نشریه فیزیولوژی محیطی گیاهی، سال پانزدهم، شماره ۵۷، بهار ۱۳۹۹ / صفحات: ۹-۱

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانتی و کاربرد تکنیک HPLC جهت آنالیز ترکیبات فنلی عصاره برگ درخت بادام زاگرسی (*Amygdalus haussknechtii* L.)

ربیع شریفی، علی‌اصغر حاتم‌نیا*

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

تاریخ دریافت: ۹۸/۳/۱ تاریخ پذیرش: ۹۸/۵/٤

چکیده

این تحقیق با هدف بررسی و مقایسه میزان ترکیبات آنتی اکسیدانتی و فعالیت آنتی‌اکسیدانتی سه ژنوتیپ بادام زاگرسی در رویشگاه‌های طبیعی استان ایلام انجام گرفت. محتوی فنل کل با استفاده از روش فولین-سیکالتئو و فعالیت آنتی اکسیدانتی با استفاده از دو سنجش ظرفیت جمع‌آوری رادیکال DPPH و ظرفیت جمع‌آوری رادیکال نیتریت ارزیابی شد. جهت تعیین کمی ترکیبات فنلی از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا استفاده گردید. نتایج نشان داد که فعالیت پاداکسایشی عصاره برگ ژنوتیپ H3 به‌طور معنی‌داری بیشتر از ژنوتیپ‌های H1 و H2 بوده که این فعالیت بالا را می‌توان به میزان بالای محتوی فنلی و فلاوونوئیدی نسبت داد، به‌طوری‌که همبستگی بالایی بین محتوی فنل کل با ظرفیت جمع‌آوری رادیکال DPPH (R= ۰/۹۰۲) و ظرفیت جمع‌آوری رادیکال نیتریت (R= ۰/۸۰۶) مشاهده شد. آنالیز ترکیبات فنلی توسط HPLC وجود ترکیبات کاتچین، سیناپیک اسید، کوئرستین و آپیژنین در ژنوتیپ H3 را تایید نمود. همچنین ترکیب آپژنین در هر سه ژنوتیپ مورد مطالعه مشاهده شد. به‌طورکلی نتایج پیشنهاد می‌دهند که عصاره برگ ژنوتیپ H3 با محتوی بالایی از ترکیبات فنلی و فلاوونوئیدی و فعالیت پاداکسایشی بالا می‌تواند به‌عنوان منبعی از ترکیبات پاداکسایشی در صنعت داروسازی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: ترکیبات فنلی، فعالیت آنتی‌اکسیدانتی، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، بادام زاگرسی، برگ

مقدمه

بادام زاگرسی با نام علمی *Amygdalus haussknechtii* متعلق به جنس *Prunus* از خانواده Rosaceae می‌باشد. جنس بادام تقریباً شامل ۴۰ تا ۵۰ گونه بوده که عمدتاً در جنوب غربی آسیا، آسیای میانه و خاورمیانه پراکنش یافته‌اند. تعداد کمی از گونه‌های این جنس نیز در شرق آسیا و جنوب شرقی اروپا وجود دارند (Browicz and Zohary, 1996). در ایران ۱۷ گونه و واریته بادام وجود دارد که گونه *A. haussknechtii* دارای بزرگ‌ترین و سنگین‌ترین خشک میوه و مغز در بین آن‌ها است (Rahemi et al., 2011).

گونه‌های فعال اکسیژن (ROS[۲]) به شکل آنیون سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال هیدروژن طی متابولیسم سلولی به‌طور طبیعی در سلول‌های بدن انسان تولید می‌شوند. به هر حال زمانی که میزان این ترکیبات در داخل سلول افزایش یابند سبب آسیب رساندن به مولکول‌های زیستی مانند لیپیدها،

*نویسنده مسئول: a.hatamnia@ilam.ac.ir

1- Reactive Oxygen Species

پروتئین‌ها، آنزیم‌ها و اسیدهای نوکلئیک شده و در نهایت عملکرد سلول و بافت سلولی را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Kaur and Kapoor, 2001; Hu and Willett, 2002).

