تعيين الخصائص المضادة للتأكسد لمستخلصات ثمار نبات *Vitex agnus-castus* L. وأزهاره المزروع والبري

فاتن السقا* **د. فرانسوا قره بت****

د. منال داغستاني***

الملخص

عُيّنت الفينولات والفلافونوئيدات الكلية، والقدرة على تثبيط الجذر الحر 2،2- ثنائي فينيل -1- بيكريل هيدرازيل (DPPH) في المستخلص الإيتانولي لثمار نبات *Vitex agnus-castus* L. (VAC) وأزهاره المزروع والبري. بّينت النتائج أن تركيز الفينولات الكلية لمستخلصات ثمار VAC المزروع والبري كانت أعلى منها في أزهار النبات، ولم يكن هناك فرق معنوي في محتوى الفينولات الكلية بين المستخلصات المزروعة والبرية. أوضحت الدراسة أيضاً عدم وجود فرق معنوي بين مستخلصات الثمار والأزهار المزروعة والبرية في محتوى الفلافونوئيدات الكلية. كانت القدرة على تثبيط الجذور الحرة لمستخلص ثمار النبات البري وأزهاره أعلى منها في النبات المزروع. ممّا يسمح باستخدام مستخلصات ثمار نبات VAC وأزهاره كمضادات تأكسد طبيعية.

الكلمات المفتاحية: *Vitex agnus-castus* L.، الخصائص المضادة للتأكسد، الفينولات الكلية، الفلافونوئيدات الكلية، DPPH

* طالبة دكتوراه، قسم الكيمياء، كلية العلوم، جامعة دمشق، سورية.

** أستاذ مساعد دكتور، قسم الكيمياء، كلية العلوم، جامعة دمشق، سورية.

*** مدرسة، قسم الكيمياء، كلية العلوم، جامعة دمشق، سورية.

Determination of the antioxidant properties of cultivated and wild *Vitex agnus-castus* L. fruits and flowers extracts

Faten Al Saka[*] **Dr. Francois Karabet**[**]

Dr. Manal Daghestani[***]

Abstract

Total phenolics and flavonoids, the scavenging effect on 2.2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) were determined in ethanolic extract of both cultivated and wild *Vitex agnus-castus* L. (VAC) fruits and flowers. The results showed that the concentration of total phenolics VAC cultivated and wild fruits extracts was higher than flowers, and there was no significant difference in total phenolics between cultivated and wild extracts. The study also found that no significant difference between the extracts of cultivated and wild fruits or flowers in total flavonoids. The scavenging effect on DPPH radical of the wild fruits and flowers VAC extracts were higher than the cultivated one. This allows using the fruits and flowers of VAC extracts as natural antioxidants.

Key words: *Vitex agnus-castus* L., Antioxidant properties, Total phenols, Total flavonoids, DPPH.

[*] PhD., Student, Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria.

[**] Assistant Professor, Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria.

[***] Doctor, Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria.

المقدمة:

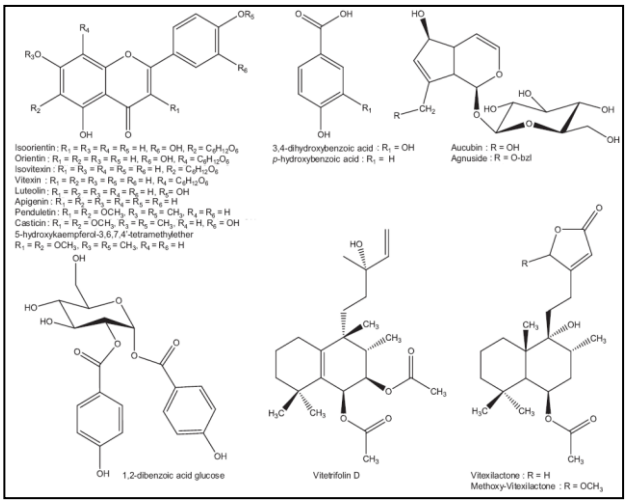
برهنت الطبيعة على أنها أغنى مصدر للتنوع البيولوجي والكيميائي خاصة في مناطق حوض البحر الأبيض المتوسط، ذلك لتوافر المقومات الأساسية التي تساعد على زراعة النباتات الطبية والعطرية. وازداد الاهتمام في الوقت الحاضر بالنباتات الطبية وزراعتها بغية استخدامها كمصدر للحصول على مواد فعالة ذات تطبيقات مختلفة (طبية وبيئية وصناعية) وتجنب التأثيرات الجانبية الكيميائية للمواد الصنعية.

