکیبات فنلی و فلانوئیدی گیاه برازمبل (*Provskia abrotanoides*) داشته و بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی متعلق به برگ گیاهانی بود که در مرحله رشد رویشی قرار داشتند (Ebrahimii, 2014). در پژوهش دیگر، تغییرات پلی‌فنل‌ها در بخش‌های مختلف کنگرفرنگی که از ماه نوامبر تا آوریل به صورت ماهانه برداشت شده بود مورد بررسی قرار گرفت و بر اهیمت زمان برداشت و

شرایط آب‌وهوایی در طول برداشت بر ترکیب شیمیایی اندام‌های مختلف کنگرفرنگی تاکید شد (Pandino *et al.*, 2013). همچنین محتوای کمی و کیفی پلی‌فنل در بخش‌های مختلف گیاه به زمان برداشت واکنش نشان داد و زمان مناسب برداشت غنچه‌ها از ماه فوریه تا آوریل عنوان شد.

روش شناسی پژوهش

مواد گیاهی

بذرهای اصلاح شده علف طلایی اروپایی رقم فسا اف‌تایپ (Phasa F type) از شرکت فارماست (Pharmasaat) آلمان تهیه شدند. کشت بذور در۲۵ بهمن ماه سال ۱۳۹۸ در سینی کشت جهت تولید نشاء در گلخانه پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی صورت گرفت. آبیاری در گلخانه به‌صورت بارانی و با کمک آبپاش انجام شد. جوانه‌زنی پس از ۱۴–۷ روز آغاز شد. انتقال نشاء پس از رسیدن به مرحله چهار برگی (فرودین ماه) و آماده‌سازی زمین اصلی صورت گرفت. محل اجرای آزمایش کلکسیون پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی با عرض جغرافیایی۳۵ درجه و ۴۸ دقیقه و طول جغرافیایی ۵۱ درجه و ۲۳ دقیقه و ارتفاع ۱۷۷۳ متر از سطح دریا بود. میانگین بیشترین و کمترین دمای سالانه به ترتیب ۲۰/۸ و ۱۰/۵ درجه سلسیوس و دارای میانگین بارش سالانه ۴۲۰/۵ میلی‌متر و بافت خاک لومی‌رسی بود (جدول ۱). به منظور بررسی تفاوت در اندام و اثر مراحل مختلف رشد بر کمیت عصاره علف طلایی اروپایی دو آزمایش جداگانه در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ تکرار (در چهار ردیف با فاصله ۵۰ سانتی‌متر بین ردیف و ۳۰ سانتی‌متر روی ردیف) به‌صورت مستقل طراحی گردید. در بخش اول پژوهش، اندام‌های مختلف گیاه شامل برگ روزت، برگِ ساقه و گل در مرحله گلدهی کامل برداشت شد. در بخش دوم پژوهش، در چهار دوره فنولوژی مختلف (مرحله قبل از گلدهی، مرحله ظهور آغازه‌های گل، مرحله گلدهی کامل و مرحله پس از گلدهی) از سرشاخه گلدار گیاه نمونه‌برداری انجام شد (شکل ۱). نمونه‌ها پس از برداشت به آزمایشگاه منتقل و در شرایط سایه و دمای اتاق خشک و جهت عصاره‌گیری آماده‌سازی‌های لازم صورت پذیرفت.

شکل ۱. مراحل فنولوژی مختلف گیاه علف طلایی اروپایی (A) قبل از گلدهی، (B) شروع گلدهی، (C) گلدهی کامل، (D) پس از گلدهی.

(منبع: یافته‌های تحقیق)

جدول ۱. موقعیت جغرافیایی، داده های اقلیمی و ویژگی های خاک مزرعه محل انجام آزمایش.

ارتفاع محل (m asl)	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	میانگین حداکثر دمای سالیانه C°	میانگین حداقل دمای سالیانه C°	میانگین دمای سالیانه C°	بارندگی سالیانه mm
۱۷۷۳	۵۱° ۲۳′	۳۵° ۴۸′	۲۰/۸	۱۰/۵	۱۵/۶	۴۲۰/۵

جدول ۱. (ادامه). موقعیت جغرافیایی، داده های اقلیمی و ویژگی های خاک مزرعه محل انجام آزمایش.

بافت خاک	هدایت الکتریکی (ds/m^{-1})	PH	نیتروژن کل (٪)	فسفر قابل دسترس ($mg.kg^{-1}$)	پتاسیم قابل دسترس ($mg.kg^{-1}$)
لومی–سیلتی	۲/۹۴	۷/۴	۰/۰۳۵	۵۹/۴	۳۳۴/۹

(منبع: یافته‌های تحقیق)

عصاره‌گیری

به منظور عصاره‌گیری و استخراج ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی، ۲۰۰ میلی‌گرم از نمونه‌های گیاهی خشک پودر شده و استفادهگردید. سپس ۱۰ میلی‌لیتر متانول به نمونه اضافه شده و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک[1] مدل الماسونیک – دی ۷۸۲۲۴ سینجن اچ تی دبلیو (SingenHtw Elmasonic- D 78224)، ساخت شرکت الما آلمان (Elma Germany) در دمای اتاق قرار گرفت. این مرحله چهار بار تکرار شد تا حداکثر میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی از ماده گیاهی جدا و در متانول حل شوند. پس از سونیکِیشِن[2] ، عصاره متانولی حاصل از چهار مرحله استخراج، جمع‌آوری شده و در دستگاه سانتریفیوژ یخچال‌دار مدل R۵۷۰۲ ساخت شرکت اپندورف (Eppendorf)، به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت. پس از سانتریفیوژ محلول بالایی به شیشه‌های تیره مخصوص عصاره منتقل شد و تا زمان تجزیه در یخچال در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد (Parsafar *et al.*, 2022).