بررسی‌ها نشان داده است که ترکیبات ثانویه موجود در گیاهان به‌عنوان ترکیبات احیاء کننده قادر به انتقال هیدروژن به رادیکال‌های آزاد هستند، از جمله این ترکیبات ثانویه می‌توان به ترکیبات فنلی و فلاوونوئیدی اشاره کرد که با انتقال هیدروژن به رادیکال‌های آزاد سبب خنثی شدن آنها شده و به همین دلیل است که این ترکیبات به عنوان عوامل پاداکسایشی مورد توجه قرار گرفته‌اند (Ang et al., 2015). ترکیبات فنلی حاوی گروه‌های هیدروکسیل واکنش پذیر بوده که مستقیماً به حلقه‌های هیدروکربنی آروماتیک آنها متصل می‌باشد. خاصیت آنتی اکسیدانتی این ترکیبات به علت ویژگی‌های ردوکس آنها می‌باشد که به آنها اجازه می‌دهد به عنوان عوامل احیاء کننده عمل کرده و با دادن هیدروژن به ROS سبب خنثی سازی این رادیکال‌ها شوند (Heim et al., 2002; Carvalho et al., 2010).

ترکیبات فنلی گروه بزرگی از متابولیت‌های ثانویه با فعالیت آنتی اکسیدانتی که از نظر شیمیایی متنوعی‌اند و از اسیدهای فنلی ساده تا پلیمرهای بسیار بزرگ و پیچیده مانند تانن‌ها و لیگنین را شامل می‌شوند. ساختمان پایه تشکیل‌دهنده این ترکیبات یک حلقه آروماتیک با یک یا تعداد بیشتری گروه هیدروکسیل است. این ترکیبات در گیاهان از مسیرهای شیکمیک اسید، فنیل پروپانوئید و پنتوز فسفات مشتق می‌شوند (Ryan et al., 1999; Del Rio et al., 2013).

قسمت‌های مختلف بادام دارای مقادیر متفاوتی از اسیدهای فنلیک و فلاوونوئیدها بوده که عمدتاً قندها و یا دیگر پلی‌ال‌ها از طریق پیوندهای قندی و استری به آنها متصل می‌باشند. ترکیب و توزیع این ترکیبات اتصال یافته به مواد فنلی باعث شده که قسمت‌های مختلف گیاه از لحاظ ویژگی‌های فیزیولوژیکی، آنتی‌اکسیدانتی و دارویی با هم متفاوت باشند (Milbury et al., 2006).

در سال‌های اخیر مطالعات فراوانی روی گونه‌های جنس بادام صورت گرفته است که بتوانند به‌عنوان یک منبع قابل توجه از ترکیباتی با فعالیت پاداکسایشی مورد استفاده قرار گیرند. مطالعات فراوانی روی خواص پاداکسایشی میوه گونه‌های مختلف بادام صورت گرفته است (Milbury et al., 2006; Moure et al., 2007; Barreira et al., 2008; Jahanban Sfahlan et al., 2009)، ولی با این حال تا آنجایی که ما بررسی کرده‌ایم مطالعه مدون روی خواص پاداکسایشی بادام زاگرسی (*A. Haussknechtii*) صورت نگرفته است. بنابراین هدف ما از این تحقیق، ارزیابی و مقایسه خواص پاداکسایشی (با استفاده از دو روش مختلف) عصاره‌های برگ بادام زاگرسی از سه رویشگاه در استان ایلام، بررسی همبستگی بین فعالیت پاداکسایشی با میزان فنل و فلاوونوئید کل و ارزیابی عوامل اقلیمی روی محتوی فنلی و فلاوونوئیدی و همچنین خواص آنتی اکسیدانتی بادام زاگرسی بود.