ينتمي نبات *Vitex agnus-castus* L. (VAC) إلى الفصيلة الأرثدية أو الفيربينية (Verbenaceae) وفقاً للتصنيف الكلاسيكي، وإلى الفصيلة (Lamiaceae) وفقاً للتصنيف حسب تطور السلالات. ويعرف هذا النبات بعدة أسماء أخرى كشجرة العفة وشجرة إبراهيم وكف مريم وغيرها (Eng. Chaste tree ,Fr. le Gattilier) وهو جنبات أو شجيرات يصل ارتفاعها إلى 6m، ذات أوراق مركبة كفية متقابلة متساقطة طويلة المعلاق، لونها أخضر داكن وأزهارها بنفسجية. أما ثمارها نووية كروية وتكون محمرة سوداء اللون عند النضج. تزهر من حزيران إلى أيلول، تعدّ دول البحر الأبيض المتوسط موطناً لهذا النبات، ينتشر هذا النبات في البيئات الرطبة وعلى جوانب المجاري المائية الساحلية، ويزرع لأغراض الزينة في عدد من البلدان (الحكيم وزملاؤه 2012).

الشكل (1) أوراق نبات الـ VAC وأزهاره وثماره

يحتوي على متعددات الفينول ومشتقاتها والفلافونوئيدات والتانينات والغليكوزيدات وثنائيات التربين وغيرها من المركبات (Sağlam *et al*., 2007; Mari *et al*., 2012)، ويبيّن الشكل (2) صيغ بعض هذه المركبات (Högner *et al*., 2013).

أظهرت الدراسات المرجعية لهذا النبات تنوع مجالات تطبيقاته الصناعية (الصيدلانية، والبيئية، اولزراعية، والغذائية،...) اذ تميزت خلاصته الميتانولية بفعالية قوية كمضاد لفطر *Pythium ultimum* في الطماطم (Švecová *et al*., 2013). ومن جهة أخرى، بينت الدراسة التي أجراها (Hajdú *et al*., 2007)، فعالية مستخلصات نبات الـVAC كمضاد تأكسد بديل عن مضادات التأكسد الصنعية، وذلك بفضل محتواها من الفلافونوئيدات. استخدمت ثماره في الطب البديل لعلاج أعراض ما قبل الطمث عند الإناث (متلازمة ما قبل الحيض Premenstrual Stress Syndrome PMS)، (Högner *et al*., 2013). كما استخدم في علاج مرضى سرطان القولون، وفي التخفيف من الآثار الجانبية للأدوية المضادة للسرطان ،وذلك بفضل احتواء ثماره على الفلافونوئيدات (Imai *et al*., 2009). وتبيّن نتيجة بحث (Azam *et al*., 2012) امتلاك خلاصة النبات الميتانولية فعلاً مضاداً للتشنج. كما أظهرت دراسة (Nasri *et al*., 2013) على مستخلص نظامي الهكسان لثمار النبات تأثيراً مضاداً للالتهاب.



الشكل (2) صيغ بعض المركبات الفينولية والفلافونوئيدية في نبات الـ VAC

هدف البحث:

تعيين محتوى الفينولات والفلافونوئيدات الكلية والقدرة على تثبيط الجذور الحرة لمستخلصات ثمار نبات VAC وأزهاره السوري المزروع والبري بهدف الافادة من هذه المستخلصات كمضادات تأكسد.

