Sari Agriculture Sciences and Natural Resources University

Journal of Crop Breeding Vol. 16, Issue 2, 2024 p: 53-66

OPEN ACCESS

Research Paper

Phytochemical Analysis of the Medicinal Plant Terrestrial Orchid (*Orchis Simia*) in the Flowering Stage

Zeinab Masoudi Jozchal[1], Nadali Bagheri[2], Nadali Babeian Jelodar[3], Gholamali Ranjbar[3] and Jamshid Farmani[4]

1- Ph.D Student, Genetics and Plant Breeding, Faculty of Agricultural Sciences, University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran
2- Associate Professor, Department of Genetics and Plant Breeding, Faculty of Agricultural Sciences, University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran, (Corresponding author: n.babaeiyan@umz.ac.ir)
3- Professor, Department of Genetics and Plant Breeding, Faculty of Agricultural Sciences, University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran
4- Associate Professor, Department of Food Industry, Faculty of Agricultural Engineering, University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran

Received: 7 November 2023 Revised: 3 March, 2024 Accepted: 10 March 2024 Available Online: 6 May, 2024

Extended Abstract

Background: As one of the medicinal plants from the Orchidaceae family, *Orchis simia* tubers are traded all over the world. The unmarketable parts are usually discarded (e.g., inflorescence, leaves, and stems) and produce a large amount of unused biomass. Medicinal effects of plants usually result from the composition of their secondary metabolites. Identification and quantification of secondary metabolites will play an important role in exploiting the medicinal potential of the plant. Orchids grow in different environments and habitats, mainly due to the presence of a unique set of secondary metabolites that help these plants tolerate stressful conditions. Therefore, following traditional approaches, these plants have been proposed as an important source for biological exploration. A number of compounds obtained from different parts of the orchid indicate biological activity. Alkaloids, flavonoids, phenanthrenes, terpenoids, bibenzyl derivatives, and other biologically active compounds have been reported in orchids. The present study identifies the phytochemical substances in *Orchis simia* orchid.

Methods: To investigate the phytochemistry of the inflorescence, leaf, and stem of *Simia* orchid separately, the samples were collected from nature, washed with water, and dried in the shade. Each of the organs was then powdered separately, and methanolic extract was extracted by ultrasonic and centrifugation methods. Total phenol was evaluated by the Folin-Ciocalteau method. Antioxidant capacity was determined by the FRAP method. The main compounds were estimated quantitatively and qualitatively by high-performance liquid chromatography (HPLC) and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) methods.

Results: HPLC and LC-MS analyses of *O. simia* samples led to the isolation of 28 secondary metabolites (four compounds of bibenzyl derivatives, eight phenolic and flavonoid compounds, and 16 alkaloid compounds). Phenolic and flavonoid compounds identified in *Simia* orchid included benzoic acid, caffeic acid, m-coumaric acid, rutin, luteolin, kaempferol, quercitrin, and quercetin. In parallel, the total phenol content and total antioxidant capacity of the extracts were also measured in the extract. The results of variance analysis of the obtained data showed that the leaf, stem, and inflorescence samples were significantly different from each other at the 1% level in terms of total phenol content and total antioxidant capacity. Among the studied organs, inflorescence extract was superior to the other studied tissues in terms of 28 secondary metabolites as well as total phenol and antioxidant capacity. The average comparison results showed that the total phenolic compounds and antioxidant capacity in different organs of the *O.s simia* plant were not the same, and they were placed in three different groups. The highest total phenol content (138.65 mg GAE/g dry weight) was observed in orchid inflorescences. The highest and lowest levels of antioxidant activity were obtained from inflorescence (77.58 µmol/g) and stem (53.24 µmol/g) samples, respectively.

Copyright ©2024 Masoudi Jozchal et al. Published by Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University.
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 Unported License which allows users to read, copy, distribute and make derivative works for non-commercial purposes from the material, as long as the author of the original work is cited properly.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-05-09]

[DOI: 10.61186/jcb.16.2.53]

Conclusion: A proper knowledge of the chemical composition of a plant leads to a better understanding of its potential medicinal value. In this research, therefore, the changes in biochemical compounds and antioxidant capacity of the extracts were studied in leaf, stem, and inflorescence organs. According to the results of this research, the inflorescence of *O. simia* is a potential source of antioxidant capacity, phenol, and alkaloids, which will have an important medicinal role. The secondary metabolites obtained from this plant are reported for the first time and will be useful for new medicinal developments and applications in the future. Moreover, this study will help reduce the waste of this orchid in industrial production because its aerial organs can be exploited for medicinal purposes.

Keywords: Antioxidant capacity, Extract, HPLC, Orchid plant, Secondary metabolites, Total phenol

How to Cite This Article: Masoudi Jozchal, Z., Bagheri, N., Babeian Jelodar, N., Ranjbar, Gh & Farmani, J. (2024). Phytochemical Analysis of the Medicinal Plant Terrestrial Orchid (*Orchis Simia*) in the Flowering Stage. *J Crop Breed,* 16(2), 53-66. DOI: 10.61186/ jcb.16.2.53

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-05-09]

[DOI: 10.61186/jcb.16.2.53]

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

مقاله پژوهشی

آنالیز فیتوشیمیایی گیاه دارویی ارکیده خاکزی *(Orchis simia)* در مرحله گلدهی

زینب مسعودی جوزچال[۱]، نادعلی باقری[۲]، نادعلی بابائیان جلودار[۳]، غلامعلی رنجبر[۳] و جمشید فرمانی[۴]

۱- دانشجوی دکتری، ژنتیک و به نژادی گیاهی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، ساری، ایران
۲- دانشیار گروه ژنتیک و به نژادی گیاهی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، ساری، ایران، (نویسنده مسوول: n.babaeiyan@umz.ac.ir)
۳- استاد گروه ژنتیک و به نژادی گیاهی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، ساری، ایران
۴- دانشیار گروه صنایع غذایی، دانشکده مهندسی زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۸/۱۶ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۱۲/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۲۰ تاریخ انتشار آنلاین: ۱۴۰۲/۱۲/۱۷
صفحه: ۵۳ تا ۶۶

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: *Orchis simia* یکی از گیاهان دارویی خانواده Orchidaceae است که غده‌های آن در سراسر جهان تجارت می‌شود. بخش‌های غیرقابل فروش این گیاهان معمولاً دور ریخته می‌شوند (مثلاً گل‌آذین، برگ و ساقه) و مقدار زیادی زیست‌توده استفاده نشده تولید می‌کنند. اثرات دارویی گیاهان معمولاً از ترکیب متابولیت‌های ثانویه موجود در آن‌ها حاصل می‌شود. شناسایی و کمی‌سازی متابولیت‌های ثانویه نقش مهمی در بهره‌برداری از پتانسیل دارویی گیاه خواهد داشت. ارکیده‌ها در محیط‌ها و زیستگاه‌های مختلفی رشد می‌کنند که عمدتاً به‌دلیل وجود مجموعه‌ای از متابولیت‌های ثانویه منحصربه‌فرد است که به این گیاهان کمک می‌کند تا شرایط استرس‌زا را تحمل کنند. بنابراین، این گیاهان به‌دنبال رویکردهای سنتی به‌عنوان منبع مهمی برای اکتشاف زیستی مطرح شده‌اند. تعدادی از ترکیبات به‌دست آمده از قسمت‌های مختلف ارکیده حاکی از فعالیت بیولوژیکی است. آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، فنانترن‌ها، ترپنوئیدها، مشتقات بی‌بنزیل و سایر ترکیبات فعال بیولوژیکی در ارکیده‌ها گزارش شده است. بررسی حاضر به شناسایی مواد فیتوشیمیایی موجود در ارکیده *Orchis simia* می‌پردازد.

مواد و روش‌ها: برای بررسی فیتوشیمیایی اندام‌های گل‌آذین، برگ و ساقه ارکیده سیمیا به‌طور جداگانه، پس از جمع‌آوری نمونه‌ها از طبیعت و جداسازی اندام‌های برگ، ساقه و گل‌آذین و سپس شستشوی اولیه با آب و خشک کردن در سایه، هر یک از اندام‌ها به‌طور مجزا پودر شده و عصاره متانولی با روش اولتراسونیک و سانتریفیوژ استخراج شد و ارزیابی فنل کل (TPC) با روش فولین سیکالچو و تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل (TAC) با روش FRAP و برآورد کمی و کیفی ترکیبات اصلی با روش HPLC و LC-MS انجام شد.

