Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 53, No 4, Winter 2023 (989-1001)
DOI: 10.22059/ijhs.2022.343749.2037

علوم باغبانی ایران
دورهٔ ۵۳، شمارهٔ ۴، زمستان ۱۴۰۱ (ص ۱۰۰۱-۹۸۹)

نشریه پژوهشی:

بررسی فیتوشیمیایی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی فرآورده‌های جانبی اسانس‌گیری ریزوم هیبریدهای زنبق آلمانی (*Iris germanica* L.)

قادر قاسمی[۱]، مهدی عیاری[۲*]، محمدحسین عظیمی[۳] و محمدتقی عبادی[۴]
۱، ۲ و ٤. دانشجوی دکتری، استادیار و دانشیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳. استادیار، پژوهشکده ملی گل و گیاهان زینتی، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج، محلات، ایران
(تاریخ دریافت: ۱٤۰۱/۳/۲۱ – تاریخ پذیرش: ۱٤۰۱/۵/٦)

چکیده

گونه‌های گیاه ایریس (Iris) به عنوان منبع غنی از ایزوفلاونوئیدها شناخته می‌شوند. زنبق آلمانی (*Iris germanica* L.) یکی از مهم‌ترین انواع زنبق‌های ریش‌دار است، که در طب سنتی با نام ایرسا شناخته می‌شود. در این پژوهش، میزان کل ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی پساب به دست آمده در طول فرآیند اسانس‌گیری ۳٤ نمونه ریزوم زنبق آلمانی (٦ نمونه والد، ۲۷ نمونه هیبرید و ۱ نمونه تجاری) اندازه‌گیری شد. نمونه‌های زنبق آلمانی از پژوهشکده ملی گل و گیاهان زینتی واقع در شهر محلات جمع‌آوری و نمونه تجاری از بازار خریداری شدند. بعد از استخراج اسانس از پساب در بالن، نمونه برداری شد. میزان فنل کل نمونه‌ها به روش فولین‌سیکالتیو، فلاونوئید به روش آلومینیوم کلرید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH و FRAP) اندازه‌گیری شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که همه صفات اندازه‌گیری شده، تحت تاثیر نوع هیبرید بود که این تاثیر در تمامی صفات معنی‌دار بود (P<۰/۰۱). نتایج مقایسه میانگین نشان داد که نمونه‌های با رنگ گل‌های ارغوانی و بنفش بیشترین میزان فنل و فلاونوئید کل را داشته و به دنبال آن بالاترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی را دارند. به عبارت دیگر، بیشترین میزان فلاونوئید (۱۱۳/۲۲ میلی‌گرم معادل کوئرستین در گرم وزن خشک) و فعالیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH) (۸۱۷/۷۳ میلی‌گرم معادل TBHQ در گرم وزن خشک) در نمونه P6 (والد ارغوانی) و بیشترین میزان فنل کل (۲٦۱/۳۱ میلی‌گرم معادل اسیدگالیک در گرم وزن خشک) در نمونه P3 (والد بنفش) مشاهده شد. در کل، پساب حاصل از اسانس گیاه زنبق آلمانی، بعنوان منبعی مناسب و ارزان جهت به دست آوردن آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان طبیعی، پساب، ایرسا، فیتوشیمیایی، محصول جانبی

Phytochemical evaluation and antioxidant activity of essential oil byproducts of German iris hybrids and parents (*Iris germanica* L.)

Ghader Ghasemi[1], Mahdi Ayyari[2*], Mohammad-Hossein Azimi[3] and Mohammad-Taghi Ebadi[4]
1, 2, 4. Ph.D. Candidate, Assistant Professor and Associate Professor, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University (TUM), Tehran, Iran
3. Assistant Professor, National Institute of Ornamental Plants (NIOP), Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mahallat, I.R. Iran
(Received: Jun. 11, 2022- Accepted: Jul. 28, 2022)

ABSTRACT

Iris species are known to be a rich source of isoflavonoids. *Iris germanica* L. is one of the most important species of bearded irises which is known as Irsa in traditional medicine. In this study, the amount of phenolic compounds and antioxidant activity of the waste obtained during the essential oil extraction process of 34 samples of German iris rhizomes (6 parent samples, 27 hybrid samples and 1 commercial sample) were evaluated. Iris samples were collected from the Ornamental Plants Research Center (OPRC) in Mahallat city and commercial sample were purchased from the market. After extracting the EO, samplings were carried out using the extract in balloon. The phenol content was measured by Folin-Ciocalteu method, flavonoid by Aluminum-chloride method and antioxidant activity with DPPH and FRAP assay. The results of variance analysis showed that all measured factors were affected by the type of hybrid, which was significant in all factors (P<0.01). The results of mean comparison showed that samples with purple and violet flower colors had the highest amount of phenol and flavonoid, followed by the highest level of antioxidant activity. In other words, the highest amount of flavonoid (113.22 mg QUE/g DW plant) and antioxidant activity (DPPH) (817.73 mg TBHQ/gDW plant) was observed in sample P6 (purple parent) and the highest amount of phenol content (261.31 mg GAE/g DW plant) was observed in sample P3 (violet parent). In general, the water residues from the *Iris* EO extraction can be used as a suitable and cheap source for obtaining natural antioxidants.

Keywords: By-product, *Iris*, Phytochemical, Natural antioxidant, Waste.

* Corresponding author E-mail: m.ayyari@modares.ac.ir

مقدمه

امروزه، گیاهان می‌توانند بهترین منبع برای بدست آوردن انواع مختلف از داروها باشند (Borneo *et al*., 2009). در عصر حاضر استفاده از متابولیت‌های ثانویه گیاهی جهت درمان بازه وسیعی از بیماری‌ها ، روز به روز در حال افزایش است؛ به طوری‌که در بسیاری از کشورها ۳۵ درصد داروها منشاء گیاهی دارند (Kordi-Tamandani *et al*., 2014). خاصیت آنتی‌اکسیدانی یکی از مهم‌ترین فعالیت‌های بیولوژیکی گیاهان به ویژه گیاهان دارویی می‌باشد (Dawidowicz *et al*., 2006; Mishra *et al*., 2008). فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان عموما ناشی از فعالیت ۴ دسته از ترکیبات مهم از جمله پلی‌فنل‌های فلاونوئیدی، پلی‌فنل‌های غیرفلاونوئیدی، اسیدهای فنلی (دی‌ترپن‌های فنلی) و ترکیبات آلی گوگرددار است (Mohadjerani, 2012; Nouri *et al*., 2016). از این ۴ دسته آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی موجود در گیاهان پلی فنل‌های فلانوئیدی بزرگترین و مهم‌ترین آن‌هاست. ایزوفلاونوئیدها یک زیر طبقه بزرگ و متمایز از فلاونوئیدها را تشکیل می‌دهند. گونه‌های زنبق (*Iris* spp.) به عنوان منبع غنی از ایزوفلاونوئیدها شناخته می‌شوند. زنبق یکی از گل‌های شاخه بریده مهم جهان و ایران به‌شمار می‌آید. زنبق آلمانی (*Iris germanica* L.) یکی از مهمترین انواع زنبق‌های ریش‌دار است که صدها واریته باارزش از آن در دنیا گسترش یافته و به‌عنوان یک گیاه چند ساله زینتی کشت می‌شود (Kohlein, 1987; Jéhan *et al*., 1994; Rahman *et al*., 2003a; Choudhary *et al*., 2005). رنگ گل‌ها نامحدود بوده از بنفش تا سفید، آبی کم‌رنگ، نارنجی و یا مخلوطی از همه رنگ‌ها را می‌توان مشاهده کرد. برگ‌ها در زنبق بلند بوده و ساقه‌های گل‌دهنده (گل‌آذین) از میان آنها خارج می‌شوند. داشتن ساقه‌های زیرزمینی غده مانند مهم‌ترین خصوصیت خانواده زنبقیان است (Azimi *et al*., 2018). ریزوم‌های زنبق آلمانی در طب سنتی برای درمان برخی اختلالات دستگاه عصبی و ضد التهابی با کاربردهای دارویی شناخته می‌شود. یکی از گونه‌های اصلی برای کاربردهای دارویی گونه *Iris germanica* L. می‌باشد (Nasim *et al*., 2003; Wollenweber *et al*., 2003).