مواد البحث وطرائقه:

جمع النبات: جُمع النبات المزروع من حديقة تشرين في مدينة دمشق/سورية في شهر تموز، 2014 أمّا النبات البري فجمع من محيط بحيرة 16 تشرين (حوض النهر الكبير الشمالي) في مدينة اللاذقية/سورية في شهر آب، 2014. جفف النبات في الظل بعيداً عن الشمس. صنف أ.د. أنور الخطيب النبات المزروع في حين صنف أ.د. عدنان نظام النبات البري بالاعتماد على صفات النبات الواردة في الفلورا السورية وأطلس النباتات الطبية والعطرية في الوطن العربي (الحكيم وزملاؤه 2012).

المواد الكيميائية:

الجدول (1) المواد الكيميائية المستخدمة في البحث

المادة	النقاوة	الشركة
إيتانول	(GC) 99.5%	Fluka
كربونات الصوديوم اللامائية	99.5%	Qualikems
كلوريد الألمنيوم المائية	99%	Riedel-de Haën
حمض الغاليك	97.5-102.5%	Sigma
كيرستين	98%(HPLC)	Sigma
خلات البوتاسيوم	99-101%	Riedel-de Haën
كاشف فولين– سيوكالتو	Sigma	
DPPH	Sigma	

الأجهزة: خلاط صغير دائري (Vortex) MS1 Minishaker (KAI)، حمام مائي يعمل بالأمواج فوق صوتية نموذج Transsonic 460/H (Elma)، جهاز الامتصاص في مجال الأشعة فوق البنفسجية والمرئية UV-VIS نموذج (Optizen 2120UV PLUS)، جهاز تقطير الماء (Fine Tech).

تحضير المستخلصات:

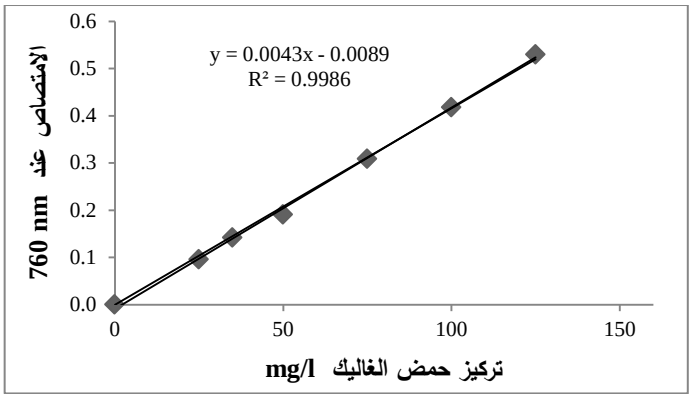
وزن 1.00g من ثمار نبات VAC المزروع والبري الجافة والمطحونة وأزهاره وأضيف إليها 20ml إيتانول 70%، اختير الإيتانول 70% كونه آمناَ صحياً وصديقاً للبيئة فضلاً عن أنّه أبدى فعالية عالية في استخلاص مضادات الأكسدة (الحلبي وزملاؤها 2014)، حُركت جيداً بواسطة خلاط دائري، ثم استخلصت باستخدام جهاز الأمواج فوق الصوتية عند درجة الحرارة (60±2)°C مدة نصف ساعة، فلترت المستخلصات بفلاتر (0.45µm)، وحفظت في الدرجة (5°C−). كررت عملية الاستخلاص ثلاث مرات.

أجريت تجارب استعادة للمركبات الفينولية نسبة الى حمض الغاليك باستخلاص كمية معيارية منه (75PPM) مع وبدون مسحوق النبات الجاف ومن دونه بالطرقة المتبعة أعلاه نفسها، أيضاً أجريت تجارب استعادة للفلافونويدات نسبة للكيرستين باستخلاص كمية معيارية منه (50PPM) مع مسحوق النبات الجاف ومن دونه، بهدف التحقق من كفاءة الاستخلاص ودقته، وكررت كل تجربة ثلاث مرات.