یافته‌ها: تجزیه و تحلیل کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) و کروماتوگرافی مایع- طیف‌سنجی جرمی (LC-MS) نمونه‌های *O. simia* منجر به جداسازی ۲۸ متابولیت ثانویه (۴ ترکیب مشتقات بی‌بنزیل، ۸ ترکیب فنولیک و فلاونوئید و ۱۶ ترکیب آلکالوئید) شد. ترکیبات فنولیک و فلاونوئید شناسایی شده در ارکیده سیمیا شامل بنزوئیک اسید، کافئیک اسید، ام-کوماریک اسید، روتین، لوتئولین، کامفرول، کوئرسیترین و کوئرستین بود. به موازات آن، مقادیر فنل کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل عصاره‌ها نیز اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های به‌دست آمده نشان داد که نمونه‌های برگ، ساقه و گل‌آذین تفاوت معنی‌داری در سطح ۱ درصد با یکدیگر از نظر میزان فنل کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل دارند. در بین اندام‌های مورد مطالعه، عصاره گل‌آذین از نظر ۲۸ متابولیت ثانویه و همچنین فنل کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل، برتر از سایر بافت‌های مورد مطالعه بود. همچنین، نتایج مقایسه میانگین نشان داد که مقدار ترکیبات فنل و ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل در اندام‌های مختلف گیاه *Orchis simia* یکسان نیست و در ۳ گروه مختلف قرار گرفتند. بیشترین میزان فنل کل (۱۳۸/۶۵ میلی‌گرم معادل اسید گالیک بر گرم وزن خشک) در گل‌آذین ارکیده مشاهده شد. همچنین بالاترین و کمترین میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدان به‌ترتیب مربوط به نمونه‌های گل‌آذین (۷۷/۵۸ میکرومول بر گرم وزن خشک) و ساقه (۵۳/۲۴ میکرومول بر گرم وزن خشک) به‌دست آمد. از بین نمونه‌های برگ، ساقه و گل‌آذین *O. simia*، ساقه آن دارای بالاترین میزان مشتقات بی‌بنزیل بود. بیشترین میزان ترکیبات فرار شناسایی شده در عصاره‌ها از نوع کریزوتوکسین (Chrysotoxin) به‌میزان (۲/۲۸۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بود که در ساقه رؤیت شد. درحالی‌که سایر ترکیبات فرار مانند ترکیبات گیگانتول (Gigantol) و موسکاتیلین (Moscatilin) به‌میزان کمتری به‌دست آمد و کریپیداتین (Crepidatin) در ساقه بسیار ناچیز (۰/۲۱۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و در برگ و گل‌آذین شناسایی نشد. بیشترین میزان ترکیبات آلکالوئید شامل تتراندرین (۴۷/۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر) و در گل‌آذین به‌دست آمد. کوکسولین (Cocsuline)، ترکیب آلکالوئید مشترک در تمامی اندام‌های مورد مطالعه بود و بیشترین مقدار این ترکیب در گل‌آذین (۳۰/۵۴ نانوگرم بر میلی‌لیتر) و سپس در ساقه (۲۸/۸۱ نانوگرم بر میلی‌لیتر) شناسایی شد. ۵ ترکیب آلکالوئید شامل (Isotetrandrine، (+)-thalmirabine ، Dimethyltubocurarine، Pheanthine و Thalidasine) فقط در برگ و ۴ ترکیب شامل (Gyroamericine، Racemosidine C، Chondrofoline و Thalfoetidine) در ساقه و ۵ ترکیب شامل (+)-angchibangkine، (+)-12-O-methyltricordatine، Baluchistine، (+)-Tubocurarine chloride و Penduline) در گل‌آذین ارکیده *O. simia* شناسایی شدند که از بین آن‌ها، ترکیبات موجود در گل‌آذین ارکیده، بیشترین مقدار را به‌خود اختصاص دادند.

نتیجه‌گیری: آگاهی مناسب از ترکیب شیمیایی گیاه منجر به درک بهتر ارزش دارویی احتمالی آن می‌شود. بنابراین در این پژوهش، مقدار ترکیبات بیوشیمیایی و ظرفیت آنتی‌اکسیدان عصاره‌ها در اندام‌های برگ، ساقه و گل‌آذین ارکیده سیمیا مطالعه شد. طبق نتایج این پژوهش، گل‌آذین *O. simia* منبع بالقوه ظرفیت آنتی‌اکسیدان، فنل و آلکالوئید است که نقش دارویی مهمی خواهند داشت. متابولیت‌های ثانویه به‌دست‌آمده از این گیاه برای اولین بار گزارش می‌شوند و برای پیشرفت‌ها و کاربردهای دارویی جدید در آینده مفید خواهند بود. همچنین، این مطالعه به کاهش ضایعات ارکیده مورد مطالعه در تولید صنعتی کمک خواهد کرد، زیرا اندام‌های هوایی آن می‌تواند برای اهداف دارویی مورد بهره‌برداری قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: ظرفیت آنتی‌اکسیدان، عصاره، فنل کل، گیاه ارکیده، متابولیت‌های ثانویه، HPLC

مقدمه

گیاهان منابع ارزشمندی از متابولیت‌های ثانویه با خواص دارویی هستند، اما تنها بخش کوچکی از آن‌ها به‌طور فعال برای اهداف دارویی مورد بهره‌برداری قرار می‌گیرند. بنابراین گونه‌های گیاهی ناشناخته احتمالاً حاوی ترکیبات زیست فعال جدید هستند (Zorzi *et al.*, 2023).

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-05-09]

[DOI: 10.61186/jcb.16.2.53]

Orchidaceae به‌عنوان دومین خانواده بزرگ در بین آنژیوسپرم‌ها در نظر گرفته شده است و بسیاری از اعضای آن دارای خواص دارویی برای درمان بیماری‌های بی‌شماری هستند (Gantait *et al.*, 2021). خانواده Orchidaceae پتانسیل درمانی بسیار زیادی دارد و از زمان‌های قدیم برای این‌منظور استفاده می‌شده است (Arora *et al.*, 2017). تجزیه و تحلیل دقیق ترکیبات زیست‌فعال عصاره‌های گیاهی با ارزش‌های قومی- گیاه‌شناسی شناخته شده یا حتی در اندوفیت‌های مرتبط با گیاهان دارویی می‌تواند اهمیت دارویی جدید آن‌ها را آشکار کند (Jagannath *et al.*, 2021; Konappa *et al.*, 2020).

گیاه دارویی ارکیده *orchis simia*، گیاهی خاکزی و یک‌ساله است و گل‌های این گیاه در اوایل بهار ظاهر می‌شوند. مطالعات فارماکولوژیک انجام شده روی ارکیده‌ها نشان‌دهنده پتانسیل فوق‌العاده این گیاهان در درمان بیماری‌هایی مانند اختلالات عصبی، ضد تشنج، ضد سرطان، ضد دیابت و غیره است (Sohag *et al.*, 2017). پتانسیل آن‌ها به‌عنوان داروهای درمانی از زمان‌های بسیار قدیم محقق شده است و به‌دلیل خواص دارویی آن‌ها به‌طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. ارکیده‌ها در محیط‌ها و زیستگاه‌های مختلفی رشد می‌کنند که عمدتاً به‌دلیل وجود مجموعه‌ای از متابولیت‌های ثانویه منحصربه‌فرد است که به این گیاهان کمک می‌کند تا شرایط استرس‌زا را تحمل کنند. بنابراین، این گیاهان به‌دنبال رویکردهای سنتی به‌عنوان منبع مهمی برای اکتشاف زیستی مطرح شده‌اند (Ghai *et al.*, 2022). مواد فیتوشیمیایی ارکیده که مورد مطالعه قرار گرفته‌اند عبارتند از آلکالوئیدها، بی‌بنزیل‌ها، فنانترن‌ها، استیلبنوئیدها، فنول‌ها، فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها و پلی‌ساکاریدها. بسیاری از این ترکیبات دارای خواص آنتی‌اکسیدان، ضد التهابی، ضد میکروبی، ضد انگلی، ضد انعقاد، ضد دیابت و کاهش‌دهنده چربی هستند (Teoh, 2016). غربالگری اولیه فیتوشیمیایی عصاره اندام‌های ارکیده *Orchis mascula* نشان داد که این گیاه حاوی آلکالوئیدها، فنول‌ها، ترپن‌ها و فلاونوئیدها است (Al-Snafi, 2020). در بررسی متابولومیک گونه ارکیده *oncidium sotoanum*، عصاره‌های برگ و گل‌آذین آن مورد تجزیه فیتوشیمیایی قرار گرفتند و نتایج نشان داد، این گیاه منبع غنی فلاون‌ها هستند (Zorzi *et al.*, 2023). همچنین در بررسی محتوای کل فنولیک، فلاونوئید، فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی برخی ارکیده‌های دارویی مهم، عصاره‌های ارکیده *Ophrys speculum*، دارای بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی بود. همچنین، عصاره کلروفرم تمام گونه‌ها، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی قابل‌توجهی نشان دادند (Hürkan *et al.*, 2019). آنتی‌اکسیدان‌های موجود در گیاهان می‌توانند رادیکال‌های آزاد را از بین ببرند و از تشکیل آن‌ها جلوگیری کنند. به‌خوبی شناخته شده است که ظرفیت آنتی‌اکسیدان برخی از داروها در از بین بردن رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن با اثرات محافظتی کبدی آن‌ها مرتبط است (Akhter *et al.*, 2015). در سال‌های اخیر به‌دلیل تحقیقاتی که نشان می‌دهد آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی ممکن است عوارض جانبی منفی داشته باشند، آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی توجه زیادی را به‌خود جلب کرده‌اند (Hossen *et al.*, 2021). استفاده از داروهای مشتق شده از گیاهان معمولاً غیر سمی، بی‌خطر و حتی عاری از عوارض جانبی قابل‌توجه است (Uddin *et al.*, 2018). ازاین‌رو، کاربردهای درمانی ارکیده از داروهای مصنوعی مؤثرتر است. در ارکیده‌های دارویی، کلاس‌های مختلفی از متابولیت‌های ثانویه تا به امروز گزارش شده‌اند و این متابولیت‌ها نقش مهمی در عرصه داروسازی از خود نشان می‌دهند. استیلبن‌ها و آلکالوئیدها کلاس‌های اصلی متابولیت‌های ثانویه هستند که در بین ارکیده‌های دارویی رایج هستند (Gantait *et al.*, 2021). آلکالوئیدها به‌عنوان بزرگ‌ترین گروه متابولیت‌های ثانویه در دسترس در گیاهان در نظر گرفته می‌شوند. این ترکیبات عمدتاً از نیتروژن تشکیل شده‌اند و دارای ساختار حلقه‌ای هتروسیکلیک هستند (Lee *et al.*, 2016). بی‌بنزیل یک هیدروکربن است که ساختار اصلی آن شامل دو حلقه بنزن متصل به اتان است. آن‌ها معمولاً در گیاهان تولید می‌شوند. بی‌بنزیل‌های موجود در ارکیده‌ها از دی هیدرو پی کوماریک اسید و استات یا مالونات سنتز می‌شوند (Friederich *et al.*, 1999). گیگانتول (Gigantol) و باتاتاسین ۳ (batatasin III) رایج‌ترین بی‌بنزیل‌ها هستند که در ارکیده‌ها یافت می‌شوند که دارای فعالیت سمیت سلولی هستند (Chen *et al.*, 2008).