سنجش محتوای فنل کل

برای سنجش محتوی فنل کل از دستگاه پاورویو اچ تی میکروپلیت اسپکتوفوتومتر[3] مدل ایکس اس ۲ ساخت شرکت بیوتک (BioTeks) آمریکا و سیستم پردازش اطلاعات کامپیوتری با نرم‌افزار جن دیتا آنالایزز (Gene data analysis) مورد استفاده قرار گرفت. محتوی کلی ترکیبات فنولی در عصاره گیاه بر اساس واکنش‌گر Folin Ciocalteus Reagent (FCR) تخمین زده شد. بر این اساس ۲۵ میکرولیتر از نمونه مورد آزمایش با ۱۲۵ میکرولیتر محلول رقیق شده FCR (۱ به ۱۰) مخلوط و به دنبال آن ۱۰۰ میکرولیتر از محلول ۷/۵ درصد کربنات سدیم (Na_2CO_3) به مخلوط اضافه شد. پلیت توسط فویل آلومینیومی پوشانده شد و جذب محلول‌ها پس از دو ساعت در طول موج ۷۶۰ nm توسط دستگاه قرائت‌گر الایزا خوانده شد و میزان ترکیبات فنل کل گیاه معادل گالیک‌اسید در گرم ماده خشک اندازه‌گیری شد (Kamtekar *et al.*, 2014; Salehi *et al.*, 2013).

سنجش محتوای فلاونوئید کل

در این پژوهش از واکنش‌گر کلرید آلومینیوم ($AlCl_3$) برای سنجش فلاونوئیدها استفاده شد. به همین منظور به ۲۵ میکرولیتر از نمونه مورد آزمایش به ترتیب ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر و ۷/۵ میکرولیتر از محلول ۵ درصد نیتریت سدیم ($NaNO_2$) اضافه شد. بعد از گذشت ۶ دقیقه انکوباسیون، ۷/۵ میکرولیتر آلومینیوم کلرید ۱۰ درصد و ۱۰۰ میکرولیتر سدیم هیدروکسید (NaOH) ۴درصد و ۱۰میکرولیتر آب مقطر به هر چاهک اضافه شد. پلیت توسط فویل آلومینیومی پوشانده شد و جذب محلول‌ها پس از ۱۵ دقیقه در طول موج ۵۱۰ نانومتر توسط دستگاه قرائت‌گر الایزا خوانده شد. میزان ترکیبات فلاونوئید کل گیاه معادل روتین در گرم ماده خشک اندازه‌گیری شد (Kamtekar *et al.*, 2014; Salehi *et al.*, 2013).

1. Ultrasonic
2. Sonication
3. Power Wave HT microplate Spectrophotometer

اندازه‌گیری محتوای ترکیب لئوکارپوزاید با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (High-performance liquid chromatography)

از سیستم HPLC ساخت شرکت Knauer (Germany) مجهز به دو پمپ (مدل Wellchron-K1001 –) و آشکارساز PDA (مدل K2800) برای جداسازی و اندازه‌گیری استفاده شد. ستون مورد استفاده ساخت شرکت Eurosphr و از نوع RP-C18 با قطر داخلی ۴/۶ میلی‌متر و طول ۲۵۰ میلی‌متر بود. از حلال‌های متانول و آب مخصوص HPLC به عنوان فاز متحرک استفاده شد. نمونه‌ها در طول موج جذب و نشر ۲۱۶ نانومتر ارزیابی شدند. استاندارد لئوکارپوزاید (Leiocarposide) از شرکت فیتولب آلمان تهیه گردید. به منظور رسم منحنی استاندارد لئوکارپوزاید غلظت‌های ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ قسمت در میلیون تهیه و به دستگاه تزریق گردید. از نرم‌افزار شرکت EZchorm که روی سیستم عامل ویندوز نصب شده بود برای انتگرال‌گیری و محاسبه سطح زیر منحنی استفاده گردید(Parsafar *et al.*, 2022). مساحت منحنی غلظت‌های استاندارد حساب شده و منحنی استاندارد با نرم افزار اکسل رسم گردید و سپس معادله خط y=bx+a به‌دست آمد (جدول ۲).

جدول۲. اطلاعات منحنی‌های کالیبراسیون استاندارد گالیک اسید، روتین و لئوکارپوزاید.

ترکیب	بازه (ppm)	معادله	R^2
گالیک اسید	۱۰–۲۰۰	y = 0.0073 x + 0.0185	۰/۹۹۷
روتین	۱۰–۲۰۰	y = 0.0014 x – 0.0071	۰/۹۹۸
لئوکارپوزاید	۱۰–۲۰۰	y = 102327 x +546018	۰/۹۹۸

(منبع: یافته‌های تحقیق)

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها (با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن) با استفاده از نرم‌افزار SAS ver.9.4 انجام شد. همچنین نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel رسم گردید.