مواد و روش‌ها

خصوصیات جغرافیایی محل جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی، آماده‌سازی نمونه‌های گیاهی: برگ بادام زاگرسی از سه رویشگاه طبیعی در استان ایلام در شهریور ماه سال ۱۳۹۷ جمع‌آوری شدند (جدول ۱). پس از جمع‌آوری، اجازه داده شد تا در دمای اتاق به طور کامل خشک شوند. بعد از آن نمونه‌ها آسیاب شده و به صورت پودر نرم در آمدند. سپس این نمونه‌ها تا موقع عصاره‌گیری در دمای اتاق نگهداری

شدند. برای عصاره‌گیری ۱/۵ گرم از پودرهای آماده شده‌ی برگ‌ها درون دستگاه سوکسله و با استفاده از ۲۵ میلی‌لیتر متانول در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد عصاره‌گیری صورت گرفت (Wijeratne et al., 2006).

تعیین محتوای فنل کل: برای اندازه‌گیری محتوای فنل کل عصاره از روش فولین- سیوکالتئو (Tsantili *et al.*, 2010) استفاده شد. به این ترتیب که ۲۰۰ میکرولیتر عصاره با ۲۰۰ میکرولیتر شناساگر فولین- سیوکالتئو(FCR) و ۲/۶ میلی‌لیتر آب دیونیزه مخلوط شده و بعد از ۳ دقیقه ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷ درصد به مخلوط فوق اضافه شد و به‌مدت ۲ ساعت در دمای اتاق مخلوط شد. جذب محلول حاضر بعد از ۹۰ دقیقه در طول موج ۷۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Biowave, WPA S2100, England) اندازه‌گیری و مقدار آن با استفاده از منحنی استاندارد گالیک اسید محاسبه گردید.

جدول ۱: مشخصات مربوط به رویشگاه‌های ژنوتیپ‌های مختلف بادام زمینی (*A. haussknechtii*)

ژنوتیپ	منطقه	ارتفاع از سطح دریا (متر)	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی
H1	ایلام-کوه قلاجه	۱۷۰۸	۴۶° ۳۲ '۹۴"	۳۳° ۹۷' ۰۱"
H2	ایلام- کوه مانشت	۱۸۱۲	۴۶° ۲۸' ۳۰"	۳۳° ۴۰' ۱۲"
H3	ایلام- کوه قلارنگ	۲۰۲۱	۴۶° ۱۳' ۲۸"	۳۳° ۳۷' ۴۶"

تعیین محتوای فلاوونوئیدی کل: محتوی فلاوونوئید با استفاده از روش لنوسی و همکاران (Lenucci et al., 2006) تعیین شد. ۰/۲۵ میلی‌لیتر از عصاره ۱۰ برابر رقیق شده با ۰/۰۷ میلی‌لیتر نیتریت سدیم (۵٪) و ۱/۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر کاملاً مخلوط شده و بعد از ۵ دقیقه ۰/۱۵ میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم (۱۰٪) آن اضافه شد، سپس به مخلوط فوق هیدرواکسید سدیم یک مولار (۰/۵ میلی‌لیتر) اضافه شد. در پایان مخلوط واکنش یک میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد و بلافاصله جذب آن بوسیله‌ی دستگاه اسپکتروفتومتر (Biowave, WPA S2100, England) در طول موج ۵۱۰nm سنجیده شد و مقدار آن با استفاده از منحنی استاندارد کاتچین محاسبه شد.

ظرفیت جمع‌آوری رادیکال نیتریت: برای سنجش ظرفیت جمع‌آوری رادیکال نیتریت از واکنش Griess Illosvoy استفاده شد (Garrat, 1964). مخلوط واکنش حاوی ۲ میلی‌لیتر سدیم نیتروپروسید (۱۰ میلی‌مولار)، ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات سالین و ۵۰ میکرولیتر عصاره در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵۰ دقیقه انکوبه شد. بعد از انکوباسیون، ۰/۵ میلی‌لیتر از مخلوط واکنش با یک میلی‌لیتر از معرف سولفانیلیک اسید (۳۳٪ درصد در استیک اسید گلاسیال ۲۰ درصد) اضافه و اجازه داده شد برای مدت ۵ دقیقه واکنش کامل گردد. سپس یک میلی‌لیتر نفتیل اتیلن دی آمین دی هیدروکلرید به آن اضافه شد و در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه مخلوط انکوبه شد. در پایان به مخلوط واکنش ۲ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه، و جذب محلول در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شد. درصد جمع‌آوری از رابطه‌ی زیر بدست آمد.