فعالیت ضد پلاکتی موسکاتیلین و گیگانتول در یک آزمایش آزمایشگاهی گزارش شد (Fan *et al.*, 2001). متابولیت‌های ثانویه به‌عنوان ترکیبات آلی با وزن مولکولی کم تعریف می‌شوند. اگرچه این ترکیبات مسئول اصلی رشد و نمو نیستند، اما تحت شرایط خاصی مانند استرس تولید می‌شوند (Thakur *et al.*, 2019). ارکیده‌ها به‌دلیل ویژگی‌های دارویی مختلف برای فرآورده‌های گیاهی، از زمان‌های بسیار قدیم به‌طور گسترده برای درمان انواع بیماری‌ها مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Hossain, 2011). علاوه بر این، ترکیبات زیست‌فعال مختلف ارکیده نقش مهمی در کاهش سمیت کبدی و تعدیل استرس اکسیداتیو نشان داده است. همچنین، ارکیده‌ها به‌دلیل وجود ترکیبات گیاهی با چندین فعالیت بیولوژیکی به‌عنوان ادرارآور، ضد سرطان، ضد میکروبی، آرام‌بخش، ضدالتهاب، کاهش قند خون، ضد تشنج، محافظت‌کننده عصبی، محافظ کبد و ضدویروسی، زمینه امیدوارکننده‌ای را در سیستم سلامت ایجاد کرده‌اند (Gutiérrez, 2010).

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-05-09]
[DOI: 10.61186/jcb.16.2.53]

اثرات دارویی مفید مواد گیاهی معمولاً از ترکیب محصولات ثانویه موجود در گیاه حاصل می‌شود. شناسایی و کمی‌سازی متابولیت‌های ثانویه نقش مهمی در بهره‌برداری از پتانسیل دارویی گیاه دارد. کروماتوگرافی مایع همراه با طیف‌سنجی جرمی (LC- MS) می‌تواند چندین ترکیب را از عصاره گیاه شناسایی کند. تجزیه و تحلیل LC- MS عصاره متانولی *E. nuda* وجود فنولیک‌ها، فلاونوئیدها و سایر ترکیبات فعال زیستی مانند آلکالوئیدها، سموم و آنتی‌بیوتیک‌ها را تائید کرد (Dawande & Gurav, 2021). در مطالعه (Azizyan & Abdollahi Mandoulakani, 2023) روی گیاه شیر تیغک وحشی (*Sonchus arvensis L.*)، خواص دارویی این گیاه، به‌دلیل وجود ترکیباتی از قبیل فنل‌ها، فلاونوئیدها و مشتقات آن مانند کامفرول، روتین، کوئرستین و ترکیبات آلکالوئیدی گزارش شده است. غربالگری مؤثر عصاره‌های گیاهی را می‌توان با روش‌های بیولوژیکی و روش‌های کروماتوگرافی مانند کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) در ترکیب با روش‌های مختلف تشخیص، انجام داد. HPLC یک تکنیک قدرتمند برای تجزیه و تحلیل سریع اجزای فعال زیستی است، و به‌طور خاص بر شناسایی و ارزیابی مداوم ترکیبات شناسایی شده تمرکز می‌کند (Kumar, 2017). شناسایی و کمی‌سازی متابولیت‌های ثانویه نقش مهمی در بهره‌برداری از پتانسیل دارویی گیاهان دارد.

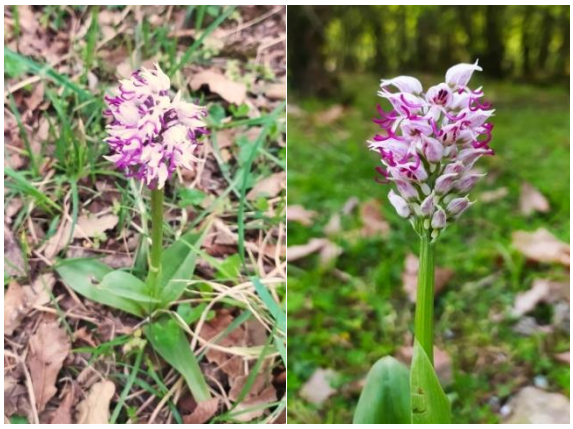
با توجه به اینکه ترکیبات مؤثره گیاه *Orchis simia* تاکنون گزارش نشده است، هدف از تحقیق حاضر، تجزیه فیتوشیمیایی این ارکیده ارزشمند بومی رامیان در مرحله فنولوژیکی گلدهی با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) و کروماتوگرافی مایع– طیف‌سنجی جرمی (LC-MS) بوده است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی و آماده‌سازی آنها برای آنالیز

نمونه‌های گیاهی ارکیده در مرحله گلدهی (شکل ۱) از ارتفاعات ۱۴۰۰ متری از سطح دریا منطقه رامیان، استان گلستان، در فروردین‌ماه سال ۱۴۰۱ جمع‌آوری شد. موقعیت جغرافیایی شهر رامیان با طول شرقی ۵۵/۹ درجه و عرض شمالی ۳۷/۱ درجه می‌باشد. پس از شناسایی گونه ارکیده توسط فلور منطقه و کارشناس سیستماتیک، اندام‌های مختلف این گیاه شامل ساقه، برگ، گل‌آذین از یکدیگر جدا گردید. ابتدا اندام‌های مختلف این گیاه برای مدت کوتاهی جهت برداشتن گرد و غبار مورد شستشو قرار گرفتند. درنهایت نمونه‌ها در سایه و شرایط نور غیرمستقیم تا رسیدن به وزن ثابت خشک گردیدند. نمونه‌های خشک شده برگ، ساقه و گل‌آذین تا قبل از آنالیز فیتوشیمیایی، نگهداری شدند.

جهت آنالیز فیتوشیمیایی، نمونه‌ها با دستگاه آسیاب برقی، پودر شدند. نمونه‌های پودر شده برگ، ساقه و گل‌آذین گیاه ارکیده، به‌طور مجزا جهت تجزیه فیتوشیمیایی مورد آزمایش قرار گرفتند. پودر خشک شده (۵۰ میلی‌گرم) در هر لوله میکرو سانتریفیوژ وزن شد و ۰/۵۰ میلی‌لیتر متانول به آن اضافه شد. استخراج با کمک اولتراسونیک به‌مدت ۱۵ دقیقه در شرایط دمای محیط انجام شد. سپس عصاره با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی در یک لوله جدید جمع‌آوری شد تا خشک شدن در دمای اتاق تبخیر شد و مجدداً در ۱ میلی‌لیتر متانول برای آنالیز LC- MS، HPLC، تعیین فنل کل و سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل حل شد.



شکل ۱– گیاه *Orchis simia*
Figure 1. *Orchis simia* plant

تعیین فنل کل Total phenolic contents (TPC)

محتوای فنل کل عصاره‌های برگ، ساقه و گل‌آذین با روش Folin-Ciocalteau برآورد شد (Slinkard & Singleton, 1977). به‌طور خلاصه، عصاره در متانول حل شد و مقدار کمی از این محلول به ۲ میلی‌لیتر Na_2CO_3 دو درصد اضافه شد و پس از ۲ دقیقه ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین (رقیق شده ۱:۱) اضافه شد. پس از ۳۰ دقیقه، جذب در ۷۵۰ نانومتر با استفاده از طیف‌سنجی Shimadzu-1601 UV Visible اندازه‌گیری

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-05-09]
[DOI: 10.61186/jcb.16.2.53]

شد. محتوای فنل کل به‌صورت معادل اسید گالیک (GAE) در هر میلی‌گرم عصاره محاسبه شده از نمودار استاندارد اسید گالیک بیان شد.

تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل (Antioxidant Total Cepacity (TAC

ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل (TAC) بر اساس سنجش FRAP برآورد شد. سنجش FRAP یکی از روش‌های اساسی برای غربالگری فعالیت آنتی‌اکسیدان در نمونه‌های گیاهی است که معمولاً مقادیر به‌صورت میلی‌گرم بر گرم وزن خشک گزارش می‌شوند (Choonong *et al.*, 2019).

روش FRAP با استفاده از (2 ,4 ,6- triazine-s- TPTZ (tripyridyl انجام گرفت (Choonong *et al.*, 2019). اساس این روش احیای آهن فریک به فرو (Fe 3+ - Fe 2+ - TPTZ به TPTZ) در حضور آنتی‌اکسیدان است. محلول FRAP به‌ترتیب حاوی بافر استات ۰/۳ مولار (pH=۳/۶)، محلول TPTZ 10 میلی‌مولار در HCl 40 میلی‌مولار و ۲۰ میلی‌مولار محلول کلرید آهن (III) با نسبت‌های ۱۰ –۱– ۱ می‌باشد. محلول FRAP به‌صورت تازه تهیه شد. در این روش ۱۰۰ میکرولیتر عصاره رقیق شده با ۱/۴ میلی‌لیتر محلول FRAP مخلوط شده و بعد از ۲۰ دقیقه جذب در طول موج ۵۹۳ نانومتر قرائت شد (Thaipong *et al.*, 2006). نتایج به‌صورت میانگین ± خطای استاندارد بیان شد.