امروزه یکی از روش‌های فرآوری گیاهان دارویی استخراج اسانس و عرق و استفاده از آن‌ها است. این فرآوری که به روش تقطیر با آب انجام می‌گیرد در اکثر مواقع پساب حاصل از آن دور ریخته می‌شود. در صنعت اسانس‌گیری و عرقیات گیاهی، مواد گیاهی تقطیرشده به همراه آب به‌عنوان محصول جانبی (by-product) این صنعت قلمداد می‌شوند .این محصول فرعی که حجم بسیار بالایی دارد به‌صورت فاضلاب و پسماند دور ریخته می‌شود . در پسماندها، ترکیبات غیرفرّار و محلول در آب که شامل انواع ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی می‌باشند باقی می‌مانند. اخیراً آنها به عنوان مواد اولیه امیدوارکننده برای توسعه محصولات جدید در بخش‌هایی مانند صنایع دارویی، آرایشی، غذایی و آفت‌کش‌ها مورد بهره‌برداری قرار گرفته‌اند (Trivellini *et al*., 2016). به ویژه، علاقه فزاینده‌ای در صنایع غذایی برای جایگزینی آنتی‌اکسیدان‌ها و افزودنی‌های مصنوعی با ترکیباتی از منابع طبیعی یا محصولات گیاهی وجود دارد. یکی از موثرترین رویکردها، استفاده از پساب حاصل از تقطیر گیاهان معطر به عنوان جایگزینی مقرون به صرفه و ارزشمند برای افزودنی‌های مصنوعی است. Solimine *et al*. (2016)، مقادیر بالای ترکیبات فلاونوئیدی و اثرات ضدآنزیم تیروزیناز را در پسماند گلاب گزارش دادند. در مطالعه دیگری نشان داده شد که پسماند ناشی از تقطیر رزماری ، حاوی مقادیر بالای اسیدرزماریک با خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالا می‌باشد (Wollinger *et al*., 2016). Celano *et al*. (2017) نیز پسماند ناشی از تقطیر گیاهان رزماری (*Rosmarinus officinalis* L.)، ریحان (*Ocimum basilicum* L.) و مریم گلی (*Salvia officinalis* L.) را به‌عنوان منابع غنی از ترکیبات فنلی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالا معرفی کردند و آنها را به‌عنوان مواد افزودنی در مواد غذایی، آرایشی و بهداشتی پیشنهاد دادند.

متأسفانه در کشورهای در حال توسعه به موضوع استفاده از پسماندهای حاصل از فرآوری گیاهان دارویی توجهی نمی‌شود که این امر می‌تواند منجر به آلودگی‌های فراوان محیط زیست شود. بنابراین با اتخاذ رویکردهای هدفمند در به‌کارگیری مناسب ترکیبات زائد می‌توان آنها را مدیریت نمود. این مسأله برای یک کارخانه فراوری ترکیبات گیاهان دارویی و معطر مانند

کارخانجات تهیه‌کننده عرقیات گیاهی دارای ارزش افزوده زیادی می‌باشد (Farzadkia *et al*., 2015; Celano *et al*., 2017). تاکنون در ایران مطالعه‌ای در زمینه فعالیت آنتی‌اکسیدانی پسماندهای اسانس‌گیری به روش تقطیر ریزوم‌های زنبق آلمانی انجام نشده است و احتمال دارد ترکیبات مؤثر و فعالیت‌های بالقوه آنتی‌اکسیدانی در آنها وجود داشته باشد؛ لذا، هدف از انجام این تحقیق، بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات فیتوشیمیایی از جمله فنل کل، فلاونوئید کل، تانن و کارتنوئید پساب ریزوم هیبریدهای زنبق آلمانی بود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی

در این مرحله ۳۴ نمونه ریزوم زنبق آلمانی کاشته شده در پژوهشکده ملی گل و گیاهان زینتی واقع در شهر محلات (۶ نمونه والد، ۲۷ نمونه هیبرید تولیدشده از ۶ والد برداشتی) و ۱ نمونه تجاری خریداری شده از بازار مورد بررسی قرار گرفت. ریزوم‌ها پس از جمع‌آوری به آزمایشگاه گروه علوم باغبانی دانشگاه تربیت مدرس منتقل شدند (جدول ۱). نمونه‌برداری در دوره رکود یعنی اواخر دی ماه انجام شد و بلافاصله پس از قطعه قطعه شدن در دمای اتاق (۲۵ درجه سیلسیوس) و سایه جهت انجام مطالعات فیتوشیمیایی خشک شدند.

جمع‌آوری پساب

ریزوم‌های خشک شده در هاون چینی پودر شده و با استفاده از دستگاه کلونجر اسانس‌گیری شدند. پس از ۳ ساعت اسانس‌گیری از پساب داخل بالن به مقدار لازم جهت انجام آزمایشات برداشت و در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

جدول ۱. اطلاعات والدین و هیبریدهای زنبق آلمانی (*Iris germanica* L.) مطالعه شده.

Table 1. The information of studied German iris (*Iris germanica* L.) hybrids and parents.

No	Code	Code in OPRC	Type	Name
1	H1	OPRC 3	Hybrid	*Iris germanica*
2	H2	OPRC 6	Hybrid	*Iris germanica*
3	H3	OPRC 7	Hybrid	*Iris germanica*
4	H4	OPRC 11	Hybrid	*Iris germanica*
5	H5	OPRC 13	Hybrid	*Iris germanica*
6	H6	OPRC 15	Hybrid	*Iris germanica*
7	H7	OPRC 17	Hybrid	*Iris germanica*
8	H8	OPRC 19	Hybrid	*Iris germanica*
9	H9	OPRC 23	Hybrid	*Iris germanica*
10	H10	OPRC 27	Hybrid	*Iris germanica*
11	H11	OPRC 28	Hybrid	*Iris germanica*
12	H12	OPRC 31	Hybrid	*Iris germanica*
13	H13	OPRC 32	Hybrid	*Iris germanica*
14	H14	OPRC 34	Hybrid	*Iris germanica*
15	H15	OPRC 35	Hybrid	*Iris germanica*
16	H16	OPRC 42	Hybrid	*Iris germanica*
17	H17	OPRC 45	Hybrid	*Iris germanica*
18	H18	OPRC 46	Hybrid	*Iris germanica*
19	H19	OPRC 47	Hybrid	*Iris germanica*
20	H20	OPRC 52	Hybrid	*Iris germanica*
21	H21	OPRC 55	Hybrid	*Iris germanica*
22	H22	OPRC 56	Hybrid	*Iris germanica*
23	H23	OPRC 61	Hybrid	*Iris germanica*
24	H24	OPRC 62	Hybrid	*Iris germanica*
25	H25	OPRC 70	Hybrid	*Iris germanica*
26	H26	OPRC 75	Hybrid	*Iris germanica*
27	H27	OPRC 76	Hybrid	*Iris germanica*
28	P1	P 1	parent	*Iris germanica* white
29	P2	P 2	parent	*Iris germanica* yellow
30	P3	P 3	parent	*Iris germanica* violet
31	P4	P 4	parent	*Iris germanica* blue
32	P5	P 5	parent	*Iris germanica* purple
33	P6	P 6	parent	*Iris germanica* brown
34	C	ns	Commercial	ns

ns stand for not specified. ns مخفف not specified می‌باشد.

اندازه‌گیری محتوای فنل‌کل (TPC)

اندازه‌گیری مواد فنلی با استفاده از معرف فولین سیوکالتیو (Folin-Ciocalteu) صورت گرفت. ۵۰ میکرولیتر پساب از محلول استخراج‌شده اصلی برداشته شد، سپس ۱۸۰ میکرولیتر آب دی‌یونیزه اضافه شد. در مرحله بعد ۱۲۰۰ میکرولیتر فولین (۱۰ درصد) به مخلوط افزوده و بعد از ۵ دقیقه به آن کربنات‌سدیم ۷/۵ درصد اضافه شد. پس از آن نمونه‌ها به مدت ۴۵-۳۰ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق قرار داده شدند. در نهایت جذب در طول موج ۷۶۰ نانومتر به وسیله اسپکتروفتومتر (NanoDrop, Model: epoch) قرائت شد. آب دی‌یونیزه به عنوان شاهد و اسیدگالیک به عنوان استاندارد مورد استفاده قرار گرفت. منحنی استاندارد بر اساس اسیدگالیک، ترسیم و نتایج به صورت میلی‌گرم معادل اسیدگالیک بر گرم وزن خشک گیاه گزارش شد (Ebrahimzadeh *et al*., 2008).