$$\text{درصد جمع آوری رادیکال نیتریت} = \frac{\text{جذب مخلوط واکنش همراه عصاره} - \text{جذب مخلوط واکنش بدون عصاره}}{\text{جذب مخلوط واکنش بدون عصاره}} \times ۱۰۰$$

ظرفیت جمع آوری رادیکال‌های DPPH: رادیکال پایدار دی فنیل پیکریل هیدرازیل جهت بررسی فعالیت جمع آوری رادیکال آزاد استفاده شد. ۱/۵ میلی‌لیتر از DPPH (۱۵/ میلی‌مولار در اتانول ۹۶٪) با ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره مخلوط شده و بعد از انکوباسیون در تاریکی به مدت ۳۰ دقیقه جذب آن در ۵۱۵ نانومترخوانده شد (Wu et al., 2003).

سپس درصد جمع آوری رادیکال DPPH با فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{درصد جمع آوری رادیکال DPPH} = \frac{\text{جذب مخلوط واکنش بدون عصاره} - \text{جذب مخلوط واکنش همراه عصاره}}{\text{جذب مخلوط واکنش بدون عصاره}} \times 100$$

عصاره‌گیری برای آنالیز ترکیبات فنلی توسط دستگاه کروماتوگرافی با کارایی بالا (HPLC): برای استخراج ترکیبات فنلی جهت تزریق به دستگاه HPLC از روش هرتوگ و همکاران (Hertog et al., 1992) با اندکی تغییرات استفاده شد. ابتدا ۵ میلی‌لیتر متانول مخصوص HPLC با ۵ میلی‌لیتر آب مخصوص HPLC مخلوط گردید. سپس ۸ میلی‌لیتر از محلول آماده شده فوق همراه با ۲ میلی‌لیتر HCL غلیظ را به ۰/۵ گرم پودر خشک شده‌ی نمونه برگ اضافه کرده و به‌مدت ۱ ساعت در دمای ۸۰ درجه قرار داده شد. سپس ۱۰ میلی‌لیتر متانول مخصوص HPLC به آن اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه با دور ۴۰۰۰ سانتریفوژ و محلول صاف شده (کاغذ صافی ۰/۴۵ میکرون) برای آنالیز HPLC استفاده گردید.

برای آنالیز عصاره از دستگاه HPLC مدل Knuer استفاده شد. Flow rate برابر۰/۵ میلی لیتر در دقیقه و ترکیب فاز متحرک به کار برده شده استونیتریل، آب و استیک اسید ۲٪ بود. نوع ماده‌ی پر کننده C18 reversed phase، طول ستون ۲۵ سانتی‌متر و اندازه ذرات پایه ۵ میکرومتر بود. آشکارساز استفاده شده UV با طول موج ۲۵۴ نانومتر و حجم هر بار تزریق برابر ۲۰ میکرولیتر بود. دمای اتاق برای انجام آزمایش ۲۵ درجه سانتی‌گراد و سیستم مورد استفاده ایزوکراتیک بود و همچنین از نرم افزار Chrom Gate برای آنالیز استفاده شد.

در این تحقیق اختلاف بین انواع ژنوتیپ‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون Tukey در سطح آماری ۵ درصد آنالیز و معنی‌دار گردید، همچنین برای بررسی همبستگی بین پارامترها از ضریب پیرسون استفاده شد. همچنین جهت تجزیهٔ واریانس اثر رویشگاه از تست GLM (General Linear Mode) استفاده شد.

نتایج

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر رویشگاه بر میزان فنل کل، فلاوونوئید کل و ظرفیت جمع‌آوری رادیکال نیتریت در سطح احتمال ۱ درصد و ظرفیت جمع‌آوری رادیکال DPPH در سطح احتمال ۵ درصد معنی دار می‌باشد (جدول ۲). نتایج حاصل از تجزیه داده‌ها نشان داد که کمترین و بیشترین میزان فنل کل مربوط به عصاره‌های برگ ژنوتیپ‌های مختلف درخت بادام زاگرسی به ترتیب در ژنوتیپ‌های H1 و H3 با ۴۳/۵۶ و ۴۸/۲۲ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم ماده خشک مشاهده شد (جدول ۳). طبق نتایج حاصله بین محتوی فنل کل با عملکرد آنتی اکسیدانتی (ظرفیت جمع‌آوری رادیکال نیتریت و ظرفیت جمع‌آوری رادیکال DPPH) همبستگی مثبت و معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد مشاهده گردید (جدول ۴).