شرایط کروماتوگرافی

برای تعیین محتوای فنولیک اسید و فلاونوئید و مشتقات بی‌بنزیل در عصاره‌های ارکیده موردنظر، از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) استفاده شد. روش کروماتوگرافی مورد استفاده جهت جداسازی و تعیین مقدار فنولیک اسید و فلاونوئید و مشتقات بی-بنزیل موجود در گیاه ارکیده، روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا بر اساس روش مطالعه قبلی (Choonong *et al.*, 2019) انجام شد. سیستم فاز متحرک شامل یک شستشوی گرادیان بود که با ۲۰٪ استونیتریل در اسید استیک آبی ۱/۵٪ شروع می‌شد، که به‌تدریج در ۳۰ دقیقه به ۳۲٪ استونیتریل افزایش یافت و به‌مدت ۳۰ دقیقه در استونیتریل ۳۲٪ نگه داشته شد. سرعت جریان ۰/۸ و ۱ میلی‌لیتر در دقیقه برای ۰–۳۰ دقیقه و ۳۰–۶۰ دقیقه زمان اجرا بود. این سیستم در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. همه حلال‌ها قبل از استفاده با کاغذ واتمن ۰/۴۵ میکرومتر فیلتر شدند و طول موج تشخیص روی ۲۸۰ نانومتر تنظیم شد. محلول‌های نمونه فیلتر شده و (۲۰ میکرولیتر در هر تزریق) توسط دستگاه نمونه‌گیری خودکار تزریق شد. سطح پیک و کروماتوگرام هر نمونه ثبت و آنالیز شد.

منحنی استاندارد

به‌منظور رسم منحنی استاندارد، محلول‌هایی با غلظت‌های یکسان از هر نمونه استاندارد، تهیه و به دستگاه HPLC تزریق شد. سپس منحنی استاندارد بر اساس مقادیر مواد مختلف رسم شد. شناسایی ترکیبات با مقایسه مقادیر زمان ماندگاری آنها با استانداردها به‌دست آمد.

تحلیل آماری

داده‌های حاصل از اندازه‌گیری فنل کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل، به‌عنوان میانگین ± انحراف استاندارد با ۳ نمونه و ۳ تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی تجزیه واریانس شدند و مقایسه میانگین با استفاده از روش دانکن (سطح معنی‌داری ۵ درصد) انجام شد. تمامی تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۶/۰ انجام شد.

نتایج و بحث

بررسی فنل و ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل

در ابتدا میزان ترکیبات فنلی بر مبنای میزان فنل کل (TPC) در برگ، ساقه و گل‌آذین به‌طور مجزا به‌روش فولین سیکالچو (Slinkard & Singleton, 1977) با استاندارد اسید گالیک تعیین شد. به‌طوری‌که نتایج در این مطالعه نشان داد که دامنه مقادیر فنل کل به‌طور میانگین بین ۹۳ تا ۱۳۸ میلی‌گرم معادل اسید گالیک در عصاره خشک برگ، ساقه و یا گل‌آذین بود.

در این پژوهش، نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های به‌دست آمده نشان داد که نمونه‌های ساقه و برگ و گل‌آذین در سطح ۱ درصد تفاوت معنی‌داری را با یکدیگر ازنظر میزان فنل کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل نشان می‌دهند (جدول ۱). همچنین، نتایج مقایسه میانگین نشان داد که مقدار ترکیبات فنلی و ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل در اندام‌های مختلف گیاه *Orchis simia* یکسان نیست و در ۳ گروه مختلف قرار گرفتند. بیشترین میزان فنل کل (۱۳۸/۶۵ میلی‌گرم معادل اسید گالیک بر گرم وزن خشک) و بیشترین میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل (۷۷/۵۸ میکرومول بر گرم وزن خشک) در گل‌آذین ارکیده مشاهده شد (شکل ۲).

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-05-09]

[DOI: 10.61186/jcb.16.2.53]

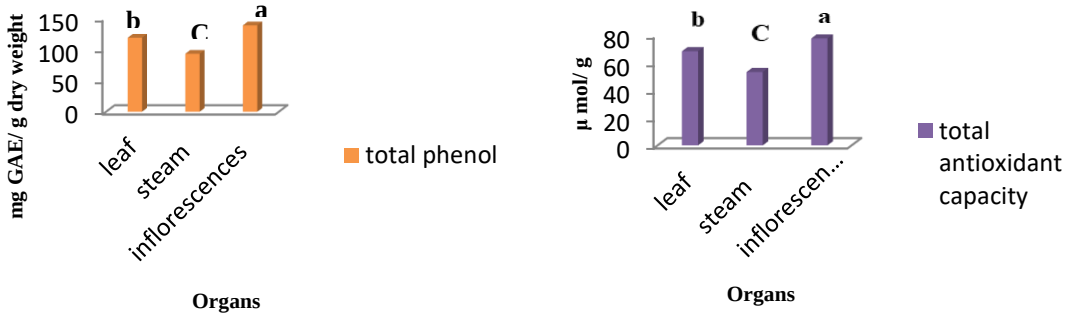
جدول ۱- تجزیه واریانس ترکیبات فیتوشیمیایی مورد مطالعه گیاه ارکیده در اندام‌های برگ، ساقه و گل‌آذین

Table 1. Analysis of variance of studied phytochemical compounds of orchid plant in leaf, stem and inflorescence organs

منابع تغییر S. O. V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean square	
		فنل کل (TPC)	ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل (TAC)
اندام‌ها organs	2	1572.138**	452.585**
خطا Error	6	5.123	6.572
ضریب تغییرات CV(%)		1.93	3.86

**؛ معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

**: Significant at the 1% probability level



شکل ۲- مقایسه میانگین فنل کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل در برگ، ساقه و گل‌آذین ارکیده *orchis simia* با روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن

Figure 2. Comparison of the average total phenol and total antioxidant capacity in leaves, stems and inflorescences of orchids simia by Duncan's multi-range test method.

اخیراً افزایش علاقه به پتانسیل درمانی گیاهان دارویی در کاهش آسیب بافت ناشی از رادیکال‌های آزاد مشاهده شده است (Štajner *et al.*, 2009؛ Pourmorad *et al.*, 2006). آنتی‌اکسیدان مولکولی است که قادر به نشان دادن یا جلوگیری از اکسیداسیون مولکول‌های دیگر مانند رادیکال‌های آزاد یا گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) است. بنابراین، آنتی‌اکسیدان‌ها نقش مهمی در محافظت از بدن انسان در برابر آسیب گونه‌های فعال اکسیژن ایفا می‌کنند (Lollinger, 1981؛ Štajner *et al.*, 2009). از بین این‌ها، ترکیبات فنلی بیشترین نسبت آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی شناخته شده را تشکیل می‌دهند (Ani et al., 2006).

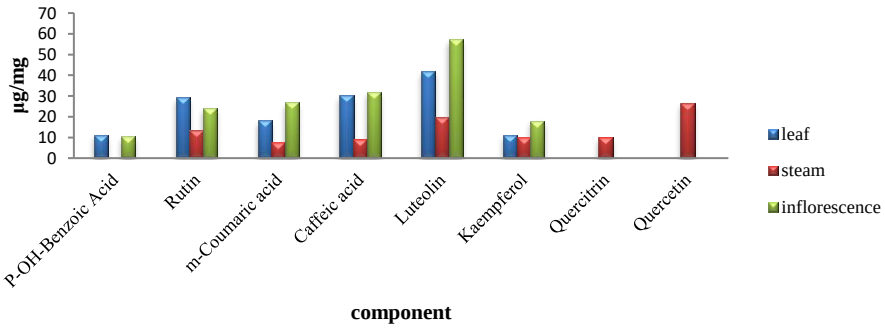
در *O.simia*، بیشترین میزان فنل کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل مربوط به گل‌آذین بود. برخی مطالعات ارتباط بین محتوای فنلی و ظرفیت آنتی‌اکسیدان را نشان داده‌اند (Yang *et al.*, 2002). با توجه به نتایج حاصل از پژوهش (Talebi *et al.*, 2022) و بررسی آزمایشات طی دو سال، فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه کنگر فرنگی در هر دو سال با محتوای فنلی آن رابطه مستقیم داشت و بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی این گیاه را به ترکیبات فنلی نسبت دادند. در مقابل، در مطالعه سوفیانی و وفا (Sofiane & Wafa, 2018)، هیچ ارتباطی بین مقادیر پلی فنل‌ها و ظرفیت‌های آنتی‌اکسیدان در دو گونه ارکیده دارویی *Orchis maculata* و *Ophrys subfusca* یافت نشده است. بر اساس نتایج ما، اندام گل‌آذین و برگ گیاه *O.simia* دارای میزان مناسبی از متابولیت ثانویه فنل کل بودند. نتایج بررسی خصوصیات فیتوشیمیایی عصاره متانولی *O.simia* مشخص کرد که بیشترین میزان فنل کل در گل‌آذین و بیشترین نوع اسید فنولیک از نوع اسید کافئیک و در گل‌آذین بود. ریگوسا و همکاران (Reigosa *et al.*, 2006) گزارش نمودند که نوع و میزان تولید ترکیبات فنلی وابسته به نوع گونه، اندام گیاهی و شدت تنش می‌باشد. بررسی‌ها نشان می‌دهد تولید ترکیبات فنلی در گیاهان بخشی از دفاع شیمیایی گیاه است که تحت کنترل عوامل محیطی و ژنتیکی قرار دارد. برای مثال هجوم علف‌خواران و حشرات به‌طورمعمول سنتز ترکیبات فنلی را توسط گیاهان افزایش می‌دهد (Sène *et al.*, 2001). با توجه به میزان بالای ترکیبات فنلی در مرحله فنولوژیکی گلدهی شاید بتوان این ترکیبات را به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی و ضد رادیکال‌های آزاد گیاهی به‌کار برد. ظرفیت به دام انداختن