یافته های پژوهش

محتوای ترکیبات فنل کل، فلانوئید کل و لئوکارپوزاید در اندام‌های مختلف

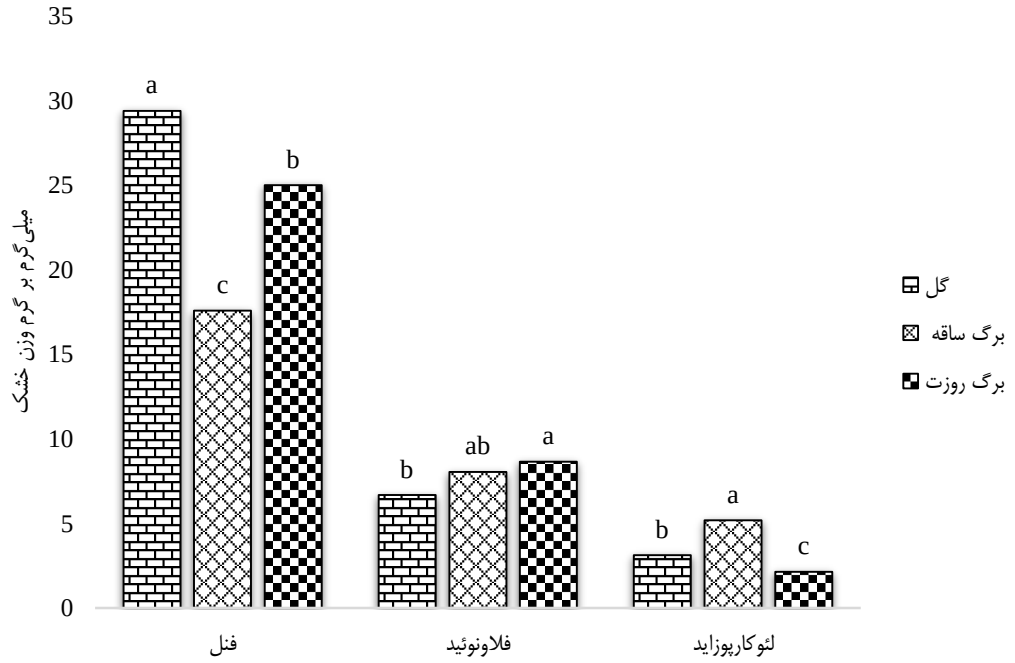
تجزیه واریانس اثر نوع اندام بر محتوای ترکیب فنلی، فلاونوئیدی و لئوکارپوزاید در رقم فسا اف تایپ گیاه علف طلایی اروپایی صورت گرفت (جدول ۳). نتایج حاصل نشان داد که در بین اندام‌های مختلف از نظر کلیه صفات مورد مطالعه در سطح یک درصد اختلاف معنی‌داری وجود داشت.

جدول ۳. نتایج تجزیه واریانس اندام های مختلف بر محتوای فنل کل، فلاونوئیدکل و لئوکارپوزاید علف طلایی اروپایی.

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		لئوکارپوزاید	فلاونوئید کل	فنل کل
بلوک	۲	۱/۶۵*	۱/۰۵*	۱۳/۷۶*
اندام‌های مختلف	۲	۷/۲۳**	۳/۰۴**	۱۰۶/۶۱**
خطای آزمایشی	۴	۰/۰۲۸	۰/۲۲	۱/۵۹
ضریب تغییرات (٪)	-	۴/۸	۶/۱	۵/۲

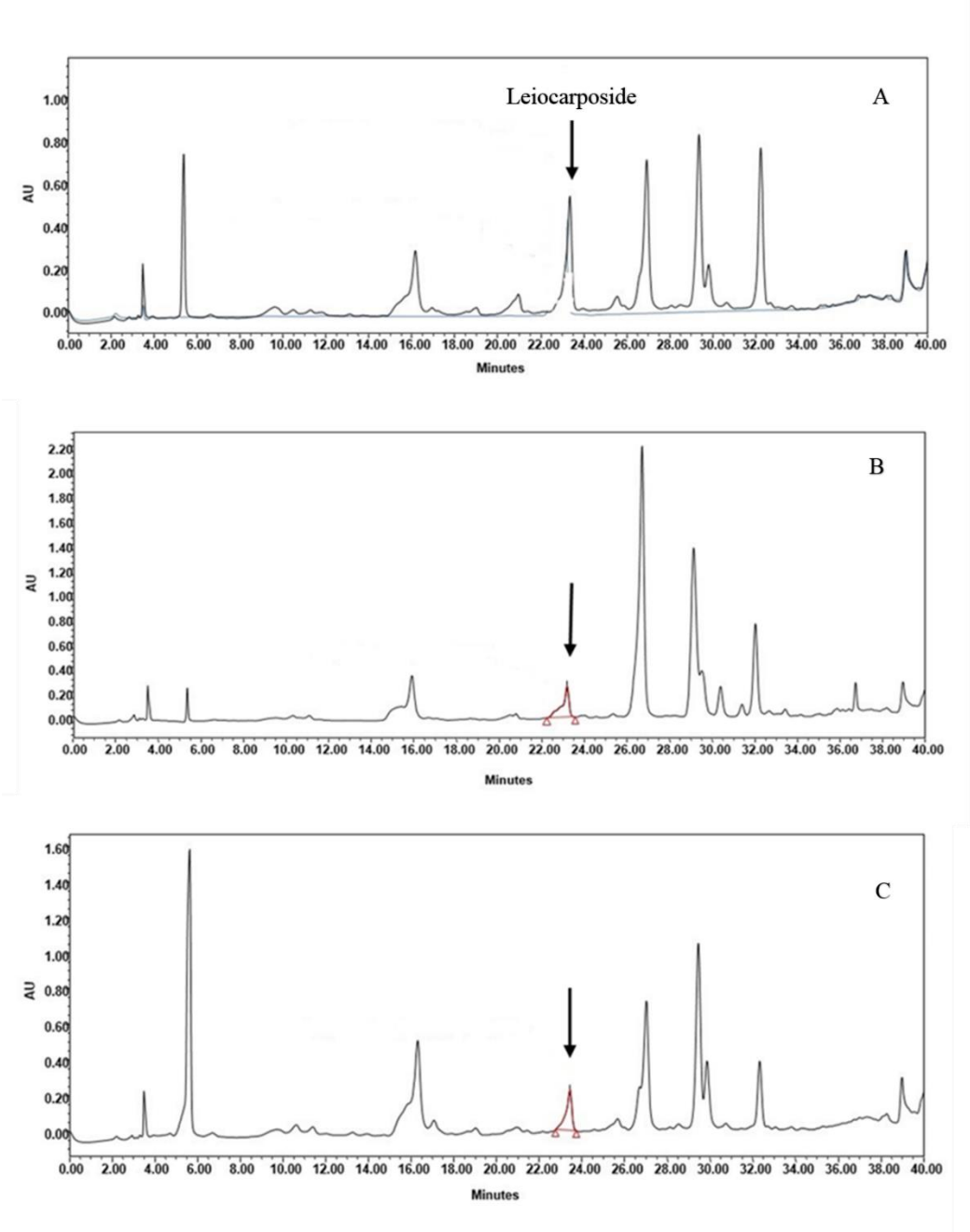
** و *: به ترتیب تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد. (منبع: یافته‌های تحقیق)