جدول ۲: تجزیه واریانس میزان فنل، فلاوونوئید و فعالیت پاداکسایشی برگ بادام زاگرسی در سه رویشگاه در استان ایلام.

منابع تغییر	درجه آزادی	فنل کل	فلاوونوئیدها	ظرفیت جمع آوری رادیکال نیتریت	ظرفیت جمع آوری رادیکال DPPH
رویشگاه	۲	۱۶/۴۴**	۲/۷۵**	۴۸/۰۲**	۴۰/۰۱*
خطا	۶	۱/۱۷	۰/۲۱۵	۱/۳۶	۴/۸۹
ضریب تغییرات (درصد)		۴/۸۷	۱۰/۷۹	۴/۳۸	۴/۰۰

*: معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵ و **: معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۱

ارزیابی و مقایسه محتوی فلاوونوئیدهای مربوط به عصاره‌های برگ ژنوتیپ‌های مختلف درخت بادام زاگرسی در جدول ۳ نشان داده شده است. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین و کمترین میزان فلاوونوئیدها به‌ترتیب در ژنوتیپ H3 (۹/۴۹ میلی گرم کاتچین بر گرم ماده خشک) و ژنوتیپ H1 (۷/۵۸ میلی‌گرم کاتچین بر گرم ماده خشک) مشاهده شد. نتایج مربوط به ضریب همبستگی نشان داد که بین میزان فلاوونوئیدها و ظرفیت جمع‌آوری رادیکال DPPH همبستگی مثبت و معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد وجود دارد ولی بین میزان ترکیبات فلاوونوئیدی و ظرفیت جمع‌آوری رادیکال نیتریت همبستگی معنی‌دار مشاهده نشد (جدول ۴).

نتایج حاصل از ارزیابی جاروب کردن رادیکال‌های آزاد نشان داد که اختلاف معنی‌دار بین ظرفیت جمع‌آوری رادیکال نیتریت مربوط به عصاره برگ ژنوتیپ‌های مختلف جمع‌آوری شده از سه رویشگاه متفاوت دیده شد به‌طوری‌که بیشترین و کمترین میزان جاروب کردن رادیکال نیتریت به ترتیب در عصاره برگ ژنوتیپ H3 (۹۶/۳۵ درصد) و عصاره برگ ژنوتیپ H1 (۸۹/۸۳ درصد) مشاهده گردید (جدول ۳).

جدول ۳: محتوی فنل کل، فلاوونوئیدها، ظرفیت جمع‌آوری رادیکال نیتریت و ظرفیت جمع‌آوری رادیکال DPPH مربوط به عصاره‌های برگ ژنوتیپ‌های مختلف بادام زاگرسی. داده‌ها بر اساس میانگین ± انحراف معیار می‌باشد.

ژنوتیپ	محتوی فنل کل (میلی‌گرم گالیک اسید/گرم ماده خشک)	محتوی فلاوونوئیدها (میلی‌گرم کاتچین/گرم ماده خشک)	ظرفیت جمع‌آوری رادیکال نیتریت (٪)	ظرفیت جمع‌آوری رادیکال DPPH (٪)
H1	۴۳/۵۶ ±۰/۵۷ b	۷/۵۸ ±۰/۰۹ b	۸۹/۸۳ ±۱/۷۲ b	۷۸/۱۹ ±۰/۶۸ c
H2	۴۵/۵۲ ±۰/۴۸ ab	۸/۴۸ ±۰/۲۵ ab	۹۰/۲۴ ±۱/۲۵ b	۸۱/۷۵ ±۰/۳۳ b
H3	۴۸/۲۲ ±۰/۷۸ a	۹/۴۹ ±۰/۳۷ a	۹۶/۳۵ ±۰/۵۸ a	۸۶/۱۷ ±۰/۸۸ a
میانگین	۴۵/۷۶ ±۰/۷۴	۸/۵۲ ±۰/۳۰	۹۲/۱۴ ±۱/۲۳	۸۲/۰۴ ±۱/۲۰

* در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف متفاوتی هستند دارای تفاوت آماری در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشند.