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-05-09]
[DOI: 10.61186/jcb.16.2.53]

رادیکال‌های آزاد با استفاده از روشFRAP (۱۳۸-۹۳ میکرومول بر گرم) اندازه‌گیری گردید. در مطالعه‌ای، فنل کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدان ده گل در چین اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که گل‌ها منابع خوبی از فنول‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها هستند (Xiong *et al.*, 2014). همچنین، سایر محققان نشان داده‌اند که گل‌ها سرشار از ترکیبات فنلی و دارای فعالیت آنتی‌اکسیدان زیادی هستند که توانایی مهار برخی بیماری‌های مزمن را دارند .(Chen et al., 2015)

بررسی میزان ترکیبات فنولیک و فلاونوئیدها با HPLC

برای تعیین نوع و میزان فنولیک و فلاونوئیدها در اندام‌های گیاه ارکیده *Orchis simia* از HPLC استفاده شد. شناسایی هریک از ترکیبات فنلی با مقایسه زمان ماندگاری و مساحت پیک ترکیبات عصاره نمونه‌ها با استانداردها به‌دست آمد (شکل ۳). جدول ۲ نتایج غربالگری فیتوشیمیایی تمام عصاره‌های *O. simia* را نشان می‌دهد. برای بررسی ترکیبات فنولیک و فلاونوئید ۱۴ استاندارد استفاده شد (شکل ۴-A) که از میان آنها اسید گالیک، بنزوئیک اسید، کاتچین، اپی‌کاتچین، مایریستین، کلروژنیک اسید و اپی‌ژنین در هیچ‌یک از نمونه‌های برگ، ساقه و گل‌آذین مشاهده نشدند. ترکیبات فنولیک شناسایی شده در ارکیده سیمیا شامل بنزوئیک اسید، کافئیک اسید و ام-کوماریک اسید و همچنین فلاونوئیدهایی مانند روتین، لوتئولین، کامفرول، کوئرسیترین و کوئرستین بود (جدول ۲). بیشترین میزان ترکیبات فلاونوئید از نوع لوتئولین (۵۷/۲۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بوده که در گل‌آذین مشاهده شد. همچنین نتایج مندرج در شکل ۴ مشخص کرد که بیشترین میزان ترکیبات فنولیک شناسایی شده در عصاره‌ها از نوع کافئیک اسید به‌ترتیب در گل‌آذین (۳۱/۹۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و برگ (۳۰/۲۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بود درحالی‌که سایر اسیدهای فنولیک مانند بنزوئیک اسید در گل‌آذین و برگ کمتر بوده و در ساقه شناسایی نشد.



شکل ۳- میزان فنولیک و فلاونوئیدها در اندام‌های مورد مطالعه ارکیده *O.simia*

Figure 3. The amount of phenolics and flavonoids in the studied organs of *O. simia* orchid

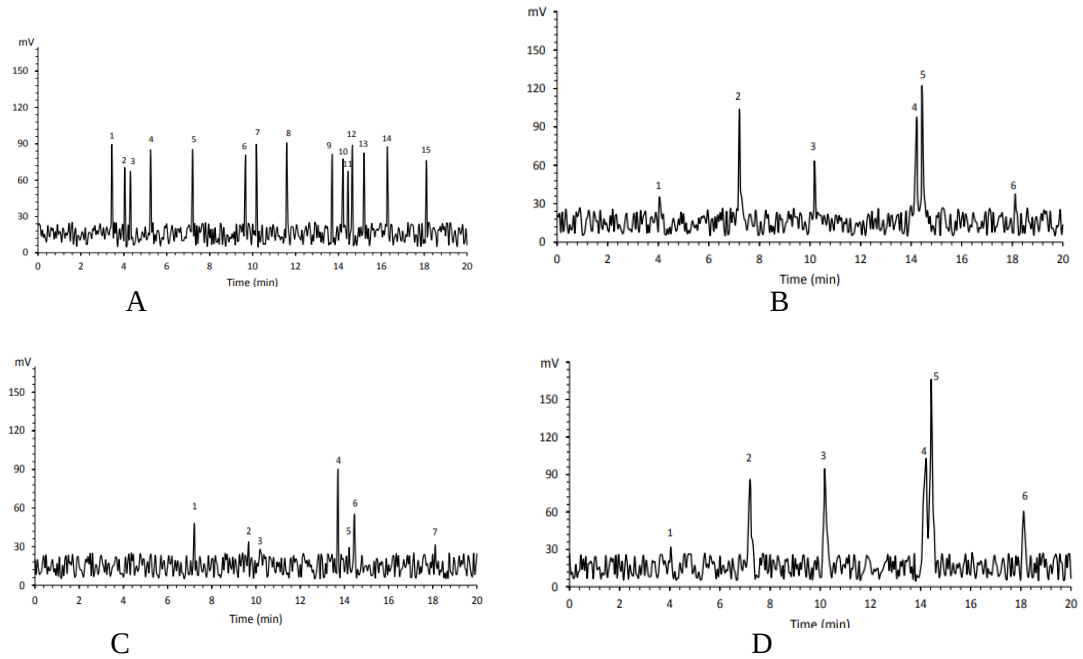
جدول ۲- ترکیبات فیتوشیمیایی ارکیده *O. simia*

Table 2. Phytochemical compounds of *O. simia* orchid

گل‌آذین Inflorescence	ساقه Steam	برگ Leaf	ترکیبات Composition	طبقه‌بندی Classification
0.824	1.408	0.882	Moscatilin	HPLC-Bibenzyl derivatives
0.689	1.112	0.541	Gigantol	
1.375	2.286	1.105	Chrysotoxin	
-	0.213	-	Crepidatin	
10.25953	-	11.2156	P-OH-Benzoic Acid	HPLC-Phenolics
31.94334	9.068685	30.29147	Caffeic acid	
26.87624	7.508567	18.03824	m-Coumaric acid	
24.12438	13.51096	29.20104	Rutin	HPLC- Flavonoid
57.2163	19.69724	42.04323	Luteolin	
17.92998	9.903305	11.0697	Kaempferol	
-	10.02787	-	Quercitrin	
-	26.65861	-	Quercetin	
30.54162	28.81631	13.53838	Cocsuline	LC-MS alkaloid
47.20074	-	19.31788	Tetrandrine	
-	-	10.23503	Isotetrandrine	
-	-	13.80927	Pheanthine	
-	-	6.701772	Dimethyltubocurarine	
-	-	5.017967	+)-thalmirabine	
-	-	8.875657	Thalidasine	
-	12.48599	-	Gyroamericine	
-	12.19949	-	Racemosidine C	
-	32.07862	-	Chondrofoline	
-	23.28683	-	Thalfoetidine	
29.01295	-	-	(+)-angchibangkine	
21.07054	-	-	(+)-12-O-methyltricordatine	
39.17771	-	-	Baluchistine	
42.77013	-	-	(+)-Tubocurarine chloride	
17.22919	-	-	Penduline	

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-05-09]

[DOI: 10.61186/jcb.16.2.53]



شکل ۴- کروماتوگرام فنولیک و فلاونوئیدها (A) ترکیبات استاندارد با غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۱) گالیک اسید؛ (۲) بنزوئیک اسید؛ (۳) کاتچین؛ (۴) اپی‌کاتچین؛ (۵) روتین؛ (۶) کوئرسیترین؛ (۷) ام- کوماریک اسید؛ (۸) مایریستین؛ (۹) کوئرستین؛ (۱۰) کافئیک اسید؛ (۱۱) لوتئولین؛ (۱۲) کلروژنیک اسید؛ (۱۳) اپی‌ژنین؛ (۱۴) کامفرول. (B) عصاره متانولی برگ ارکیده سیمیا، (C) ساقه ارکیده سیمیا و (D) گل ارکیده سیمیا.

Fig 4. HPLC Chromatograms of phenolics and flavonoids (A) Standard compounds at a concentration of 20 µg/ml (1) Gallic acid; (2) Benzoic Acid; (3) Catechin; (4) Epicatechin; (5) Rutin; (6) Quercitrin; (7) m-Coumaric acid; (8) Myricetin; (9) Quercetin; (10) Caffeic acid; (11) Luteolin; (12) Chlorogenic acid; (13) Apigenin; (14) Kaempferol. (B) The methanol extract from the of leaf of *O. simia*; (C) Stem of *O. simia*, and (D) Inflorescenc of *O. simia*.

احتمالاً فنولیک‌ها بزرگ‌ترین گروه متابولیت‌های ثانویه گیاهی را تشکیل می‌دهند. آنها حضور یک یا چند گروه فنل را به‌عنوان یک ویژگی مشترک دارند و از ساختارهای ساده با یک حلقه معطر تا مواد پلیمری بسیار پیچیده را شامل می‌شوند. آنها در گیاهانی که به‌طور قابل‌توجهی به رنگ و طعم بسیاری از گیاهان، غذاها و نوشیدنی‌ها کمک می‌کنند، به‌وفور هستند. برخی از فنل‌ها به‌دلیل فعالیت‌های ضدالتهابی مانند کوئرستین از نظر دارویی ارزشمند هستند. ویژگی مشترک همه فنل‌ها فعالیت ضد میکروبی است. در واقع، خود فنل اولین ضدعفونی کننده مورد استفاده در جراحی بود (Hussein & El-Anssary, 2019).