بیشترین میزان فنل به ترتیب در اندام‌های گل (۲۹/۳۶ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک)، برگ روزت (۲۴/۹۹ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک) و برگ ساقه (۱۷/۵۷ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک) مشاهده شد. بیشترین محتوای فلاونوئید به ترتیب در اندام برگ روزت (۸/۶۳ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک)، برگ ساقه (۸/۰۳ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک) و گل (۶/۶۷ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک) بوده است. همچنین بیشترین محتوای لئوکارپوزاید به ترتیب در برگ ساقه (۵/۱۷ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک)، گل (۳/۱۰ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک) و برگ روزت (۲/۱۳ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک) مشاهده گردید (شکل ۲ و ۳). از آنجائی‌که هر سه ترکیب مورد مطالعه از نظر اثرات دارویی حائز اهمیت می‌باشند، هر سه اندام (برگ روزت، برگ ساقه و گل) را می‌توان براساس نیاز در صنایع داروسازی و مواد غذایی به‌کار گرفت. چراکه هر کدام از ترکیبات در یک اندام خاص دارای حداکثر میزان هستند.



شکل ۲. مقایسه میانگین بین اندام های مختلف در محتوای فنل کل، فلاونوئید کل و لئوکارپوزاید علف طلایی اروپایی.

مقادیر ستون های با حداقل یک حرف مشابه فاقد اختلاف معنی دار هستند. (منبع: یافته‌های تحقیق)



شکل ۳. کروماتوگرام HPLC-UV اندازه‌گیری لئوکارپوزاید در اندام‌های گیاهی مختلف علف طلایی اروپایی در طول موج ۲۱۶ نانومتر، (A) برگ ساقه، (B) گل، (C) برگ روزت. (منبع: یافته‌های تحقیق)