تعيين الخصائص المضادّة للتأكسد لثمار نبات VAC المزروع والبري وأزهاره:

- **تعيين الفينولات الكلية**

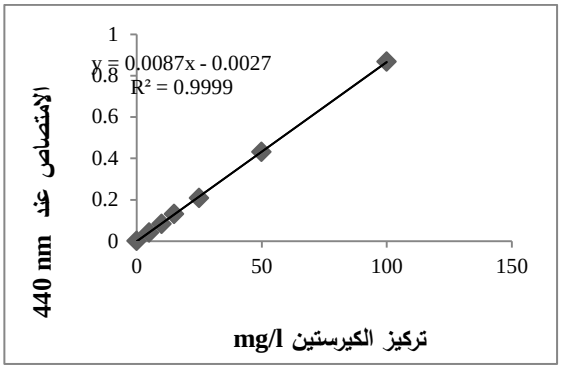
تستخدم طريقة فولين لتعيين الفينولات الكلية، اذ تُرجع الفينولات حمض فوسفو موليبدات التنغستين في وسط قلوي فينتج عنه محلول أزرق اللون يقاس امتصاصه عند طول موجة 760nm، حيث تحدث سلسلة من تفاعلات الإرجاع بانتقال إلكترون أو اثنين من الفينولات تؤدي إلى تشكيل معقدات زرقاء اللون تضم الشرسبة $(PMoW_{11}O_{40})^{4-}$ (Singleton *et al*., 1999). وضع 1000µl من العينة الممددة بالإيتانول 70% مع 4.8ml ماء منزوع الشوارد و4ml كربونات الصوديوم اللامائية (2%w/v) و200µl من كاشف فولين– سيوكالتو، مزجت جيداً ثم تركت في مكان مظلم عند درجة حرارة الغرفة مدة ساعة قيست الامتصاصية عند 760nm بالمقارنة بعينة شاهدة (AlHafez *et al*., 2014; Shaghaghi *et al*., 2008). عينت الفينولات الكلية بدلالة منحنى عياري خطي لحمض الغاليك (Gallic acid) في الإيتانول 70% بعدة تراكيز 0-125 mg\l، كما يبيّن الشكل (3)، وقدرت النتائج بمكافئات من حمض الغاليك لـ1g لمسحوق النبات الجاف.



الشكل (3) السلسلة العيارية لحمض الغاليك

- **تعيين محتوى الفلافونوئيدات الكلية**

تعيّن الفلافونوئيدات باستخدام طريقة لونية تعتمد على تشكيل معقد أصفر اللون مع كلوريد الألمنيوم. أخذ 1000µl من العينة الممددة بالإيتانول 70% وأضيف إليه 3ml من الإيتانول 99.5% و200µl من محلول كلوريد الألمنيوم (10%w/v) و200µl من محلول خلات البوتاسيوم (1M)، ومن ثم 5.6ml ماء منزوع الشوارد، مزجت المحاليل وتركت في مكان مظلم في درجة حرارة الغرفة مدة 40min. قيست الامتصاصية بالمقارنة بعينة شاهدة عند 440nm (Shaghaghi *et al*., 2009 *et* AlHafez *al*., 2014;). عين محتوى الفلافونوئيدات الكلي بالاعتماد على سلسلة معيارية من الكيرستين (Quercetin) في الإيتانول 70% محضرة بالطريقة السابقة نفسها ضمن المجال 0-100 mg\l، كما يوضّح الشكل (4)، وتم التعبير عن تراكيز الفلافونوئيدات كمكافئات للكيرستين لكل غرام من النبات الجاف.