اندازه‌گیری محتوای فلاونوئید کل (TFC)

برای سنجش میزان محتوای فلاونوئید کل به مقدار مشخصی از هر پساب، ۱۵۰ میکرولیتر نیتریت‌سدیم، ۳۰۰ میکرولیتر محلول آلومینیوم‌کلراید (۱۰ درصد)، ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول استات‌سود ۱ مولار اضافه گردید و بعد با آب مقطر به حجم ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. جذب مخلوط در طول موج ۳۸۰ نانومتر نسبت به شاهد قرائت گردید. برای رسم منحنی استاندارد از کوئرستین استفاده شد. میزان فلاونوئید کل پساب بر اساس میلی‌گرم معادل کوئرستین بر گرم وزن خشک گیاه گزارش شد (Chang *et al*., 2002).

کلروفیل و کارتنوئید کل

برای سنجش میزان کاروتنوئید، محلول صاف شده با متانول خالص (ایرانی ۹۹ درصد) به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد و به مدت ۱۰ دقیقه و در ۲۶۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. فاز رویی جداسازی و جذب محلول در طول موج‌های ۶۶۶، ۶۵۳ و ۴۷۰ نانومتر نسبت به شاهد اندازه‌گیری شد. از متانول به عنوان شاهد استفاده شد. میزان کاروتنوئید و کلروفیل a و b برای هر پساب با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه گردید (Lichtenthaler, 1987):

$$C_a = 15.65\ A_{666} - 7.340\ A_{653} \quad (۱)$$

$$C_b = 27.05\ A_{653} - 11.21\ A_{666} \quad (۲)$$

$$C_t = 1000\ A_{470} - 2.86\ C_a - 129.2\ C_b/245 \quad (۳)$$

اندازه‌گیری تانن

میزان تانن با استفاده از روش فولین سیوکالتیو تعیین شد. برای اندازه‌گیری محتوای تانن‌ها، ۱۰۰ میکرولیتر از پساب به ۷۵۰ میکرولیتر آب مقطر، ۵۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالتیو و ۱۰۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۳۵ درصد (Na_2CO_3) اضافه شد. مخلوط پس از رقیق شدن در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر به شدت تکان داده شد. مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرارداده شد سپس در طول موج ۷۲۵ نانومتر با استفاده از نانودراپ قرائت شد. آب مقطر به‌عنوان کنترل استفاده شد. از اسیدتانیک به‌عنوان استاندارد استفاده گردید. محتوای تانن کل به صورت TA/g ماده خشک بیان شد که با استفاده از منحنی استاندارد تهیه شده با صفر تا ۱۰۰ میلی گرم بر TA محاسبه شد (Tamilselvi *et al*., 2012).

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH

برای اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH، مقدار مشخصی از پساب متانولی را در یک لوله آزمایشی ریخته و به آن ۲۰۰۰ میکرولیتر از محلول DPPH (۶×۱۰^{-۵} مول بر لیتر ۹۵ درصد رادیکال‌های آزاد) اضافه شد. محلول حاصل تکان داده شد و در دمای آزمایشگاه به مدت۳۰ دقیقه نگهداری گردید سپس جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر در اسپکتروفتومتر (NanoDrop, Model: epoch) قرائت شد. جهت تهیه شاهد (بلنک) نیز به روش بالا عمل شد با این تفاوت که به جای پساب از ۵۰ میکرولیتر اتانول ۸۰ درصد استفاده شد (Nakajima *et al*., 2004). منحنی استاندارد بر اساس Tert-butylhydroquinone (TBHQ)، ترسیم و نتایج به صورت میلی‌گرم معادل TBHQ بر گرم وزن خشک گیاه گزارش شد (Ebrahimzadeh *et al*., 2008).

$$DPPHsc\ \% = \frac{(\text{Abs control})_{t=30\ min} - (\text{Abs sample})_{t=30\ min}}{(\text{Abs control})_{t=30\ min}} \times 100 \quad (۴)$$

میزان جذب شاهد: Abs control

میزان جذب نمونه: Abs sample

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش FRAP

پساب نمونه‌ها و ۳ میلی‌لیتر معرف تازه FRAP (بافر استات‌سدیم ۳۰۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۳/۶، فریک-تری پریدیل-اس-تریازین و فریک کلرید) باهم مخلوط شدند. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم (دمای ۳۷ درجه سیلسیوس) قرار گرفت و جذب آن در طول‌موج ۵۹۳ نانومتر و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (NanoDrop, Model: epoch) نسبت به شاهد خوانده شد. از سولفات‌آهن برای رسم منحنی استاندارد استفاده گردید و نتایج داده‌ها براساس mmol Fe^{++}/g DW بیان شد (Zugic *et al*., 2014).

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های به دست آمده با سه تکرار و به‌صورت طرح کاملا تصادفی با استفاده از نرم افزار SAS 9.1 آنالیز شدند. از آزمون LSD برای مقایسه میانگین داده‌ها استفاده شد. همچنین برای رسم نمودارها و همبستگی از نرم‌افزار Excel استفاده گردید.

نتایج و بحث

محتوای فنل کل

نتایج تجزیه واریانس داده‌های محتوای فنل کل نشان داد که میزان فنل کل در نمونه‌های مورد بررسی زنبق آلمانی اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد داشتند (جدول ۲)، نتایج مقایسه میانگین همین داده‌ها نشان دادند که بازه این شاخص از ۱۴۳/۴۲ تا ۲۶۱/۳۱ میلی‌گرم معادل اسیدگالیک در گرم وزن خشک متغیر بوده است. بالاترین میزان فنل کل مربوط به P3 (والد بنفش) و کمترین آن نیز مربوط به P6 (والد ارغوانی) می‌باشد (شکل ۱). به عبارت دیگر، والد بنفش نسبت به والد ارغوانی ۴۵/۱۱ درصد میزان فنل کل بیشتری دارد. محتوای فنل و فلاونوئید کل پارامترهای مرتبط با فعالیت آنتی‌اکسیدانی هستند (Tohidi *et al*., 2017). ترکیبات فنلی به عنوان فراوان‌ترین آنتی‌اکسیدان‌ها در رژیم غذایی انسان در نظر گرفته می‌شوند که دارای چندین فعالیت بیولوژیک مهم هستند (Mocan *et al*., 2018). این ترکیبات علاوه بر متاثر بودن از شرایط محیطی، تحت تاثیر عوامل ژنتیکی هستند. در پژوهش حاضر نیز وجود اختلاف بالا میزان فنل کل در بین هیبریدها و والدین موید این موضوع است. میزان بالای فنل کل در ریزوم زنبق آلمانی (Basgedik *et al*., 2014) و سایر گونه‌های زنبق نیز گزارش شده است (Hacibekiroğlu & Kolak, 2015; Mocan *et al*., 2018) که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد. در این پژوهش مشخص گردید پساب ریزوم گیاه زنبق آلمانی به عنوان محصول جانبی (۲۶۱/۳۱ میلی‌گرم معادل اسیدگالیک در گرم وزن خشک) در مقایسه با عصاره متانولی سایر محصولات به عنوان محصول اصلی ۲۷/۱۸ میلی‌گرم اسیدگالیک بر گرم وزن خشک (Zhang *et al*., 2018)، ۲۲۶/۳ میلی‌گرم اسیدگالیک بر گرم وزن خشک (Phuyal *et al*., 2020)، ۶۶/۶۲ میلی‌گرم اسیدگالیک بر گرم وزن خشک (Ghasemi *et al*., 2019)، ۶۹/۱۲-۲۱/۱۹ میلی‌گرم اسیدگالیک بر گرم وزن خشک (Alirezalu *et al*., 2020) و ۷۶/۶۰-۲۵/۵۹ میلی‌گرم اسیدگالیک بر گرم وزن خشک (Koczka *et al*., 2018) میزان فنل کل بالایی دارد و این نشان‌دهنده اهمیت پساب این گیاه می‌باشد.