آنالیز آماری مربوط به ظرفیت جمع آوری رادیکال DPPH در جدول ۳ ارائه شده است. نتایج حاصل از تجزیه داده‌ها نشان داد که ژنوتیپ‌های مختلف جمع‌آوری شده از سه رویشگاه مختلف از نظر فعالیت ظرفیت جمع‌آوری رادیکال DPPH تفاوت معنی‌دار نشان دادند، به طوری‌که بیشترین میزان فعالیت ظرفیت جمع آوری رادیکال DPPH به‌ترتیب در ژنوتیپ‌های H3 (۸۶/۱۷ ٪)، H2 (۸۱/۷۵ ٪) و H1 (۷۸/۱۹ ٪) مشاهده شد. نتایج مربوط به ضریب همبستگی بین سنجش‌های مختلف نشان داد

که همبستگی مثبت و معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد (R=۰/۷۶۰) بین ظرفیت جمع‌آوری رادیکال DPPH و ظرفیت جمع‌آوری رادیکال نیتریت وجود داشته که بیانگر این واقعیت می‌باشد که سنجش‌های بکار رفته به خوبی فعالیت آنتی اکسیدانتی عصاره‌ها را اندازه‌گیری کرده و این سنجش‌ها مکمل هم بوده و به درستی انتخاب شده‌اند (جدول ۴).

جدول ٤: همبستگی بین محتوی فنل کل، محتوی فلاوونوئیدها، ظرفیت جمع‌آوری رادیکال نیتریت و ظرفیت جمع‌آوری رادیکال DPPH ژنوتیپ‌های مختلف بادام زاگرسی.

	محتوی فنل کل	محتوی فلاوونوئید	ظرفیت جمع آوری رادیکال نیتریت	ظرفیت جمع آوری رادیکال DPPH
محتوی فنل کل	۱	۰/۷۵۴*	۰/۸۰۶**	۰/۹۰۲**
محتوی فلاوونوئید		۱	۰/۶۳۸	۰/۸۷۹**
ظرفیت جمع آوری رادیکال نیتریت			۱	۰/۷۶۰*
ظرفیت جمع آوری رادیکال DPPH				۱

* همبستگی در سطح احتمال ۵ درصد معنی دار می‌باشند. ** همبستگی در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار می‌باشند.

انواع و میزان ترکیبات فنلی در عصاره برگ در جدول ۵ نشان داده شده است. در این تحقیق پروفایل ترکیبات فنلی شامل کاتچین (Catechin)، سیناپیک اسید (Sinapic acid)، کوئرستین (Quercetin) و آپیژنین (Apigenin) می‌باشند. نتایج نشان داد که بیشترین میزان ترکیبات فنلی مربوط به آپیژنین با ۱۱۵۵/۳ میکروگرم بر گرم ماده خشک (ژنوتیپ H2) و کمترین میزان ترکیبات فنلی مربوط به کوئرستین با ۲۳/۲ میکروگرم بر گرم ماده خشک (ژنوتیپ H3) می‌باشد. نتایج نشان داد که عصاره برگ ژنوتیپ H3 دارای هر چهار ترکیب فنلی بوده در حالی‌که کوئرستین در عصاره برگ ژنوتیپ H1 وجود نداشت و عصاره برگ ژنوتیپ H2 تنها دارای کوئرستین و آپیژنین بود. نتایج نشان داد که آپیژنین در هر سه ژنوتیپ مشاهده گردید.

جدول ۵: آنالیز کمی ترکیبات فنلی مربوط به عصاره‌های برگ سه ژنوتیپ بادام زاگرسی.