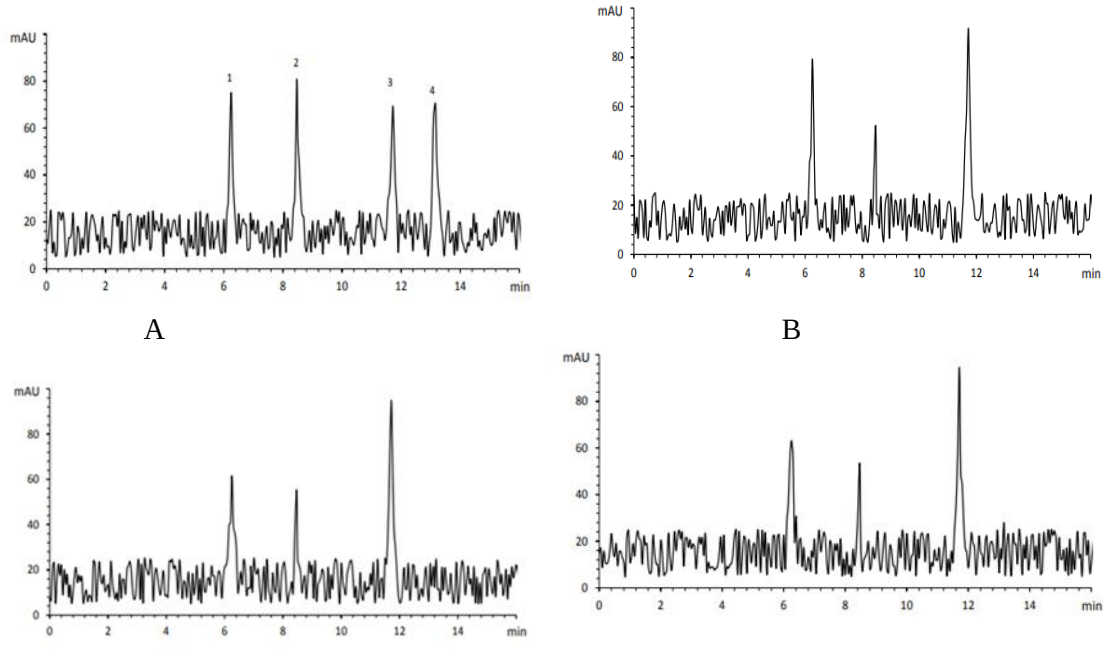
برای تعیین نوع و میزان اسید فنولیک در اندام‌های گیاه *O. simia* از HPLC استفاده شد (شکل ۴). HPLC روش انتخابی است و هنوز هم تکنیک جداسازی تحلیلی ایده‌آل است که معمولاً برای تجزیه و تحلیل کمی و کیفی محصولات طبیعی از نمونه‌های گیاهی خام یا فرآورده‌های گیاهی استفاده می‌شود (Steinmann & Ganzera, 2011).

بر اساس نتایج به‌دست آمده (جدول ۲) مشخص شد که بیشترین میزان اسید فنولیک شناسایی شده در عصاره‌ها از نوع اسید کافئیک بود درحالی‌که سایر اسیدهای فنولیک مانند بنزوئیک اسید کمتر بوده به‌طوری‌که این ترکیب در ساقه مشاهده نشد (شکل ۳). فراوان‌ترین فلاونوئیدها در ارکیده سیمیا از نوع لوتئولین (۵۷/۲۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در گل‌آذین بود. این در حالی است که در سایر گونه‌ها (*Dendrobium catenatum*) کوئرستین فراوان‌ترین فلاونوئید غذایی و به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی با خواص ضد حساسیت و ضد التهاب شناخته شده است. برخی از فلاونوئیدها ضد باکتری، ضد ویروس (علیه ویروس سرماخوردگی)، ضد حساسیت، ضد التهاب، ضد پلاکت و ضد نئوپلاستیک هستند (Liu, 2011). کوئرستین در گیاه *O.simia* فقط در ساقه و با میزان کمتری (۲۶/۶۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) شناسایی شد. با توجه به داده‌های مندرج در جدول ۲ و اهمیت ترکیبات فنلی، می‌توان دریافت اندام‌های برگ، ساقه و گل‌آذین *O.simia* از نظر ترکیبات فنولیک و فلاونوئیدها غنی بوده و می‌تواند در برنامه‌های استخراج مواد بیولوژیک به‌عنوان ترکیبات ضد میکروبی مورد استفاده قرار گیرد. در مطالعه‌ای توسط شاه رجبیان و سان (Shahrajabian & Sun, 2023)، کافئیک اسید و کامفرول به‌عنوان آنتی‌اکسیدان و کوماریک اسید، لوتئولین و کامفرول دارای خواص ضدویروسی و کوئرستین به‌عنوان ضد التهاب معرفی شدند.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-05-09]
[DOI: 10.61186/jcb.16.2.53]

بررسی مشتقات بی‌بنزیل با HPLC

برای تعیین محتویات مشتقات بی‌بنزیل (موسکاتیلین، گیگانتول، کرپیداتین، کریزوتوکسین)، در گونه *Orchis simia* سنجشی با استفاده از روشHPLC-UV با شرایط بهینه کمی‌سازی انجام شد. شرایط بهینه برای تعیین هر چهار ترکیب استاندارد، استفاده از یک شستشوی گرادیان بود که با ۲۰٪ استونیتریل در اسید استیک آبی ۱/۵٪ شروع شد و به‌تدریج طی ۳۰ دقیقه به ۳۲٪ استونیتریل افزایش یافت. سپس ستون با استونیتریل ۳۲ درصد به مدت ۳۰ دقیقه شستشو داده شد. نرخ جریان به ترتیب ۰/۸ و ۱ میلی‌لیتر در دقیقه برای ۳۰-۰ دقیقه و ۳۰-۶۰ دقیقه زمان اجرا بود. کروماتوگرام HPLC استانداردها در شکل ۵ (A) نشان داده شده است. زمان ماندگاری 6.25، 8.47، 11.71، 13.16 دقیقه به‌ترتیب برای moscatilin (1)، Gigantol (2)، Chrysotoxin (3) و Crepidatin (4) بود. سپس با تزریق عصاره استونیتریلی عصاره گیاهی برگ، ساقه و گل‌آذین به‌طور مجزا و مقایسه زمان بازداری آنها با نمونه استاندارد، زمان خروج این مواد از ستون و پیک مربوط به آنها تعیین شد. (شکل ۵) نتایج مندرج در جدول ۲ مشخص کرد که بیشترین میزان ترکیبات فرار شناسایی شده در عصاره‌ها از نوع Chrysotoxin بود درحالی‌که سایر ترکیبات فرار مانند Crepidatin در ساقه و برگ بسیار ناچیز و در گل‌آذین شناسایی نشد. همچنین ترکیبات Gigantol و Moscatilin به‌میزان کمتری به‌دست آمد.



شکل ۵- کروماتوگرام مشتقات بی‌بنزیل (A) ترکیبات استاندارد با غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۱) موسکاتیلین؛ (۲) گیگانتول؛ (۳) کریزوتوکسین؛ (۴) کریپیداتین. (B) عصاره متانولی برگ ارکیده سیمیا، (C) ساقه ارکیده سیمیا و (D) گل‌آذین ارکیده سیمیا.

Fig. 5. HPLC Chromatograms of Bibenzyl derivatives (A) Standard compounds at a concentration of 20 µg/ml of (1) moscatilin; (2) Gigantol; (3) Chrysotoxin; (4) Crepidatin. (B) The methanol extract from the of leaf of *O. simia*; (C) Stem of *O. simia*, and (D) Inflorescenc of *O. simia*.

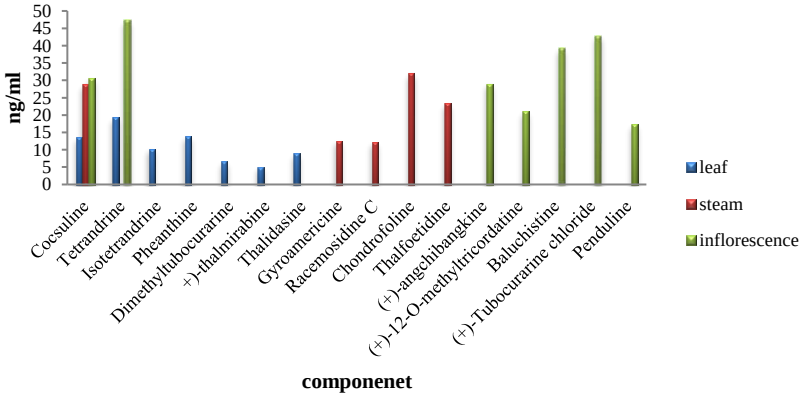
نتایج نشان داد از بین نمونه‌های برگ، ساقه و گل‌آذین *O. simia*، ساقه آن دارای بالاترین میزان مشتقات بی‌بنزیل است و کروماتوگرام در شکل ۵ (C) نشان داده شده است. بیشترین میزان مشتقات بی‌بنزیل از نوع Chrysotoxin (۲/۲۸۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر) می‌باشد. همچنین در این بررسی، ترکیبات مشتقات بی‌بنزیل از جمله moscatilin و Gigantol در ساقه ارکیده سیمیا شناسایی شد. در بررسی پروفایل شیمیایی گونه ارکیده *Dendrobium chrysotoxum* توسط جی و همکاران (Jie *et al.*, 2023) Chrysotoxin، moscatilin و gigantol از ترکیبات اصلی شناسایی شده بود. انواع گونه‌های ارکیده به‌صورت تجاری برای تولید محصولات دارویی استفاده می‌شوند (Gantait *et al.*, 2021; Pant, 2013; Singh *et al.*, 2012; Teoh, 2016). این خانواده تعدادی مواد شیمیایی امیدوارکننده تولید کرده است. آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، فنانترن‌ها، ترپنوئیدها، مشتقات بی‌بنزیل و سایر مواد شیمیایی فعال فیزیولوژیکی در ارکیده‌ها یافت شده‌اند (Singh *et al.*, 2012). مطالعات فارماکولوژیک نشان داده است که موسکاتیلین دارای فعالیت ضد جهش‌زایی