الشكل (4) السلسلة العيارية للكيرستين

- **تعيين القدرة على تثبيط الجذور الحرة**

تدرس الخصائص المضادة للتأكسد للنباتات عامة والنباتات الطبية والعطرية خاصة لتعيين فعاليتها الطبية في الحماية من السرطان وأمراض القلب وغيرها، بسبب قدرتها على تثبيط الجذور الحرة المسببة لعدد من الأمراض. تعيّن القدرة على تثبيط الجذور الحرة باختبار الـDPPH وتجري بواسطة جذر حر ثابت له لون بنفسجي في الحالة الحرة يتحول إلى اللون الأصفر في الحالة المعتدلة، ويعدّ تناقص قيم الامتصاصية للمزيج التفاعلي عند طول الموجة 515nm دليلاً على تزايد قدرة العينة على تثبيط الجذور الحرة (Sarikurkcu *et al*., 2009). يوضع في أنبوب اختبار 300µl من المستخلص النباتي بالتراكيز الآتية: (0.2, 0.5, 1mg/ml)، ثم يضاف الى كلّ أنبوب 3ml من محلول الـDPPH (45µgr/ml) في الإيتانول. توضع الأنابيب بعد التحريك في مكان مظلم في درجة حرارة الغرفة مدة 30min (Sarikurkcu *et al*., 2009)، ثم تقاس الامتصاصية عند طول الموجة 515nm. عرضت النتائج بالمقارنة بالفيتامين C (0.03mg/ml) كمركب مرجعي.

حسبت نسبة تثبيط الجذور الحرة من المعادلة الآتية:

$$I_{DPPH}\ \% = [(A_b - A_a)/A_b] \times 100$$

اذ: A_a امتصاصية العينة، A_b امتصاصية العينة الشاهدة

التحليل الإحصائي

حللت النتائج إحصائياً باستخدام برنامج IBM-SPSS 20.0، أجري اختبار One-way ANOVA لدراسة تأثير الجزء المدروس في القيمة المقيسة، كما أجري اختبار Bonferroni لتعيين القيم التي تختلف عن بعضها بفروق معنوية، كررت التجارب 3 مرات (n=3) وبمستوى ثقة 95%(α=0.05)، وتم التعبير عن النتائج بالشكل mean±SD اذ SD الانحراف المعياري.

النتائج والمناقشة:

استعادة المركبات المدروسة:

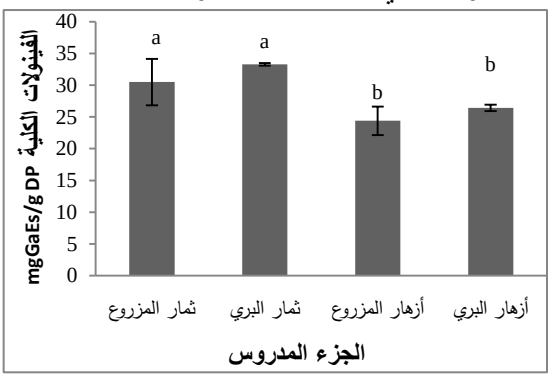
كانت استعادة الفينولات الكلية نسبةً الى حمض الغاليك 98%. في حين بلغت نسبة استعادة الفلافونويدات الكلية نسبة للكيرستين 99%. وهذا يدل على كفاءة عملية الاستخلاص وكفاءة محل الاستخلاص (الإيتانول 70%) الذي يعدّ من المحلات الآمنة صحياً وبيئياً.

تعيين الخصائص المضادّة للتأكسد لثمار نبات VAC المزروع والبري وأزهاره:

- **تعيين الفينولات الكلية والفلافونوئيدات الكلية**

يبيّن الشكل (5 و6) نتائج قيم كل من الفينولات الكلية والفلافونوئيدات الكلية لمستخلصات ثمار نبات VAC المزروع والبري وأزهاره. يلاحظ أن المحتوى الكلي للفينولات في المستخلصات الإيتانولية لثمار نبات VAC كانت أعلى من الأزهار، ومن الجدير بالذكر أنه لا يوجد فرق معنوي في محتوى الفينولات الكلية في الثمار