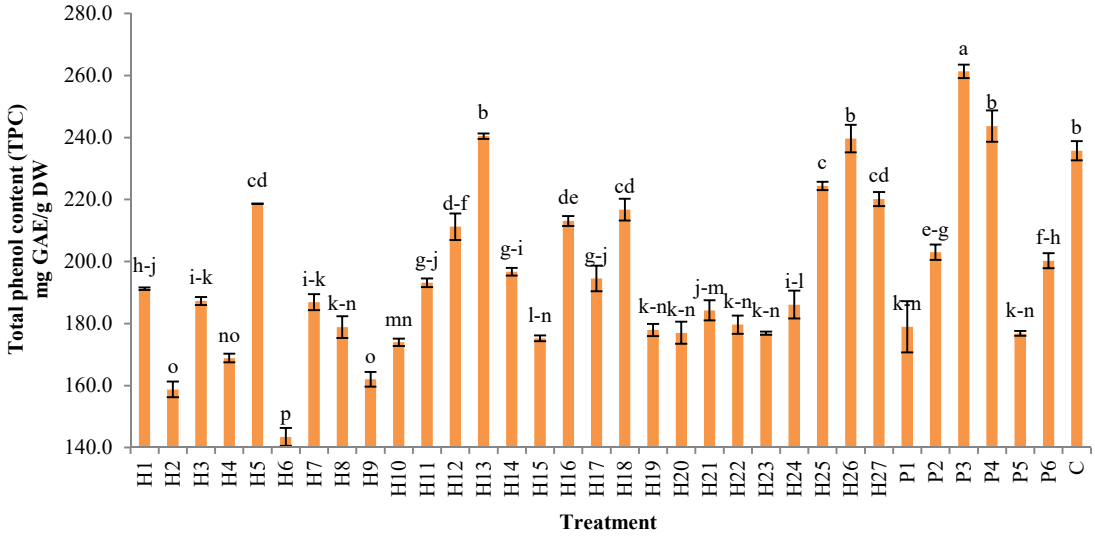
جدول ۲. تجزیه واریانس خصوصیات فیتوشیمیایی والدین و هیبریدهای زنبق آلمانی (*Iris germanica* L.) مطالعه شده.

Table 2. Variance analysis of phytochemical characteristics in studied German iris hybrids and parents (*Iris germanica* L.).

Source of variation	df	Mean of squares					
		Total phenolic content	Total flavonoid content	Total tannin content	Total carotenoid content	Antioxidant activity (DPPH)	Antioxidant activity (FRAP)
Treatments	33	2233.72**	1.01**	1050.41**	82354.97**	29960.84**	12.25**
Error	68	26.711	0.005	1.669	981.162	994.807	0.319
Total	101						
CV (%)		2.631	2.998	2.674	7.707	5.815	4.024

**: Significantly difference at the 1% probability level.

** تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.



شکل ۱. مقایسه میانگین محتوای فنل کل والدین و هیبریدهای زنبق آلمانی (*Iris germanica* L.).

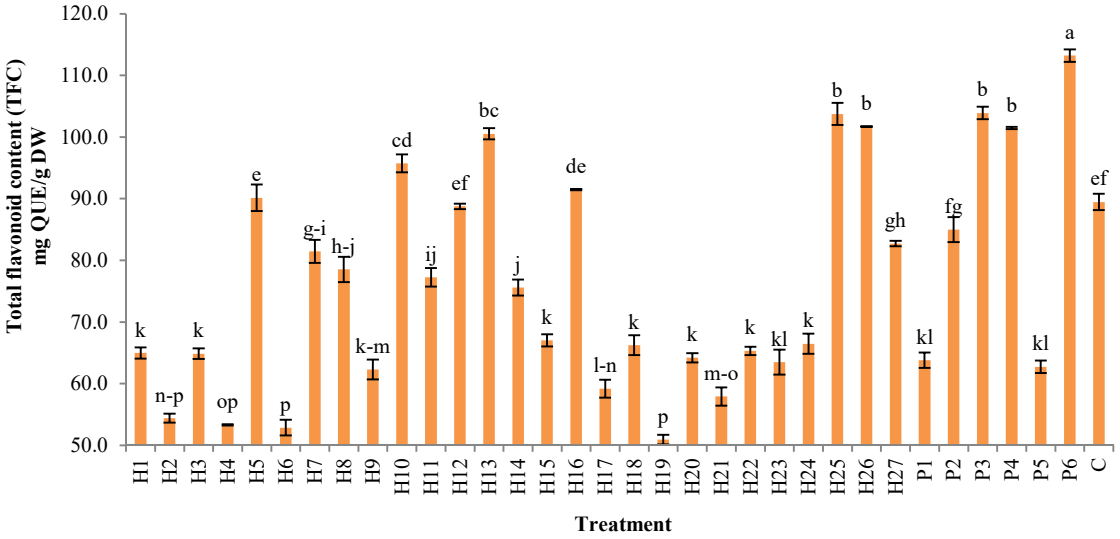
Figure 1. Mean comparison of total phenol content of German iris hybrids and parents (*Iris germanica* L.).

محتوای فلاونوئید کل

نتایج این تحقیق نشان داد که محتوای فلاونوئید کل تحت تاثیر نوع هیبرید بود. تجزیه واریانس برای صفت مورد بررسی حاکی از وجود تفاوت معنی‌داری در بین نمونه‌های مورد مطالعه در سطح احتمال ۱ درصد می‌باشد (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بیشترین محتوای فلاونوئید کل (۱۱۳/۲۲ میلی‌گرم معادل کوئرستین در گرم وزن خشک) مربوط به P6 (والد ارغوانی) و کمترین مقدار آن (۵۰/۹۲ میلی‌گرم معادل کوئرستین در گرم وزن خشک) مربوط به H19 (هیبرید ۱۹) است (شکل ۲). از بین اسیدفنولیک‌ها که گروه بزرگی از متابولیت‌های ثانویه هستند، فلاونوئیدها دارای بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشند (Martins *et al*., 2011; Fattahi *et al*., 2013). در مطالعات قبلی فیتوشیمیایی صورت گرفته بر روی زنبق آلمانی ترکیبات مختلفی از جمله، فلاونوئیدها (Asghar *et al*., 2010; Ibrahim *et al*., 2012; Mohamed *et al*., 2013) گزارش شده است. این ترکیبات، حاوی گروه‌های هیدروکسیلی هستند که عامل غیرفعال کردن رادیکال‌های آزاد در گیاهان به شمار می‌آیند. مکانیسم عمل فلاونوئیدها از طریق فرایند کلاته کردن و یا غیرفعال کردن رادیکال‌های آزاد است (Pourmorad *et al*., 2006). Ullah *et al*. (2015) در مطالعه خود نشان دادند که زنبق آلمانی واریته فیورنتینا دارای میزان بالایی فلاونوئید (۱۰۰/۲۷ میلی‌گرم معادل روتین در گرم) است که نتایج ما با این مطالعه مطابقت دارد. در پژوهش حاضر نشان داده شد که میزان محتوای فلاونوئید کل پساب زنبق آلمانی نمونه P6 (والد ارغوانی) نسبت به ولیک (*Crataegus meyeri*) ۱۸/۶۲ برابر (Alirezalu *et al*., 2020)، درمنه (*Artemisia sieberi*) ۲/۰۶ برابر (Ghasemi *et al*., 2019) و میوه *Meistera chinensis* ۱۴/۱۱ برابر (Tee *et al*., 2021) بیشتر است بنابراین می‌توان پساب این گیاه را به عنوان یک منبع طبیعی و قوی از فلاونوئید معرفی کرد.