ژنوتیپ	کاتچین (میکروگرم /گرم ماده خشک)	سیناپیک اسید (میکروگرم /گرم ماده خشک)	کوئرستین (میکروگرم /گرم ماده خشک)	آپیژنین (میکروگرم / گرم ماده خشک)
H1	۹۰۰/۴	۶۵۶/۳	-	۵۳/۱
H2	-	-	۸۶/۱	۱۱۵۵/۳
H3	۵۲/۱	۱۱۴/۴	۲۳/۲	۷۳/۹

بحث

محققین زیادی گزارش داده‌اند که میزان فنل و فلاوونوئید کل تحت تأثیر فاکتورهای درونی (ژنتیکی) و بیرونی (فاکتورهایی از قبیل شرایط محیطی، اکولوژیکی و کشاورزی) قرار دارند (Barreira et al., 2008; Tomaino et al., 2010; Hatamnia et al., 2014; Hatamnia et al., 2015). بنابراین اختلاف در میزان محتوی فنل و فلاوونوئید

کل در این ژنوتیپ‌ها را می‌توان به عوامل اکولوژیکی و شرایط آب و هوایی رویشگاه طبیعی آنها نسبت داد، به‌طوری‌که نتایج مربوط به تجزیه واریانس نشان داد که اثر رویشگاه بر میزان فنل کل و فلاوونوئید کل در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار می‌باشد. میزان این ترکیبات با افزایش ارتفاع از سطح دریا ارتباط مثبت و معنی‌داری دارد، به‌طوری‌که بیشترین میزان این ترکیبات در ژنوتیپ H3 (کوه قلارنگ، ارتفاع ۲۰۲۱ متر) و کمترین میزان در ژنوتیپ H1 (کوه قلاجه، ارتفاع ۱۷۰۸ متر) مشاهده گردید.

تحقیقات نشان داده است که تفاوت در فعالیت پاداکسایشی عصاره‌های گیاهی می‌تواند به دلیل مقادیر و انواع متفاوت ترکیبات فنلی و فلاوونوئیدی و مشتقات آنها باشد. به عنوان مثال فعالیت پاداکسایشی اسیدهای فنلیک و مشتقات آنها از قبیل استرها وابسته به تعداد گروه‌های هیدروکسیل در هر مولکول می‌باشد (Rababah et al., 2004; Rajaei et al., 2010). باریریا و همکاران (Barreira et al., 2008) با مطالعه محتوی فنلی، فلاوونوئیدی و فعالیت پاداکسایشی ده کولتیوار بادام به این نتیجه رسیدند که میزان این ترکیبات و در نتیجه فعالیت پاداکسایش تحت تأثیر فاکتورهای متفاوتی از جمله شرایط اقلیمی قرار دارند. در مطالعه دیگر تلیلی و همکاران (Tlili et al., 2019) نشان دادند که میزان فنل کل و فلاوونوئید های پوست سبز بیرونی میوه بادام به ترتیب ۱۳/۵۰ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم ماده خشک و ۵/۰۸ میلی‌گرم کاتچین بر گرم ماده خشک می‌باشد که کمتر از مقادیر بدست آمده برای عصاره برگ در این تحقیق می‌باشد.

نیتریک اکسید قادر به واکنش با اکسیژن بوده که سبب تولید رادیکال نیتریت می‌شود، از طرف دیگر ترکیبات فنلی و فلاوونوئیدی نیز می‌توانند با اکسیژن ترکیب شوند و در نتیجه این ترکیبات ثانویه برای واکنش با اکسیژن با نیتریک اکسید رقابت کرده و می‌توانند تشکیل رادیکال نیتریت را به میزان زیادی کاهش دهند و آن را به محصولات احیایی تبدیل نماید و به همین دلیل است که این ترکیبات سبب کاهش رادیکال نیتریت شده و به‌عنوان ترکیبات پاداکسایشی کاربرد دارند (Marcocci et al., 1994). اسفهلان و همکاران (Sfahlan et al., 2009) با مطالعه میوه بادام نشان دادند که ظرفیت جمع‌آوری رادیکال نیتریت در پوست سبز بیرونی و پوست سخت داخلی میوه بادام به‌ترتیب برابر ۶۷/۵ و ۴۰/۵ درصد می‌باشد که کمتر از مقادیر بدست آمده برای عصاره برگ در این تحقیق می‌باشد.