محتوای ترکیبات فنل کل، فلانوئید کل و لئوکارپوزاید در مراحل فنولوژیکی مختلف

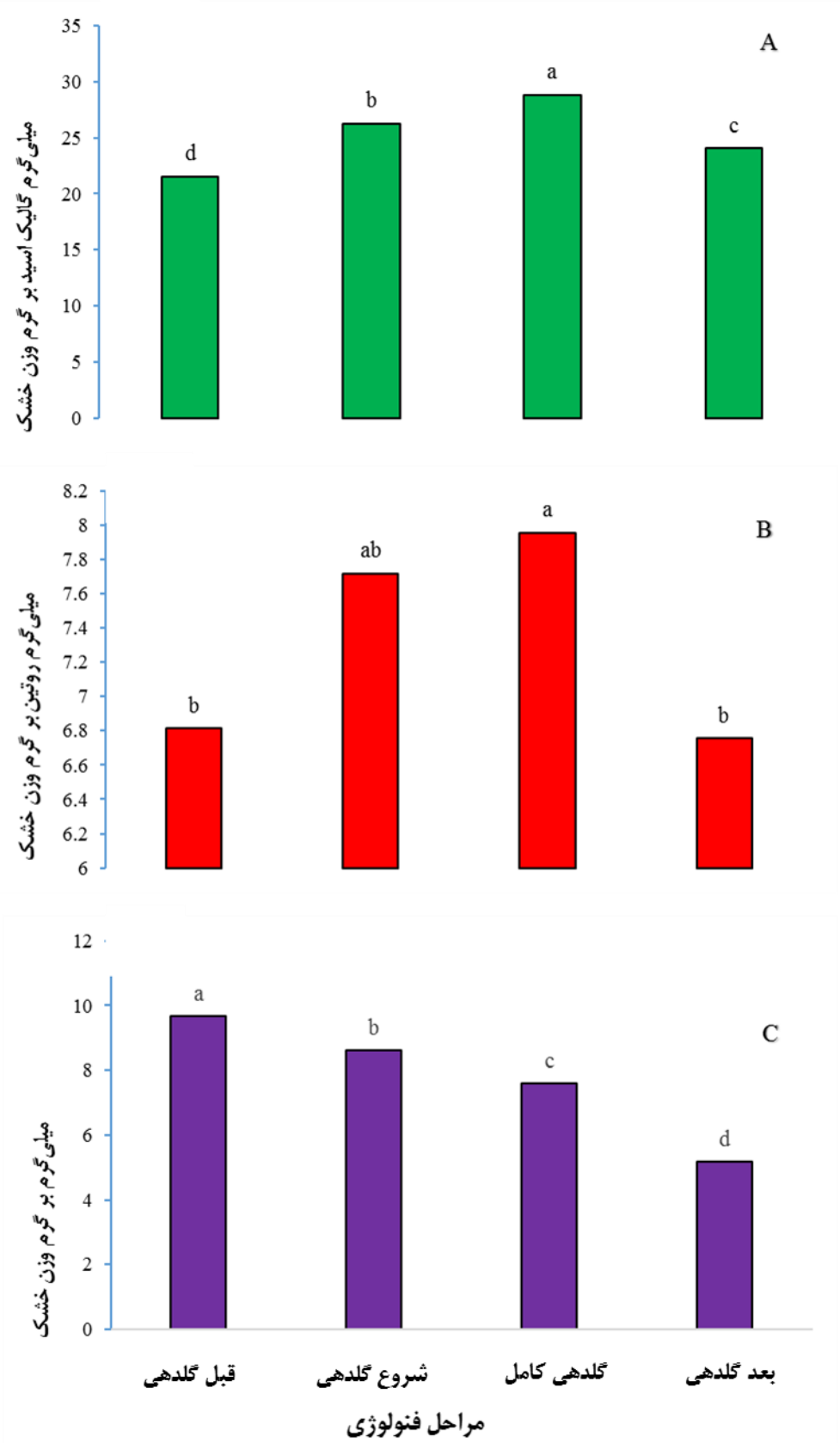
نتایج تجزیه واریانس بیانگر اختلاف معنی‌دار در مراحل فنولوژیکی قبل گلدهی، شروع گلدهی،گلدهی کامل، پس از گلدهی از لحاظ میزان متابولیت‌های ثانویه نظیر فنل کل، فلانوئید کل، لئوکارپوزاید در سطح احتمال یک درصد بود (جدول ۴).

جدول ۴. نتایج تجزیه واریانس اثر مراحل فنولوژی مختلف بر محتوای فنل کل، فلاونوئید کل و لئوکارپوزاید علف طلایی اروپایی.

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		لئوکارپوزاید	فلاونوئید کل	فنل کل
بلوک	۲	۱/۹۳*	۰/۸۱*	۳/۴۵*
مرحله فنولوژی	۳	۱۱/۰۸**	۱/۱۴*	۲۹/۰۰**
خطای آزمایشی	۶	۰/۰۳۸	۰/۱۳	۰/۵۶
ضریب تغییرات (٪)	–	۲/۵۴	۵/۰۲	۲/۹۷

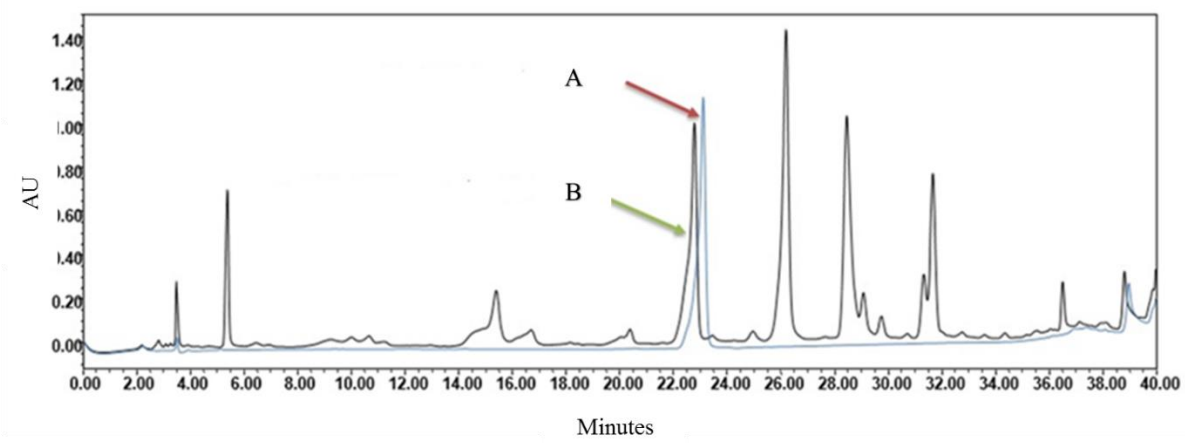
** و * : به ترتیب نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد. (منبع: یافته‌های تحقیق)