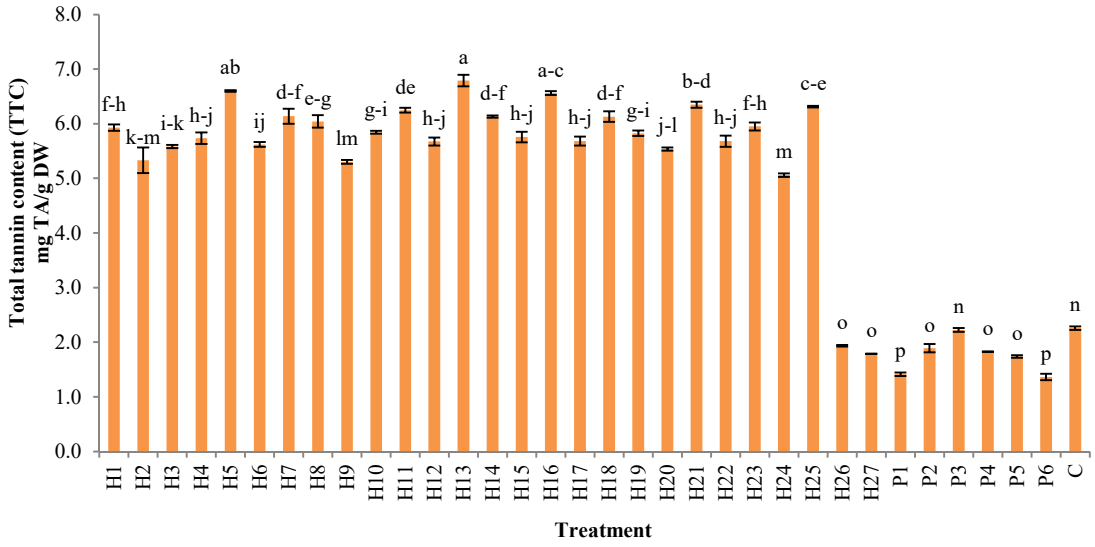
محتوای تانن کل (TTC)

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که در بین هیبریدها، والدها و نمونه تجاری زنبق آلمانی از نظر محتوای تانن کل تفاوت بسیار زیادی وجود دارد که این تفاوت از لحاظ آماری در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار است (جدول ۲). تفاوت میزان تانن کل در نمونه H13 (هیبرید ۱۳) که بیشترین میزان تانن (۶/۷۹ میلی‌گرم معادل اسیدتانیک در گرم وزن خشک) را دارد نسبت به P6 (والد ارغوانی) که دارای کمترین میزان تانن کل (۱/۳۶ میلی‌گرم معادل اسیدتانیک در گرم وزن خشک) می‌باشد نزدیک به ۵ برابر است (شکل ۳). تانن‌ها ترکیبات پلی‌فنلی هستند که به طور طبیعی در گیاهان یافت می‌شوند.



شکل ۲. مقایسه میانگین محتوای فلاونوئید کل والدین و هیبریدهای زنبق آلمانی (*Iris germanica* L.).

Figure 1. Mean comparision of total flavonoid content of German iris hybrids and parents (*Iris germanica* L.).



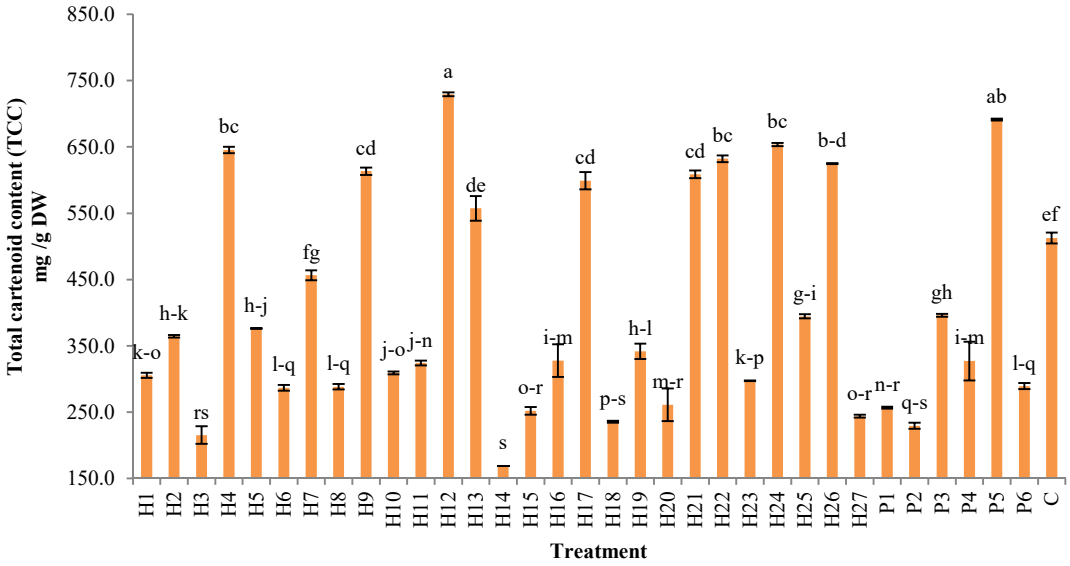
شکل ۳. مقایسه میانگین محتوای تانن کل والدین و هیبریدهای زنبق آلمانی (*Iris germanica* L.).

Figure 1. Mean comparison of total tannin content of German iris hybrids and parents (*Iris germanica* L.).

تنوع گیاهانی که تانن در آنها یافت شده است بسیار زیاد است. آن‌ها نقش‌های اکولوژیکی مهمی دارند (Fraga-Corral *et al.*, 2020). تانن‌ها جزء گروه ترکیبات محلول در آب هستند که باعث محافظت در برابر طیف گسترده‌ای از عوامل استرس‌زا می‌گردند. تانن‌ها همچنین دارای چندین اثر دارویی، از جمله آنتی‌اکسیدانی و جلوگیری از فعالیت‌های رادیکال آزاد می‌باشند (Golmohamadi *et al.*, 2020) که میزان این فعالیت بیولوژیکی تانن‌ها با وزن مولکولی و تعداد گروه‌های هیدروکسیلی در ساختار خود بستگی دارد (Fraga-Corral *et al.*, 2020).

محتوای کارتنوئید کل (TCC)

نتایج تجزیه واریانس داده‌های محتوای کارتنوئید کل نشان داد که میزان این شاخص در بین نمونه‌های مورد بررسی زنبق آلمانی از نظر آماری دارای اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد بود (جدول ۲).



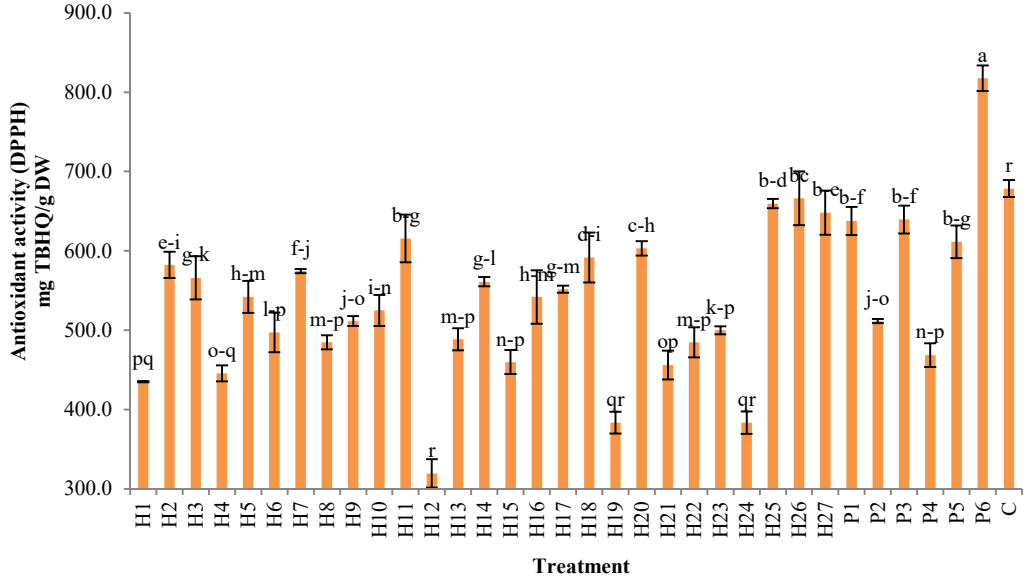
شکل ۴. مقایسه میانگین محتوای کارتنوئید کل والدین و هیبریدهای زنبق آلمانی (*Iris germanica* L.).

Figure 1. Mean comparision of total carotenoid content of German iris hybrids and parents (*Iris germanica* L.).