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-05-09]
[DOI: 10.61186/jcb.16.2.53]

در سلول‌های سرطان روده بزرگ انسان است و فعالیت ضد رگ‌زایی در آزمایشات *in vitro* و *in vivo* مشاهده شد (Tsai *et al.*, 2010). همچنین ترکیبات بی‌بنزیل مانند موسکاتیلین و گیگانتول فعالیت ضد مهاجرتی از خود نشان می‌دهند و می‌توانند تشکیل فیلوپودیا در سلول‌های سرطانی ریه را مهار کنند (Charoenrungruang *et al.*, 2014؛ Tsai *et al.*, 2010). بنابراین، طبق آزمایشات گزارش شده، ساقه *O. simia* منبع بالقوه مشتقات بی‌بنزیل است و می‌تواند در مطالعات فارماکولوژیک و همچنین در پژوهش‌های به‌نژادی به‌عنوان گیاه دارویی مفید، مورد بررسی قرار گیرد.

بررسی میزان آلکالوئیدها با LC–MS

استفاده از LC-MS (liquid chromatography-mass spectrometry) شناسایی ۱۶ ترکیب آلکالوئید در اندام‌های مورد مطالعه گیاه *O. simia* را امکان‌پذیر کرد. محتویات آلکالوئید در هر یک از نمونه‌های برگ، ساقه و گل‌آذین متفاوت بود. کوکسولین، ترکیب مشترک در تمامی اندام‌های مورد مطالعه بود و بیشترین مقدار این ترکیب در گل‌آذین (۳۰/۵۴) و سپس در ساقه (۲۸/۸۱) رؤیت شد. همچنین تتراندرین، ترکیب مشترک گل‌آذین و برگ بود که بیشترین مقدار آن در گل‌آذین (۴۷/۲۰) مشاهده شد. سایر ترکیبات مختص هر اندام بود. (شکل ۶). در مطالعه حاضر، تجزیه و تحلیل فیتوشیمیایی کیفی وجود آلکالوئیدها، فنولیک‌ها، فلاونوئیدها و مشتقات بی‌بنزیل را نشان داد (جدول ۲).



شکل ۶- میزان الکالوئیدها در اندام‌های برگ، ساقه و گل‌اذین ارکیده *O.simia*

Figure 6. The amount of alkaloids in leaves, stems and inflorescences of *O. simia* orchid.

آلکالوئیدها مولکول‌های هتروسیکلیک آلی نیتروژنی هستند که اثرات دارویی بر روی انسان و سایر حیوانات دارند. در ارکیده‌ها، ۲۱۴ گونه در ۶۴ جنس حاوی ۰/۱٪ یا بیشتر آلکالوئیدها هستند (Singh *et al.*, 2012). در این پژوهش ۱۶ ترکیب آلکالوئید شناسایی شد که هرکدام مختص هر اندام بود. بیشترین میزان آلکالوئید در گونه *O. simia* در گل‌آذین مشاهده شد. در مطالعه یک آلکالوئید از عصاره گل *Quisqualis indica* (Rout *et al.*, 2021) مشخص شد که آلکالوئید عصاره گل، فعالیت‌های ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی بالقوه‌ای را نشان داده‌اند. در واقع عصاره گل، به‌دلیل بهبود محتوای آلکالوئید برای هم‌افزایی بین ترپنوئیدها و بنزوئیدها در مقایسه با آلکالوئید کمتر، فعالیت‌های ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی قابل‌توجهی نشان داده است. به‌طورکلی، ارکیده‌های دارویی، تحت بررسی‌های دقیق فارماکولوژیک قرار نگرفته‌اند. طیف گسترده‌ای از ترکیبات شیمیایی شامل آلکالوئیدها، مشتقات بی‌بنزیل، فلاونوئیدها، فنانترن‌ها و ترپنوئیدها ارائه شده که اخیراً از برخی گونه‌ها جدا شده است. عصاره‌ها و متابولیت‌های این گیاهان، به‌ویژه آن‌هایی که از گل‌ها و برگ‌ها هستند، دارای فعالیت‌های دارویی مفیدی هستند (Gutiérrez, 2010). در پژوهش ما نیز بیشترین مواد مؤثره آلکالوئیدها از جمله Cocsuline، (+)- Tubocurarine chloride، Tetrandrine، Baluchistine و (+)-angchibangkine در گل‌ها و برگ‌ها شناسایی شد. به‌همین ترتیب بیشترین میزان فنولیک و فلاونوئیدها در گل‌آذین رؤیت شد. در بررسی فلاونوئیدهای گل‌های گل صدتومانی، ۲۶ فلاونوئید با روش (HPLC-ESI-MS) شناسایی شد. بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و محتوای پلی‌فنل کل (تعیین شده با روش Folin- Ciocalteu) و محتوای کل کوئرستین، کامفرول و گلیکوزیدهای لوتئولین همبستگی معنی‌داری وجود داشت (Li et al., 2009). فنولیک‌ها دارای فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی *in vitro* و *in vivo* قوی هستند که با توانایی آنها در از بین بردن رادیکال‌های آزاد، شکستن واکنش‌های زنجیره‌ای رادیکال و کلات کردن فلزات مرتبط است (Chen *et al.*, 2015).

فیتوشیمیایی‌ها ترکیبات شیمیایی غیرمغذی گیاهان هستند که به‌طور طبیعی در آنها وجود دارند، یعنی مواد شیمیایی که از

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-05-09]
[DOI: 10.61186/jcb.16.2.53]

گیاهان به‌دست می‌آیند، فیتوشیمیایی نامیده می‌شوند. ترکیبات شیمیایی اصلی گزارش شده از گونه‌های ارکیده عبارت‌اند از: آلکالوئیدها، ترپنوئیدها، فلاونوئیدها، تانن‌ها، مشتقات بی‌بنزیل، فنانترن‌ها و استیل‌بنوئیدها. وجود این فیتوشیمیایی‌ها فعالیت‌های ضدمیکروبی، ضدتوموری، ضدالتهابی، ضدویروسی و غیره را فراهم می‌کند (Lalrosangpuii, 2021). در مطالعه ترکیبات ارکیده سیمیا، ترکیبات آلکالوئید، فلاونوئید و مشتقات بی‌بنزیل به‌عنوان اصلی‌ترین ترکیبات این گونه شناسایی شدند.

نتیجه‌گیری کلی

گیاه ارکیده گونه سیمیا منبع غنی از متابولیت‌های ثانویه است که می‌تواند مورد استفاده دارویی قرار گیرند. بر اساس نتایج حاصل از پژوهش حاضر، گل‌آذین این گیاه منبع بالقوه ظرفیت آنتی‌اکسیدان و فنل و آلکالوئید است که نقش دارویی مهمی خواهد داشت. متابولیت‌های به‌دست‌آمده از این گیاه برای اولین بار گزارش می‌شوند و برای پیشرفت‌ها و کاربردهای دارویی جدید مفید خواهند بود. بنابراین، تحقیقات آینده برای توسعه ترکیبات زیست فعال خالص شده از ارکیده سیمیا با استفاده از تکنیک‌های استخراج انتخابی‌تر موردنیاز خواهد بود.

References

Akhter, S., Rahman, M. A., Aklima, J., Hasan, M. R., & Hasan Chowdhury, J. (2015). Antioxidative role of Hatikana (Leea macrophylla Roxb.) partially improves the hepatic damage induced by CCl 4 in Wistar Albino rats. *BioMed Research International*, *2015*.

Al-Snafi, A. E. (2020). Pharmacological potential of Orchis mascula-A review. *IOSR Journal of Pharmacy*, *10*(3), 1-6.

Ani, V., Varadaraj, M., & Naidu, K. A. (2006). Antioxidant and antibacterial activities of polyphenolic compounds from bitter cumin (Cuminum nigrum L.). *European Food Research and Technology*, *224*, 109-115.

Arora, M., Mahajan, A., & Sembi, J. K. (2017). A review on phytochemical and pharmacological potential of family Orchidaceae. *International Research Journal of Pharmacy*, *8*(10), 9-24.

Azizyan, R., & Abdollahi Mandoulakani, B. (2023). The Effect of Drought Stress on Some Morphological, Phytochemical, and Biochemical Characteristics of the Medicinal Plant Field Sowthistle (Sonchus arvensis L.). *Journal of Crop Breeding*, *15*(47), 41-55.

Charoenrungruang, S., Chanvorachote, P., Sritularak, B., & Pongrakhananon, V. (2014). Gigantol, a bibenzyl from Dendrobium draconis, inhibits the migratory behavior of non-small cell lung cancer cells. *Journal of Natural Products*, *77*(6), 1359-1366.

Chen, G-.L., Chen, S.-G., Xie, Y.-Q., Chen, F., Zhao, Y.-Y., Luo, C.-X., & Gao, Y.-Q. (2015). Total phenolic, flavonoid and antioxidant activity of 23 edible flowers subjected to in vitro digestion. *Journal of Functional Foods*, *17*, 243-259.