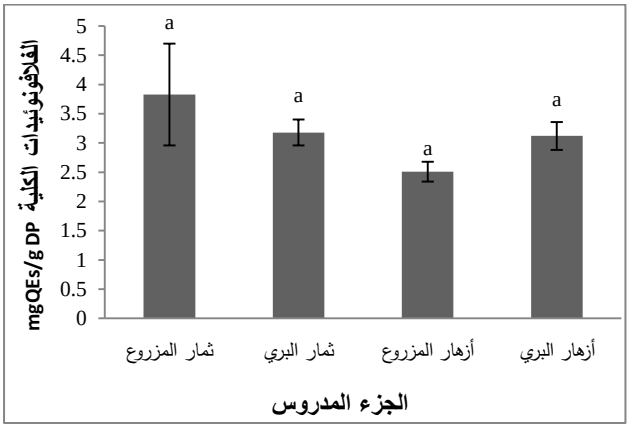
بين النبات المزروع والبري، وكذلك الأمر بالنسبة الى الأزهار. أمّا الفلافونوئيدات الكلية فلم يكن هناك فرق معنوي بين العينات المدروسة جميعها.



الشكل (5) محتوى الفينولات الكلية في مستخلصات ثمار نبات VAC المزروع والبري وأزهاره

GaEs: مكافئات حمض الغاليك، DP: النبات الجاف

تدل الأحرف المختلفة ^{a,b} على وجود فروق معنوية في محتوى الفينولات الكلية حسب برنامج SPSS.



الشكل (6) محتوى الفلافونوئيدات الكلية في مستخلصات ثمار نبات VAC المزروع والبري وأزهاره

QEs: مكافئات الكيرستين، DP: النبات الجاف

تدل الأحرف المتشابهة [a] على عدم وجود فروق معنوية في محتوى الفلافونوئيدات الكلية حسب برنامج SPSS

تعدّ هذه الدراسة الأولى في مقارنة محتوى الفينولات الكلية والفلافونوئيدات الكلية في أزهار نبات VAC في حين تناولت دراسات أخرى ثمار هذا النبات (Sarikurkcu *et al*., 2009)، إذ بلغت قيمة الفينولات الكلية والفلافونوئيدات الكلية للمستخلص الميتانولي لثمار النبات (46.50±1.39mgGaEs/g extract) و(mgQEs/g extract10.80±0.26) على الترتيب (Sarikurkcu *et al*., 2009). أيضاً أبدت الدراسة التي أجراها (Sağlam *et al*., 2007) فعالية مستخلصات ثمار نبات VACوأوراقه كمضادات تأكسد من خلال اختبار إزالة لون الجذر أحادي الكاتيون (ABTS$^{\cdot+}$)2,2′-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)، وكانت المستخلصات الإيتانولية والمائية أفضل كمضادات تأكسد من مستخلصات الهكسان لنبات VAC. بّينت النتائج أن نسبة الفينولات الكلية في مستخلصي الثمار والأزهار المزروعة والبرية أكبر بكثير من نسبة الفلافونوئيدات الكلية، الأمر الذي يظهر احتواء هذه المستخلصات على نسبة عالية من متعددات الفينول غير الفلافونوئيدية.

- **تعيين القدرة على تثبيط الجذور الحرة**

أجري اختبار الـ DPPH لتعيين قدرة المستخلصات الإيتانولية لثمار نبات VAC وأزهارهعلى تثبيط الجذور الحرة ،وحسبت النسب التثبيطية لثلاثة تراكيز محضّرة من مستخلصات ثمار النبات البري والمزروع وأزهاره وقورنت النتائج مع النسبة التثبيطية لـ فيتامين C كمركب عياري ،وأدرجت النتائج في الجدول (2). يلاحظ من الجدول (2) ارتفاع القدرة على تثبيط الجذور الحرة مع ازدياد تركيز المستخلص ،وهذا يعود لارتفاع نسبة المركبات المضادة للتأكسد، كما يظهر أن نسبة تثبيط جذر الـ DPPH في مستخلص النبات البري أعلى منها في النبات المزروع.