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بیشترین میزان کارتنوئید کل مربوط به هیبرید شماره ۱۲ (H12) و کمترین آن نیز مربوط به هیبرید شماره ۱۴ (H14) می‌باشد که میزان آنها به ترتیب ۷۲۸/۲۷ و ۱۶۹/۵۶ میلی‌گرم در گرم وزن خشک می‌باشد (شکل ۴). گیاهان برای مقابله با تنش‌های محیطی از سیستم‌های دفاعی از جمله ترکیبات کارتنوئیدی استفاده می‌کنند (Rossa *et al*., 2002). این ترکیبات دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بوده و قدرت آنتی‌اکسیدانی گیاه با میزان کارتنوئید آن رابطه مستقیم دارد (Hassan Sultan *et al*., 2016).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH

در پژوهش حاضر فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های زنبق آلمانی به روش DPPH مورد بررسی قرار گرفت که نتایج این تحقیق نشان داد که میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی تحت تاثیر نوع هیبرید بوده که در بین آنها این اختلاف به بیش از ۲/۵ برابر رسیده است. تجزیه واریانس برای صفت مورد بررسی حاکی از وجود اختلاف معنی‌داری در بین هیبریدهای مورد مطالعه در سطح احتمال ۱ درصد می‌باشد (جدول ۲). میانگین هیبریدها از لحاظ فعالیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH) نشان داد که بیشترین میزان آن (۸۱۷/۷۳ میلی‌گرم معادل TBHQ در گرم وزن خشک) مربوط به P6 (والد ارغوانی) و کمترین مقدار آن (۳۱۹/۳۴ میلی‌گرم معادل TBHQ در گرم وزن خشک) مربوط به H12 (هیبرید ۱۲) است (شکل ۵). با توجه به مزایای بالقوه سلامتی، تحقیقات فشرده‌ای در مورد آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مشتق شده از گیاهان انجام شده است. به تازگی زنبق آلمانی به دلیل داشتن ترکیبات آهن‌دار به ویژه در گیاهانی با رنگ گل بنفش یا ارغوانی مورد توجه قرار گرفته است (Nadaroğlu *et al*., 2007) نتایج مطالعه حاضر نشان داد که زنبق آلمانی با رنگ گل ارغوانی دارای بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی و موید این امر است. سطح بالای فعالیت آنتی‌اکسیدانی را می‌توان به وجود ترکیبات فنلی مختلف نسبت داد (Basgedik *et al*., 2014). در راستا، ترکیبات فلاونوئیدی بیشترین میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی را در بین ترکیبات ثانویه دارند (Martins *et al*., 2011; Fattahi *et al*., 2013). در پژوهش حاضر نیز نمونه P6 (والد ارغوانی) که دارای بیشترین میزان محتوای فلاونوئید کل بوده، بالاترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی را ایجاد کرده است. نتایج ما نشان داد که زنبق آلمانی یک منبع قوی آنتی‌اکسیدان طبیعی است که وجود محتوای فلاونوئید کل بالا نسبت به سایر گیاهان و مطالعه Nadaroğlu *et al*. (2007) موید این موضوع است.



شکل ۵. مقایسه میانگین فعالیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH) والدین و هیبریدهای زنبق آلمانی (*Iris germanica* L.).

Figure 1. Mean comparision of antioxidant activity (DPPH) of German iris hybrids and parents (*Iris germanica* L.).

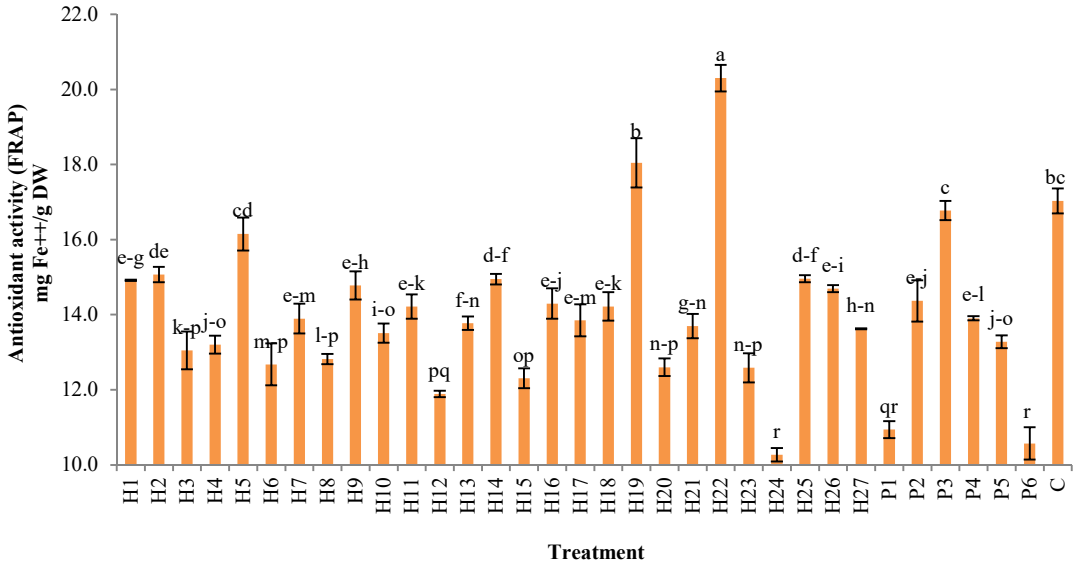
فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش FRAP

احیای آهن (FRAP) روش دیگری از فعالیت آنتی‌اکسیدانی است که در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تجزیه واریانس این روش وجود اختلاف معنی‌دار در بین نمونه‌ها را در سطح احتمال ۱ درصد نشان داد (جدول ۲). میانگین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در این روش بین ۲۰/۳۰ میلی‌گرم آهن فرو در گرم وزن خشک در H22 (هیبرید ۲۲) تا ۱۰/۲۷ میلی‌گرم آهن فرو در گرم وزن خشک در H24 (هیبرید ۲۴) متغیر بود (شکل ۶). در این روش توانایی پساب برای احیاء آهن سه ظرفیتی و تبدیل آن به آهن دو ظرفیتی سنجیده می‌شود. حضور عوامل احیاکننده (آنتی‌اکسیدان‌ها) منجر به احیای کمپلکس‌های فری‌سیانید و تبدیل آن‌ها به فرم فروس می‌گردد که در تحقیق حاضر هیبرید شماره ۲۲ بیشترین میزان توانایی احیاء را داشت.

همبستگی پیرسون بین خصوصیات فیتوشیمیایی

ضرایب همبستگی بین صفات فیتوشیمیایی اندازه‌گیری شده در شکل ۷ نشان داده شده است. نتایج حاصل از تجزیه همبستگی ساده بین صفات نشان داد که برخی صفات اندازه‌گیری شده همبستگی مثبت یا منفی معنی‌داری با هم دارند. از صفات مهمی که همبستگی آنها در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شده است می‌توان به همبستگی مثبت بین میزان محتوای فنل کل و فلاونوئید کل اشاره کرد. به عبارت دیگر، ترکیبات فلاونوئیدی گروه بزرگی از ترکیبات فنلی هستند که با افزایش میزان فلاونوئید، میزان فنل کل هم افزایش می‌یابد. در سایر مطالعات هم همبستگی معنی‌دار مثبت بین محتوای فنل و فلاونوئید کل در سطح احتمال یک درصد گزارش شده است (Ghasemi *et al*., 2019) که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. از دیگر شاخص‌هایی که همبستگی معنی‌داری (P<۰/۰۵) بین آن‌ها وجود دارد می‌توان به محتوای فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH) اشاره کرد. در بین متابولیت‌های ثانویه، ترکیبات فلاونوئیدی از جمله ترکیباتی هستند که خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی دارند (Martins *et al*., 2011; Fattahi *et al*., 2013) و این نشان دهنده آن است که هرچه میزان فلاونوئید کل بالاتر باشد میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتر خواهد شد. همبستگی یک صفت با صفت دیگر امکان اندازه‌گیری غیرمستقیم آن صفت را فراهم می‌سازد. لذا در مواقعی که اندازه‌گیری یک صفت مشکل، پیچیده، زمان بر و پرهزینه است، می‌توان از صفات دیگری که دارای

همبستگی معنی‌دار بالایی هستند، برای اندازه‌گیری آن صفت استفاده کرد. در این پژوهش، همبستگی مثبت و معنی‌داری بین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH) با میزان ترکیبات فلاونوئیدی و میزان ترکیبات فنلی با محتوای فلاونوئیدکل هیبریدهای زنبق آلمانی وجود داشت که با نتایج گزارش شده در کیوی (Du *et al*., 2009)، کُنار (Koley *et al*., 2016) عناب (Gao *et al*., 2011)، توت فرنگی (Capocasa *et al*., 2008)، زغال اخته و تمشک (Hashempour *et al*., 2011) مطابقت دارد.