Chen, T.-H., Pan, S-.L., Guh, J.-H., Chen, C.-C., Huang, Y.-T., Pai, H.-C., & Teng, C.-M. (2008). Denbinobin induces apoptosis by apoptosis-inducing factor releasing and DNA damage in human colorectal cancer HCT-116 cells. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, *378* ,447-457.

Chen, T.-H., Pan, S.-L., Guh, J.-H., Liao, C.-H., Huang, D.-Y., Chen, C.-C., & Teng, C.-M. (2008). Moscatilin induces apoptosis in human colorectal cancer cells: a crucial role of c-Jun NH2-terminal protein kinase activation caused by tubulin depolymerization and DNA damage. *Clinical Cancer Research*, *14*(13), 4250-4258.

Choonong, R., Sermpradit, W., Kitisripanya, T., Sritularak, B., & Putalun, W. (2019). The contents of bibenzyl derivatives, flavonoids and a phenanthrene in selected Dendrobium spp. and the correlation with their antioxidant activity. *ScienceAsia*, *45*(3), 245-252.

Dawande, V., & Gurav, R. (2021). Qualitative analysis of phytochemical in Eulophia nuda using LCMS. *Journal of Medicinal Plants Studies*, *9*(3), 136-140.

Fan, C., Wang ,W., Wang, Y., Qin, G., & Zhao, W. (2001). Chemical constituents from Dendrobium densiflorum. *Phytochemistry*, *57*(8), 1255-1258.

Friederich, S., Maier, U. H., Deus-Neumann, B., Asakawa, Y., & Zenk, M. H. (1999). Biosynthesis of cyclic bis (bibenzyls) in Marchantia polymorpha. *Phytochemistry*, *50*(4), 589-598.

Gantait, S., Das, A., Mitra, M., & Chen, J.-T. (2021). Secondary metabolites in orchids: Biosynthesis, medicinal uses, and biotechnology. *South African Journal of Botany*, *139*, 338-351.

Ghai, D., Kaur ,A., Kahlon, P. S., Pawar, S. V., & Sembi, J. K. (2022). A walk through the maze of secondary metabolism in orchids: a transcriptomic approach. *Frontiers in Plant Science*, *13*, 837563.

Gutiérrez, R. M. P. (2010). Orchids: A review of uses in traditional medicine, its phytochemistry and pharmacology. *J. Med. Plants Res*, *4*(8), 592-638.

Hossain, M. M. (2011). Therapeutic orchids: traditional uses and recent advances—an overview. *Fitoterapia*, *82*(2), 102-140.

Hossen, M. A., Reza, A. A., Ahmed, A. A., Islam ,M. K., Jahan, I., Hossain, R., Rahman, M. A. (2021). Pretreatment of Blumea lacera leaves ameliorate acute ulcer and oxidative stress in ethanol-induced

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-05-09]

[DOI: 10.61186/jcb.16.2.53]

Long-Evan rat: A combined experimental and chemico-biological interaction. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *135*, 111211.

Hürkan, K., Yüksel, M. B., Hürkan, Y. K., & Demir, N. (2019). Determination of total phenolic and flavonoid contents, antioxidant and antimicrobial activities of some important salep orchids. *Eskişehir Teknik Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi-C Yaşam Bilimleri Ve Biyoteknoloji*, *8(2)*, 191-202.

Hussein, R. A., & El-Anssary, A. A. (2019). Plants secondary metabolites: the key drivers of the pharmacological actions of medicinal plants. *Herbal medicine*, *1*(3).

Jagannath, S., Konappa, N., Lokesh, A., Dasegowda, T., Udayashankar, A. C., Chowdappa, S., . . . Jogaiah, S. (2021). Bioactive compounds guided diversity of endophytic fungi from Baliospermum montanum and their potential extracellular enzymes. *Analytical biochemistry*, *614*, 114024.

Jie, X., Feng, Y., Jiahao, F., Ganggui, L., Jiani, Y., Zhongyu, X., Zongsuo, L. (2023). Comprehensive chemical profiling of two Dendrobium species and identification of anti-hepatoma active constituents from Dendrobium chrysotoxum by network pharmacology. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, *23*(1), 217.

Konappa, N., Udayashankar, A. C., Krishnamurthy, S., Pradeep, C. K., Chowdappa, S., & Jogaiah, S. (2020). GC–MS analysis of phytoconstituents from Amomum nilgiricum and molecular docking interactions of bioactive serverogenin acetate with target proteins. *Scientific reports*, *10*(1), 16438.

Kumar, B. R. (2017). Application of HPLC and ESI-MS techniques in the analysis of phenolic acids and flavonoids from green leafy vegetables (GLVs .(*Journal of pharmaceutical analysis*, *7*(6), 349-364.

Lalrosangpuii, L. (2021). A review on the phytochemical properties of five selected genera of orchids. *Sci Vision*, *2*, 50-58.

Lee, H.-Y., Kumar, S., Lin, T.-C., & Liou, J.-P. (2016). Total synthesis of denbinobin. *Journal of Natural Products*, *79*(4), 1170-1173.

Li, C., Du, H., Wang, L., Shu, Q., Zheng, Y., Xu, Y., Ge, Y. (2009). Flavonoid composition and antioxidant activity of tree peony (Paeonia section Moutan) yellow flowers. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(18), 8496-8503.

Liu, W. J. (2011). *Traditional herbal medicine research methods: identification, analysis, bioassay, and pharmaceutical and clinical studies*. John Wiley & Sons.

Lollinger, J. (1981). Free radicals and food additives. *by Taylor and Francis, London*, 121.

Pant, B. (2013). Medicinal orchids and their uses: Tissue culture a potential alternative for conservation. *African Journal of plant science*, *7*(10), 448-467.

Pourmorad, F., Hosseinimehr, S., & Shahabimajd, N.(2006) .Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African journal of biotechnology*, *5(*11).

Reigosa, M. J., Pedrol, N., & González, L. (2006). *Allelopathy: a physiological process with ecological implications*. Springer Science & Business Media.

Rout, P. K., Kumar, P., Rao, Y. R., Kumar, A., Bawankule, D. U., Singh, R., Naik, S. (2021). A quinoline alkaloid rich Quisqualis indica floral extract enhances the bioactivity. *Natural Product Research*, *3*,5(10), 1632-1638.

Sène, M., Doré, T., & Gallet, C. (2001). Relationships between biomass and phenolic production in grain sorghum grown under different conditions. *Agronomy Journal*, *93*(1), 49-54.

Singh, S., Singh, A. K., Kumar, S., Kumar, M., Pandey, P .K., & Singh, M. C. K. (2012). Medicinal properties and uses of orchids: a concise review. *Elixir Applied Botany*, *52*(2012), 11627-11634.

Slinkard, K., & Singleton, V. L. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American journal of enology and viticulture*, *28*(1), 49-55.

Sofiane, G., & Wafa, N. (2018). In Vitro Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities Valorisation of Methanol Extracts of Orchis maculata L. subsp baborica M. Et W and Ophrys subfusca (Rchb.) Batt. *Sciences (IRJPMS)*, *1*(3), 22-25.

Sohag, S. I., Hoque, M. M., & Huda, M. K. (2017). Phytochemical screening and antioxidant activity of rare medicinal orchid Luisia zeylanica Lindl. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, *6*(4), 688-692.

Štajner, D., Popović, B. M., Čanadanović-Brunet, J., & Anačkov, G. (2009). Exploring Equisetum arvense L., Equisetum ramosissimum L. and Equisetum telmateia L. as sources of natural antioxidants. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, *23*(4), 546-550.

Steinmann, D., & Ganzera, M. (2011). Recent advances on HPLC/MS in medicinal plant analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *55*(4), 744-757.

Talebi, F., Akbarpour, V., & Chalavi, V. (2022). Effect of methanol and titanium dioxide nanoparticles on phytochemical properties of artichoke (Cynara scolymus L.). *Journal of Crop Breeding*, *14*(43), 84-94.

Teoh, E. S. (2016). Secondary metabolites of plants. *Medicinal orchids of Asia*, 59-73.

Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Byrne, D. H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of food composition and analysis*, *19*(6-7), 669-675.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-05-09]

[DOI: 10.61186/jcb.16.2.53]

Thakur, M., Bhattacharya, S., Khosla, P. K., & Puri, S. (2019). Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 12, 1-12.

Tsai, A.-C., Pan, S.-L., Liao, C.-H., Guh, J.-H., Wang, S.-W., Sun, H.-L., Chang, Y.-L. (2010). Moscatilin, a bibenzyl derivative from the India orchid Dendrobrium loddigesii, suppresses tumor angiogenesis and growth in vitro and in vivo. *Cancer Letters*, *292*(2), 163-170.

Uddin, M. J., Ali Reza, A., Abdullah-Al-Mamun, M., Kabir, M. S., Nasrin, M. S., Akhter, S., Rahman, M. A. (2018). Antinociceptive and anxiolytic and sedative effects of methanol extract of Anisomeles indica: an experimental assessment in mice and computer aided models. *Frontiers in pharmacology*, *9*, 246.

Yang, J.-H., Lin, H.-C., & Mau, J.-L. (2002). Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food chemistry*, *77*(2), 229-235.

Zorzi, G., Gambini, S., Negri, S ,Guzzo, F., & Commisso, M. (2023). Untargeted Metabolomics Analysis of the Orchid Species Oncidium sotoanum Reveals the Presence of Rare Bioactive C-Diglycosylated Chrysin Derivatives. *Plants*, 12(3), 655.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-05-09]

[DOI: 10.61186/jcb.16.2.53]