نتایج مقایسه میانگین محتوای ترکیبات فنل کل، فلاونوئید کل و لئوکارپوزاید در مراحل مختلف رشدی گیاه علف طلایی اروپایی در شکل ۴ ارائه شده است. بیشترین محتوای فنل به ترتیب در مرحله گلدهی کامل (۲۸/۸۴ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک)، شروع گلدهی (۲۶/۲۹ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک)، پس از گلدهی (۲۴/۰۷ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک) و قبل از گلدهی (۲۱/۵۵ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک) مشاهده شد. بیشترین محتوای فلاونوئید به ترتیب در مراحل گلدهی کامل (۷/۹۵ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک)، شروع گلدهی (۷/۷۱ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک)، قبل از گلدهی (۶/۸۱ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک) و پس از گلدهی (۶/۷۵ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک) بوده است. همچنین بیشترین محتوای لئوکارپوزاید به ترتیب در مرحله قبل از گلدهی (۹/۶۵ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک)، شروع گلدهی (۸/۶ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک)، گلدهی کامل (۷/۶ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک) و پس از گلدهی (۵/۱۶ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک) مشاهده شد (شکل ۵). براساس نتایج می‌توان بهترین زمان برداشت سرشاخه‌گلدار جهت دستیابی به بالاترین میزان فنل و فلاونوئید کل را در مرحله گلدهی کامل و بالاترین میزان لئوکارپوزاید را در مرحله شروع گلدهی عنوان کرد.



شکل ۴. مقایسه میانگین اثر مراحل فنولوژی مختلف بر (A) محتوای فنل کل، (B) فلاونوئید کل و (C) لئوکارپوزاید علف طلایی اروپایی.

مقادیر ستون های با حداقل یک حرف مشابه فاقد اختلاف معنی دار هستند. (منبع: یافته‌های تحقیق)



شکل۵. کروماتوگرام HPLC-UV اندازه‌گیری لئوکارپوزاید در طول موج ۲۱۶ نانومتر، (A) استاندار ۲۰۰ پی‌پی‌ام، (B) محتوی لئوکارپوزاید در مرحله گلدهی کامل علف طلایی اروپایی. (منبع: یافته‌های تحقیق)

بحث

یکی از عوامل تاثیرگذار بر متابولیت‌های ثانویه در گیاهان، نوع اندام گیاهی است. به‌طوری‌که میزان متابولیت‌های ثانویه در اندام‌های مختلف با یکدیگر متفاوت است. در پژوهش حاضر بررسی اندام‌های مختلف نشان داد در هر سه اندام گیاهی (برگ روزت، برگ ساقه و گل) اختلاف در میزان ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و لئوکارپوزاید معنی‌دار شد. در بررسی Falleh *et al.* (۲۰۰۸) در گیاه کنگر (*Cynara caduncul*us L.) میزان فنل و فلاونوئید در اندام برگ و بذر یکسان اما دو برابر اندام گل بود. همچنین در پژوهشی که روی میزان فنل و فلاونوئید اندام‌های مختلف (برگ، ریشه، ساقه، گل و میوه) گیاه شابیزک انجام گرفت، بیشترین میزان فنل در برگ‌های گیاه و کمترین آن در ساقه گیاه مشاهده شد (Khatir nameni & Mazandarani, 2011). در بررسی فیتوشیمیایی گیاه باریجه نیز بیشترین میزان فنل کل در ریشه و کمترین میزان آن در برگ گیاه مشاهده شد (Zeinali *et al*., 2014).

عوامل متعددی می‌تواند کمیت و کیفیت متابولیت‌های ثانویه بدست آمده از گیاهان را تحت تاثیر قرار دهد، از جمله این موارد می‌توان به مراحل فنولوژیکی اشاره کرد (Feduraev *et al*., 2019). ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی از مهم‌ترین متابولیت‌های ثانویه گیاهی با خواص بیولوژیکی متنوع هستند. تحقیقات قبلی نشان داده است که مراحل رشدی بر مقدار ترکیبات‌های فنلی و فلاونوئیدی در اندام‌های گیاهان تاثیرگذار است (Riberio *et al*., 2019). در این مطالعه نیز میزان ترکیب‌های فنلی و فلاونوئیدی در مراحل مختلف فنولوژی متفاوت بود.

در پژوهشی که بر روی میزان فنل و فلاونوئید در مراحل مختلف رشد (شروع رشد رویشی، بعد از رشد رویشی، جوانه‌زدن، گلدهی کامل) گیاه مرزنجوش انجام گرفت، مشخص شد، کمترین میزان فنل در مرحله شروع رشد رویشی (۲/۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) و بیشترین در مرحله بعد از رشد رویشی (۶/۸۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) بود. در مرحله شروع رشد رویشی محتوای فنل بر فلاونوئید غالب بوده درحالیکه فلاونوئید در سایر مراحل بر میزان فنل غالب بوده است (Sellami *et al*., 2009). Verma & Kasera (2007) نشان دادند که بیشترین محتوای فنولیک اسید در گیاه *Boerhavia diffusa* و *Sida cordifolia* در مرحله گلدهی کامل مشاهده شد که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. تاثیر مراحل فنولوژیکی بر ترکیبات فیتوشیمیایی به ویژه ترکیبات فنلی در سایر گونه‌های گیاهی از قبیل *Trifolium pretense* (Vlaisavljević *et al*., 2017)،

Salvia aegyptiaca (Farhat *et al.*, 2015)، *Tithonia diversifolia* (Pretti *et al.*, 2018) نیز گزارش شده است. افزایش محتوای فنل و فلاونوئید در مرحله گلدهی کامل می تواند با نقش زیست محیطی مانند افزایش دفاع علیه قارچ، عوامل بیماریزا و جذب حشرات گرده‌افشان مرتبط باشد (Vlaisavljević *et al.*, 2017) که به نظر می‌رسد این تغییرات به واسطه تغییر در مسیر بیوسنتز و تخصیص ترکیبات فنلی در مراحل رویشی و زایشی رخ می‌دهد (Pretti *et al.*, 2018). علاوه بر مرحله فنولوژیکی، عوامل متعددی مانند سن گیاه، پیش تیمار گیاهان و روش استخراج نیز بر محتویات ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی مؤثر هستند (Vlaisavljević *et al.*, 2017). همچنین دما به عنوان یک عامل محیطی مهم بر مراحل رشد گیاهان و تولید متابولیت های ثانویه تأثیر می‌گذارد. در چندین مطالعه یک همبستگی مثبت بین کاهش دما و محتوای بالای ترکیب فنلی گزارش شده است (Albert *et al.*, 2009; Sampaio *et al.*, 2011).