الجدول (2) نسب I_{DPPH} (%) لمستخلصات ثمار نبات VAC المزروع والبري وأزهاره بتراكيز مختلفة

الجزء المدروس	تركيز العينة (mg/ml)		
	0.2mg/ml	0.5mg/ml	1mg/ml
ثمار المزروع	15.14±1.24	30.97±3.09	51.53±2.60
ثمار البري	20.47±0.81	45.14±0.94	82.25±0.54
أزهار المزروع	14.32±0.93	30.36±1.57	48.48±3.29
أزهار البري	26.16±1.43	48.99±2.29	87.12±3.06
فيتامين C (0.03mg/ml)	33.24 ± 0.60		

كما يبيّن الجدول السابق أيضاً عدم وجود فرق واضح بين ثمار النبات وأزهاره في نسبة I_{DPPH}. بمقارنة القدرة على تثبيط جذر DPPH بين مستخلصي الثمار والأزهار وفيتامين C يتبيّن تفوق النسبة التثبيطية لمحلول فيتامين C 0.03mg/ml "المعروف باستخدامه كمركب مرجعي لقدرته التثبيطية المرتفعة (Saha *et al.*, 2008)" على تلك لمستخلصي الثمار والأزهار عند التركيز نفسه. بّينت الدراسة التي أجراها (Hajdú *et al.*, 2007)، فعالية مستخلص خلات الإيتيل لثمار نبات VAC كمضاد تأكسد من خلال اختبار DPPH (IC_{50} = 68 µg/ml)، وذلك بفضل محتواها من الفلافونوئيدات ولاسيّما الكاستيسين Casticin الذي أبدى فعالية كبيرة كمضاد تأكسد بالمقارنة بالفيتامين C.

تعزى الاختلافات في التركيب الكيميائي للنباتات عموماً إلى عوامل عدة، منها العوامل المناخية والجغرافية، كارتفاع كل منطقة عن سطح البحر والرطوبة وغيرها، وهذا ما أكدته عدد من الدراسات السابقة على النباتات المدروسة من مناطق وبيئات مختلفة (Taziki *et al.*, 2013; Loziene *et al.*, 2005).

الاستنتاجات:

كان محتوى الفينولات الكلية في ثمار نبات VAC أعلى من أزهاره، في حين لم يكن هناك فرق معنوي في محتوى الفينولات الكلية بين النبات المزروع والبري. لم يكن هناك فرق معنوي بين مستخلصات الثمار والأزهار المزروعة والبرية في محتوى الفلافونوئيدات الكلية. كانت نسبة تثبيط جذر DPPH في مستخلص نبات VAC البري أعلى منه في النبات المزروع. يمكن استخدام مستخلصات ثمار نبات VAC وأزهاره كمضادات تأكسد طبيعية.