شکل ۴. مقایسه میانگین فعالیت آنتی‌اکسیدانی (FRAP) والدین و هیبریدهای زنبق آلمانی (*Iris germanica* L.).

Figure 1. Mean comparison of antioxidant activity (FRAP) of German iris hybrids and parents (*Iris germanica* L.).

	FRAP	DPPH	TPC	TFC	Tannin	Carotenoid
FRAP	1.000					
DPPH	-0.01322	1.000				
TPC	0.23579	0.29194	1.000			
TFC	0.00526	0.42141	0.77174	1.000		
Tannin	0.11521	-0.50324	-0.33989	-0.33476	1.000	
Carotenoid	0.10207	-0.27647	0.04780	-0.05784	0.01780	1.000
ns	0.05	0.01	1.000	0.01	0.05	ns
-						+

شکل ۷. همبستگی پیرسون بین خصوصیات فیتوشیمیایی والدین و هیبریدهای زنبق آلمانی (*Iris germanica* L.).

Figure 7. Pearson correlation between phytochemical properties of German iris hybrids and parents (*Iris germanica* L.).

نتیجه‌گیری کلی

به طور کلی نتایج نشان داد که والد و هیبریدهای مختلف زنبق آلمانی دارای تنوع بسیار وسیعی از نظر خصوصیات مورد مطالعه از جمله ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارند. این نتایج گویای این است که هیبریدهای مختلف زنبق آلمانی در مقایسه با نمونه تجاری موجودر بازار ایران دارای منابع غنی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی بوده و می‌توانند در داروسازی و طب سنتی مورد استفاده قرار گیرند. در بین نمونه‌های مورد مطالعه، هیبریدهای با رنگ گل‌های بنفش و ارغوانی از نظر متابولیت‌های ثانویه غنی‌تر می‌باشند، که می‌توانند در برنامه‌های اصلاحی این گیاه مورد توجه قرار گیرند. با توجه به اثرات نامطلوب آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی بر سلامت انسان، پژوهش‌های بیش‌تر در زمینه استخراج، خالص سازی و کاربرد پساب ریزوم زنبق آلمانی در صنایع دارویی پیشنهاد می‌شود. با شناسایی و کاربرد بیش‌تر ترکیبات زیستی پساب اسانس‌گیری هیبریدهای مختلف این گیاه و همچنین گونه‌های دیگر زنبق می‌توان برای استفاده بهینه از مقادیر انبوه این گیاه و افزایش ارزش اقتصادی آن در کشور برنامه‌ریزی کرد.

REFERENCES

1. Alirezalu, A., Ahmadi, N., Salehi, P., Sonboli, A., Alirezalu, K., Mousavi Khaneghah, A., Barba, F. J., Munekata, P. E., & Lorenzo, J. M. (2020). Physicochemical characterization, antioxidant activity, and phenolic compounds of hawthorn (*Crataegus* spp.) fruits species for potential use in food applications. *Foods*, 9(4), 436.
2. Asghar, S. F., Habib-ur-Rehman, Atta-ur-Rahman, & Choudhary, M. I. (2010). Phytochemical investigations on *Iris germanica*. *Natural Product Research*, 24(2), 131-139.
3. Azimi, M. H., Jozghasemi, S., & Barba-Gonzalez, R. (2018). Multivariate analysis of morphological characteristics in *Iris germanica* hybrids. *Euphytica*, 214(9), 1-11.
4. Basgedik, B., Ugur, A., & Sarac, N. (2014). Antimicrobial, antioxidant, antimutagenic activities, and phenolic compounds of *Iris germanica*. *Industrial Crops and Products*, 61, 526-530.
5. Borneo, R., León, A. E., Aguirre, A., Ribotta, P., & Cantero, J. J. (2009). Antioxidant capacity of medicinal plants from the province of Córdoba (Argentina) and their in vitro testing in a model food system. *Food Chemistry*, 112(3), 664-670.
6. Capocasa, F., Scalzo, J., Mezzetti, B., & Battino, M. (2008). Combining quality and antioxidant attributes in the strawberry: The role of genotype. *Food Chemistry*, 111(4), 872-878.
7. Celano, R., Piccinelli, A. L., Pagano, I., Roscigno, G., Campone, L., De Falco, E., Russo, M., & Rastrelli, L. (2017). Oil distillation wastewaters from aromatic herbs as new natural source of antioxidant compounds. *Food Research International*, 99, 298-307.
8. Chang, Q., Zuo, Z., Harrison, F., & Chow, M. S. S. (2002). Hawthorn. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 42(6), 605-612.
9. Choudhary, M. I., Naheed, S., Jalil, S., & Alam, J. M. (2005). Effects of ethanolic extract of *Iris germanica* on lipid profile of rats fed on a high-fat diet. *Journal of ethnopharmacology*, 98(1-2), 217-220.
10. Dawidowicz, A. L., Wianowska, D., & Baraniak, B. (2006). The antioxidant properties of alcoholic extracts from *Sambucus nigra* L. (antioxidant properties of extracts). *LWT-Food Science and Technology*, 39(3), 308-315.
11. Du, G., Li, M., Ma, F., & Liang, D. (2009). Antioxidant capacity and the relationship with polyphenol and vitamin C in *Actinidia* fruits. *Food Chemistry*, 113(2), 557-562.
12. Ebrahimzadeh, M. A., Hosseinimehr, S. J., Hamidinia, A., & Jafari, M. (2008). Antioxidant and free radical scavenging activity of *Feijoa sellowiana* fruits peel and leaves. *Pharmacologyonline*, 1, 7-14.
13. Farzadkia, M., FallahJokandan, S., & YeganeBadi, M. (2015). Compost management in Iran: opportunities and challenges. *Journal of Environmental Health Enginering*, 2(3), 211-223.
14. Fattahi, M., Nazeri, V., Torras-Claveria, L., Sefidkon, F., Cusido, R. M., Zamani, Z., & Palazon, J. (2013). Identification and quantification of leaf surface flavonoids in wild-growing populations of *Dracocephalum kotschyi* by LC–DAD–ESI-MS. *Food Chemistry*, 141(1), 139-146.
15. Fraga-Corral, M., García-Oliveira, P., Pereira, A. G., Lourenço-Lopes, C., Jimenez-Lopez, C., Prieto, M. A., & Simal-Gandara, J. (2020). Technological application of tannin-based extracts. *Molecules*, 25(3), 614.