نتیجه‌گیری

نتایج حاصله نشان داد که مرحله فنولوژی گیاه بر انتخاب بهترین زمان برداشت تاثیر می‌گذارد. نوع اندام مورد استفاده و مراحل مختلف رشد می‌تواند تاثیر شگرفی بر میزان متابولیت‌های ثانویه داشته باشد. محتوی فنل، فلاونوئید و لئوکارپوزاید در اندام‌ها و مراحل رشدی مختلف، متفاوت است. بنابراین این طور استنباط می‌شود که مواد مؤثره گیاه هیچگاه ثابت نیست و کاملاً وابسته به فاکتورهای محیطی و خاکی، نوع اندام، تنوع ژنتیکی و فنولوژی گیاه است. براساس نتایج می‌توان بهترین زمان برداشت جهت دستیابی به بالاترین میزان فنل و فلاونوئید کل را در مرحله گلدهی کامل و بالاترین میزان لئوکارپوزاید را در مرحله شروع گلدهی عنوان کرد. بنابراین با توجه به نیاز صنایع دارویی باید اندام و مرحله رشدی را در شرایط اقلیمی تهران تعیین نمود.

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه شهید بهشتی انجام شده است که نویسندگان مقاله، کمال تشکر و قدردانی را ابراز می‌نمایند.

منابع

ابراهیمی، رضا (۱۳۹۲). ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و عصاره همه قسمت های گیاه *Provskia abrotanoides* در مراحل رشدی مختلف و ارزیابی خواص آنتی‌اکسیدانی قوی‌ترین اسانس و عصاره سلول‌های زنده. *پایان نامه کارشناسی ارشد*. مشهد: دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی.

مظفریان، ولی‌الله (۱۳۹۱). *شناسایی گیاهان دارویی و معطر ایران*. چاپ اول، تهران: انتشارات فرهنگ معاصر.

پارسافر، سپیده؛ اقلیما، قاسم؛ میرجلیلی، محمد حسین؛ نژاد ابراهیمی، صمد و هادیان، جواد (۱۴۰۰). بررسی ویژگی‌های مورفولوژیکی، عملکردی و فیتوشیمیایی *Solidago virga-urea* L. *فصلنامه تحقیقات گیاهان دارویی و معطر*، ۳۷ (۶)، ۱۰۴۰-۱۰۵۴.

REFERENCES

Afshari, M., & Rahimmalek, M. (2018). Variation in essential oil composition, bioactive compounds, anatomical and antioxidant activity of *Achillea aucheri*, an endemic species of Iran, at different phenological stages. *Chemistry & Biodiversity*, 15, 11-23.

Albert, A., Sareedenchai, V., Heller, W., Seidlitz, H.K., & Zidorn, C. (2009). Temperature is the key to altitudinal variation of phenolics in *Arnica montana* L. Cv. ARBO. *Oecologia*, 160, 1–8.

Alipour, M., & Saharkhiz, M.J. (2016). Phytotoxic activity and variation in essential oil content and composition of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) during different phenological growth stages. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 7, 271–278.
Asadi, M., Nejad Ebrahimi, S., Hatami, M., & Hadian, J. (2020). Changes in secondary metabolite contents of *Arnica chamissonis* Less. in response to different harvest time, flower developmental stages and drying methods. *Journal of Medicinal Plants*, 19 (76), 69-88.

Boukhris, M., Hadrich, F., Chtourou, H., Dhouib, A., Bouaziz, M., & Sayadi, S. (2015). Chemical composition, biological activities and DNA damage protective effect of *Pelargonium graveolens* L'Hér. Essential oils at different phenological stages. *Industrial Crops & Products*, 74, 600–606.
Ebrahimi, R. (2014). *Evaluation of antioxidant activity of essential oil and extract of all parts of the plant of provskia Provskia abrotanoides at different stages of development and evaluation of the antioxidant properties of the strongest essential oil and extract of living cells*. MSc Thesis, Ferdowsi University of Mashhad. (In Persian).
Esmaeili, H., Karami, A., & Maggi, F. (2018). Essential oil composition, total phenolic and flavonoids contents, and antioxidant activity of *Oliveria decumbens* Vent. (Apiaceae) at different phenological stages *Journal of Cleaner Production*, 198, 91-95.
Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M. & Abdelly, C. (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331(5), 372-379.
Farhadi, N., Babaei, KH., Farsaraei, S., Moghaddam, M., & Ghasemi Pirbalouti, A. (2020). Changes in essential oil compositions, total phenol, flavonoids and antioxidant capacity of *Achillea millefolium* at different growth stages. *Industrial Crops & Products*, 152, 112570.
Farhat, M., Jordán, M.J., Chaouch-Hamada, R., & Landoulsi, J.A. (2015). Changes in phenolic profiling and antioxidant capacity of *Salvia aegyptiaca* L. by products during three phenological stages. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 63, 791-797.
Feduraev, P., Chupakhina, G., Maslennikov, P., Tacenko, N., & Skrypnik, L. (2019). Variation in phenolic compounds content and antioxidant activity of different plant organs from *Rumex crispus* L. and *Rumex obtusifolius* L. at different growth stages. *Antioxidants*, 8(7), 237.