المراجع References

- AlHafez, M., Kheder, F., and AlJoubbeh, M., 2014. Polyphenols, flavonoids and (-)epigallocatechin gallate in tea leaves and in their infusions under various conditions. Nutrition & Food Science., 44(5): 455 - 463.
- Azam, S., Bashir, S., and Ahmad, B., 2012. Anti-spasmodic action of crude methanolic extract of the aerial parts of Vitex agnus castus. Journal of Medicinal Plant Research 6 (3): 461- 464.
- Hajdú, Z., Hohmann, J., Forgo, P., Martinek, T., Dervarics, M., Zupkó, I., Falkay, G., Cossuta, D., and Máthé, I., 2007. Diterpenoids and flavonoids from the fruits of Vitex agnus castus and antioxidant activity of the fruit extracts and their constituents. Phytotherapy Research 21 (4): 391 −394.
- Högner, C., Sturm, S., Seger, C., and Stuppner, H., 2013. Development and validation of a rapid ultra-high performance liquid chromatography diode array detector method for Vitex agnus castus. Journal of Chromatography B, 927: 181– 190.
- Imai, M., Kikuchi, H., Denda, T., Ohyama, K., Hirobe, C., and Toyoda, H., 2009. Cytotoxic effects of flavonoids against a human colon cancer derived cell line, COLO 201: A potential natural anti-cancer substance. Cancer Letters 276: 74–80.
- Loziene, K., and Venskutonis, P.R., 2005. Influence of environmental and genetic factors on the stability of essential oil composition of Thymus pulegioides. Biological System Ecology. 33: 517.
- Mari, A., Montoro, P., Pizza, C., and Piacente, S., 2012. Liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of chemical markers and principal component analysis of Vitex agnus castus L. fruits (Verbenaceae) and derived food supplements. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 70: 224– 230.
- Nasri, S., Hossain, M., Sourmaghi, S., Amin, G., Mohebali, S., and Sharifi, A., 2013. Major essential oil components, antinociceptive and anti-inflammatory effects of hexane extract of Vitex agnus-

castus L. fruits and possible mechanism in male mice. Journal of Paramedical Sciences (JPS) 4(3): ISSN 2008-4978.

- Sağlam, H., Pabuçcuoğlu, A., and Kivçak, B., 2007. Antioxidant activity of Vitex agnus castus L. extracts. Phytotherapy Research 21 (11): 1059- 1060.
- Saha, M. R., Hasan, S. M. R., Akter, R., Hossain, M. M., Alam, M. S., Alam, M. A., and Mazumder, M. E. H., 2008. In vitro free radical scavenging activity of methanol extract of the leaves of mimusops elengi linn. Bangl. J. Vet. Med. 6(2): 197–202.
- Sarikurkcu, C., Arisoy, K., Tepe, B., Cakir, A., Abali, G., and Mete, E., 2009. Studies on the antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of Vitex agnus castus L. fruits from Turkey. Food and Chemical Toxicology. 47: 2479–2483.
- Shaghaghi, M., Manzoori, J. L., Afshar, D. J., and Jouyban, A., 2009. Determination of flavonoids in pharmaceutical preparations using terbium sensitized fluorescence method export citation. DARU - Journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences.17(4): 264-268.
- Shaghaghi, M., Manzoori, J., and Jouyban, A., 2008. Determination of total phenols in tea infusions, tomato and apple juice by terbium sensitized fluorescence method as an alternative approach to the Folin-Ciocalteu spectrophotometric method. Food chemistry.108(2): 695-701.
- Singleton, L., Orthofer, R., and Lamuela-Ravents, R., 1999. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation substrates and antioxidants by means of folin- ciocalteu reagent. Methods in enzymology. 299: 152-178.
- Švecová, E., Proietti, S., Caruso, C., Colla, G., and Crinò, P., 2013. Antifungal activity of Vitex agnus castus extract against Pythium ultimum in tomato. Crop Protection 43: 223-230.
- Taziki, S., Hamedeyazdan, S., and Pasandi, A. N., 2013. Variations in essential oils of Vitex agnus castus fruits growing in Qum, Khorasan and Tehran in Iran. Annals of Biological Research. 4 (2): 308.

- رهف الحلبي، ملك الجبة، إيمان البكري. 2014. دارسة تغير نسبة مركبات الفينول خلال مراحل نمو ثمرة الرمان السوري. أطروحة ماجستير، قسم الكيمياء، كلية العلوم، جامعة دمشق.
- وسيم الحكيم، بدوي السعدي، عصام آغا، عماد القاضي، أحمد دركلت، زهير الشاطر، ثروات إبراهيم، محمد قربيصة. 2012. أطلس النباتات الطبية والعطرية في الوطن العربي، الفصائل والأنواع النباتية (2)، المركز العربي لدراسات المناطق الجافة والأراضي القاحلة، دمشق، سورية: 563–565.