16. Gao, Q. H., Wu, P. T., Liu, J. R., Wu, C. S., Parry, J. W., & Wang, M. (2011). Physico-chemical properties and antioxidant capacity of different jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) cultivars grown in loess plateau of China. *Scientia Horticulturae*, 130(1), 67-72.
17. Ghasemi, G., Alirezalu, A., & Rahmanzadeh Ishkeh, S. (2019). Evaluation and comparison of phytochemical and antioxidant capacity of some small fruits collected from Urmia Khan-Dareh-si region. *Journal of Food Science and Technology*, 16(86), 15-29. (In Farsi).
18. Ghasemi, G., Alirezalu, A., Ishkeh, S. R., & Ghosta, Y. (2021). Phytochemical properties of essential oil from *Artemisia sieberi* Besser (Iranian accession) and its antioxidant and antifungal activities. *Natural Product Research*, 35(21), 4154-4158.
19. Golmohamadi, Z., Jalili, M., & Rashidi, L. (2020). Study of fatty acids profile, antioxidant activity properties and polyphenol compounds of loquat leaf. *Iranian Journal of Biosystems Engineering*, 50(4), 863-872. (In Farsi).
20. Hacıbekiroğlu, I., & Kolak, U. (2015). Screening antioxidant and anticholinesterase potential of *Iris albicans* extracts. *Arabian Journal of Chemistry*, 8(2), 264-268.
21. Hashempour, A., Ghazvini, R. F., Bakhshi, D., Ghasemnezhad, M., Sharafti, M., & Ahmadian, H. (2010). Ascorbic acid, anthocyanins, and phenolics contents and antioxidant activity of ber, azarole, raspberry, and cornelian cherry fruit genotypes growing in Iran. *Horticulture, Environment and Biotechnology*, 51(2), 83-88.
22. Hassan Sultan, T., Noroozi, M., & Amoozegar, M. A. (2016). A survey on total carotenoids, chlorophyll a and b and also antioxidant activity of derived from four strain of green alga isolated from the Golestan coasts, (Caspian Sea). *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal*, 6(24), 31-36. (In Farsi).
23. Ibrahim, S. R., Mohamed, G. A., & Al-Musayeib, N. M. (2012). New constituents from the rhizomes of Egyptian *Iris germanica* L. *Molecules*, 17(3), 2587-2598.
24. Jéhan, H., Courtois, D., Ehret, C., Lerch, K., & Petiard, V. (1994). Plant regeneration of *Iris pallida* Lam. and *Iris germanica* L. via somatic embryogenesis from leaves, apices and young flowers. *Plant Cell Reports*, 13(12), 671-675.
25. Koczka, N., Stefanovits-Bányai, É., & Ombódi, A. (2018). Total polyphenol content and antioxidant capacity of rosehips of some Rosa species. *Medicines*, 5(3), 84.
26. Kohlein, F. (1987). *Iris*. Timber Press, Portland, Oregon.
27. Koley, T. K., Kaur, C., Nagal, S., Walia, S., & Jaggi, S. (2016). Antioxidant activity and phenolic content in genotypes of Indian jujube (*Zizyphus mauritiana* Lamk.). *Arabian Journal of Chemistry*, 9, S1044-S1052.
28. Kordi Tamandani. E., Jafar, V., & Moharam, V. (2014). In vitro production of secondary metabolites in *Cicer spiroceras* using elicitors. *Global Journal of Research on Medicinal Plants & Indigenous Medicine*, 3(2), 48.
29. Lichtenthaler H. K, (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic membranes. *Methods Enzymology*, 148, 350-383.
30. Martins, S., Mussatto, S. I., Martínez-Avila, G., Montañez-Saenz, J., Aguilar, C. N., & Teixeira, J. A. (2011). Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnology Advances*, 29(3), 365-373.
31. Mishra, K.P., Ganju, L., Sairam, M., Banerjee, P.K., & Sawhney, R.C. (2008). A review of high throughput technology for the screening of natural products. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 62(2), 94-98.
32. Mocan, A., Zengin, G., Mollica, A., Uysal, A., Gunes, E., Crişan, G., & Aktumsek, A. (2018). Biological effects and chemical characterization of *Iris schachtii* Markgr. extracts: A new source of bioactive constituents. *Food and Chemical Toxicology*, 112, 448-457.
33. Mohadjerani, M. (2012). Antioxidant activity and total phenolic content of *Nerium oleander* L. grown in North of Iran. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 11(4), 1121-1126. (In Farsi).
34. Mohamed, G. A., Ibrahim, S. R., & Ross, S. A. (2013). New ceramides and isoflavone from the Egyptian *Iris germanica* L. rhizomes. *Phytochemistry Letters*, 6(3), 340-344.
35. Nadaroğlu, H., Demir, Y., & Demir, N. (2007). Antioxidant and radical scavenging properties of *Iris germanica*. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 41(8), 409-415.
36. Nakajima, J. I., Tanaka, I., Seo, S., Yamazaki, M., & Saito, K. (2004). LC/PDA/ESI-MS profiling and radical scavenging activity of anthocyanins in various berries. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2004(5), 241-247.
37. Nasim, S., Baig, I., Jalil, S., Orhan, I., Sener, B., & Choudhary, M. I. (2003). Anti-inflammatory isoflavonoids from the rhizomes of *Iris germanica*. *Journal of Ethnopharmacology*, 86(2-3), 177-180.
38. Nouri, S., Kiasat, A. R., Kolahi. M., Mirzajani, R., & Seyednejad, S. M. (2016). Phytochemical studies, antioxidants and various optimization methods in order to determine the best method of extracting curcumin extract ethanol from the plant *Curcuma longa* L. *Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants*, 4(3), 1-11. (In Farsi).

39. Phuyal, N., Jha, P. K., Raturi, P. P., & Rajbhandary, S. (2020). Total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activities of fruit, seed, and bark extracts of *Zanthoxylum armatum* DC. *The Scientific World Journal*, 2020.
40. Pourmorad, F., Hosseinimehr, S. J., & Shahabimajd, N. (2006). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, 5(11), 1142-1145.
41. Rahman, A., Nasim, S., Baig, I., Jalil, S., Orhan, I., Sener, B., & Choudhary, M. I. (2003). Anti-inflammatory isoflavonoids from the rhizomes of *Iris germanica*. *Journal of Ethnopharmacology*, 86(2-3), 177-180.
42. Rossa, M. M., de Oliveira, M. C., Okamoto, O. K., Lopes, P. F., & Colepicolo, P. (2002). Effect of visible light on superoxide dismutase (SOD) activity in the red alga *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, 14(3), 151-157.
43. Solimine, J., Garo, E., Wedler, J., Rusanov, K., Fertig, O., Hamburger, M., Atanassov, I., & Butterweck, V. (2016). Tyrosinase inhibitory constituents from a polyphenol enriched fraction of rose oil distillation wastewater. *Fitoterapia*, 108, 13-19.
44. Tamilselvi, N., Krishnamoorthy, P., Dhamotharan, R., Arumugam, P., & Sagadevan, E. (2012). Analysis of total phenols, total tannins and screening of phytocomponents in *Indigofera aspalathoides* (Shivanar Vembu) Vahl *ex* DC. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 4(6), 3259-3262.
45. Tee, S. A., Fristiohady, A., & Yodha, A. W. M. (2021). Total phenolic and flavonoid content, antioxidant, and toxicity test with BSLT of *Meistera chinensis* fruit fraction from southeast Sulawesi. *Borneo Journal of Pharmacy*, 2(1), 1-6.
46. Tohidi, B., Rahimmalek, M., & Arzani, A. (2017). Essential oil composition, total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activity of *Thymus* species collected from different regions of Iran. *Food Chemistry*, 220, 153-161.
47. Trivellini, A., Lucchesini, M., Maggini, R., Mosadegh, H., Villamarin, T. S. S., Vernieri, P., Mensuali-Sodi, A., & Pardossi, A. (2016). Lamiaceae phenols as multifaceted compounds: bioactivity, industrial prospects and role of "positive-stress". *Industrial Crops and Products*, 83, 241-254.
48. Ullah, F., Ayaz, M., Sadiq, A., Hussain, A., Ahmad, S., Imran, M., & Zeb, A. (2016). Phenolic, flavonoid contents, anticholinesterase and antioxidant evaluation of *Iris germanica* var; florentina. *Natural Product Research*, 30(12), 1440-1444.
49. Wollenweber, E., Stevens, J. F., Klimo, K., Knauft, J., Frank, N., & Gerhäuser, C. (2003). Cancer chemopreventive in vitro activities of isoflavones isolated from *Iris germanica*. *Planta Medica*, 69(01), 15-20.
50. Wollinger, A., Perrin, E., Chahboun, J., Jeannot, V., Touraud, D., & Kunz, W. (2016). Antioxidant activity of hydro distillation water residues from *Rosmarinus officinalis* L. leaves determined by DPPH assays. *Comptes Rendus Chimie*, 19(6), 754-765.
51. Zhang, H., YANG, Y. F., & ZHOU, Z. Q. (2018). Phenolic and flavonoid contents of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) fruit tissues and their antioxidant capacity as evaluated by DPPH and ABTS methods. *Journal of Integrative Agriculture*, 17(1), 256-263.
52. Žugić, A., Đorđević, S., Arsić, I., Marković, G., Živković, J., Jovanović, S., & Tadić, V. (2014). Antioxidant activity and phenolic compounds in 10 selected herbs from Vrujci Spa, Serbia. *Industrial Crops and Products*, 52, 519-527.