Fursenco, C., Calalb, T., Uncu, L., Dinu, M., & Ancuceanu R. (2020). *Solidago virgaurea* L.: A Review of its ethnomedicinal uses, phytochemistry, and pharmacological activities. *Biomolecules*, 10, 1619.

Kamtekar, S., Keer, V., & Patil, V. (2014). Estimation of phenolic content, favonoid content, antioxidant and alpha amylase inhibitory activity of marketed polyherbal Formulation. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 4 (9), 61-65.
Karray-Bouraoui, N., Rabhi, M., Neffati, M., Baldan, B., Ranieri, A., Marzouk, B., Lachaâl, M., & Smaoui, A. (2009). Salt effect on yield and composition of shoot essential oil and trichome morphology and density on leaves of *Mentha pulegium*. *Industrial Crops & Products*, 30, 338–343.
Khatir nameni, M., & Mazandarani, M. (2011). Total flavonoids and phenolic different organs of medicinal plant deadly nightshade (*Atropa belladonna* L.) in the jungle province Tvskstan. *National Conference on Medicinal Plants*, 2, 2-7.
Mozafarian, V. (2012). *Identification of medicinal and aromatic plants of Iran*. Tehran, Iran: Farhang Moaser Press. (In Persian).
Parsafar, S., Eghlima, GH., Mirjalili, M.H., Nejad Ebrahimi, S., & Hadian, J. (2022). Study on morphological, yield, and phytochemical characteristics of *Solidago virgaurea* L. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 37(6), 1039-1053. (In Persian).

Pretti, I.R., Luz, A.C., Jamal, C.M., & Batitucci, M.C.P. (2018). Variation of biochemical and antioxidant activity with respect to the phenological stage of *Tithonia diversifolia* Hemsl. (Asteraceae) populations. *Industrial Crops & Products*. 121, 241–249.

Ribeiro, D.A., de Macêdo, D.G., Boligon, A.A., Menezes, I.R.A., de Almeida Souza, M.M., & da Costa, J.G.M. (2019). Influence of seasonality on the phenolic composition of *Secondatia floribunda* A.DC (Apocynaceae) during its phenological cycle. *Acta Physiologiae Plantarum*, 41(12), 1-16.

Sakaguchi, S., Kimura, T., Kyan, R., Maki, M., Nishino, T., Ishikawa, N., Nagano, A.J., Honjo, M.N., Yasugi, M., Kudoh, H., Li, P., Choi, H.J., Chernyagina, O.A., & Ito, M. (2018). Phylogeographic analysis of the East Asian goldenrod (*Solidago virgaurea* complex, Asteraceae) reveals hidden ecological diversification with recurrent formation of ecotypes. *Annals of Botany*, 121, 489–500.

Salehi, P., Asghari, B., Esmaeili, M. A., Dehghan, H., & Ghazi, I. (2013). α-Glucosidase and α-amylase inhibitory effect and antioxidant activity of ten plant extracts traditionally used in Iran for diabetes. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(6), 257-266.

Sampaio, B.L., Edrada-Ebel, R., & Da Costa, F.B. (2016). Effect of the environment on the secondary metabolic profile of *Tithonia diversifolia*: a model for environmental metabolomics of plants. *Scientific Reports*, 6, 1–11.

Sellami, I.H., Maamouri, E., Chahed, T., Wannes, W.A., Kchouk, M.E., & Marzouk, B. (2009). Effect of growth stage on the content and composition of the essential oil and phenolic fraction of sweet marjoram (*Origanum majorana* L.). *Industrial Crops and Products*, 30(3), 395-402.

Semple, J.C., Ma, Y., Tong, L., & Sorour, M. (2020) A multivariate morphometric analysis of *Solidago* sect. *Solidago* and *S. sect. Multiradiatae* (Asteraceae: Astereae). *Phytoneuron*, 38, 1–59.

Verma, V., & Kasera, P.K. (2007). Variations in secondary metabolites in some arid zone medicinal plants in relation to season and plant growth. *Indian Journal of Plant Physiology*, 12(2), 203-206.

Vlaisavljević, S., Kaurinović, B., Popović, M., & Vasiljević, S. (2017). Profile of phenolic compounds in *Trifolium pratense* L. extracts at different growth stages and their biological activities. *International Journal of Food Properties*, 20 (12), 3090–3101.

Yaneva, Z.L., Simeonov, E.B., & and Ivanova, D.G. (2020). In vitro ultraviolet-B radiation mediated antioxidant response of Bulgarian goldenrod (*Solidago virgaurea* L.) extract. *Bulgarian Chemical Communications*, 52, 33-40.

Zeinali, Z., Hemmati, Kh., & Mazandarani, M. (2014). Autecology, ethnopharmacology, phytochemistry and antioxidant activity of *Ferula gummosa* Boiss. in different regions of Razavi Khorasan province. *Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants*, 1, 11-22. (In Persian)