رادیکال DPPH یک رادیکال آزاد پایدار می‌باشد که مستعد دریافت هیدروژن بوده و بعد دریافت هیدروژن خنثی می‌گردد. بنابراین می‌توان گفت که کاهش جذب رادیکال DPPH به‌علت واکنش بین ترکیبات پاداکسایندە (ترکیبات فنلی و فلاوونوئیدی) موجود در عصاره با رادیکال‌های DPPH بوده و باعث تغییر رنگ محلول از حالت بنفش (حالت رادیکال) به زرد (حالت خنثی) می‌شوند (Sánchez -Moreno et al., 1999; Huang et al., 2005). بنابراین میزان این تغییر رنگ معیاری از ظرفیت جمع‌آوری رادیکال DPPH محسوب می‌شود، به‌طوری‌که هر اندازه میزان این تغییر رنگ از بنفش به زرد بیشتر باشد بیان کنندۀ ظرفیت بیشتر جمع‌آوری رادیکال DPPH و در نتیجه فعالیت بیشتر پاداکسایشی عصاره می‌باشد. همان‌طورکه اشاره شد وجود ترکیبات فنلی و فلاوونوئیدی سبب افزایش فعالیت پاداکسایشی شده که وجود ضریب همبستگی مثبت و معنی‌دار بین این ترکیبات با فعالیت پاداکسایشی (جدول ۴) تایید کننده این واقعیت می‌باشد، از طرف دیگر شرایط اکولوژیکی و آب و هوایی رویشگاه گیاه می‌تواند روی میزان ترکیبات فنلی و فلاوونوئیدی تاثیر گذار

باشد. بنابراین می‌توان گفت که این شرایط روی فعالیت پاداکسایشی تأثیر گذار هستند، به‌طوری‌که نتایج نشان داده‌اند که ظرفیت جمع‌آوری رادیکال نیتریت و ظرفیت جمع‌آوری رادیکال DPPH در بین ژنوتیپ‌های مختلف دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشد، به‌نحوی‌که بیشترین میزان فعالیت پاداکسایشی در رویشگاه کوه قلارنگ (ارتفاع ۲۰۲۱ متر) و کمترین میزان در رویشگاه کوه قلاجه (ارتفاع ۱۷۰۸ متر) مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری نهایی

به‌طورکلی با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان بیان کرد که نه تنها عوامل ژنتیکی بلکه عوامل اکولوژیکی و محیطی نیز می‌توانند تأثیرات بسزایی روی میزان ترکیبات فنلی و فلاوونوئیدی و در نتیجه فعالیت آنتی اکسیدانتی داشته باشند، به‌طوری‌که آنالیز جدول تجزیه واریانس نشان داد که میزان ترکیبات فنلی و فلاوونوئیدی و فعالیت آنتی‌اکسیدانتی حاصل از آنها تحت تأثیر رویشگاه‌های مختلف قرار گرفتند.

References

Ang, L.Z.P., Hashim, R., Sulaiman, S.F., Coulibaly, A.Y., Sulaiman, O., Kawamura, F. and Salleh, K.M. (2015). In vitro antioxidant and antidiabetic activites of *Gluta torquata*. Industrial Crops and Products, 76: 755-760.

Barreira, J.C., Ferreira, I.C., Oliveira, M.B.P. and Pereira, J.A. (2008). Antioxidant activity and bioactive compounds of ten Portuguese regional and commercial almond cultivars. Food and Chemical Toxicology, 46(6): 2230-2235.

Browicz, K. and Zohary, D. (1996). The genus *Amygdalus* L. (Rosaceae): species relationships, distribution and evolution under domestication. Genetic Resources and Crop Evolution. 43, 229-247.

Carvalho, M., Ferreira, P.J., Mendes, V.S., Silva, R., Pereira, J.A., Jerónimo, C. and Silva, B.M. (2010). Human cancer cell antiproliferative and antioxidant activities of *Juglans regia* L. Food and chemical toxicology, 48(1): 441-447.

Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J.P., Tognolini, M., Borges, G. and Crozier, A. (2013). Dietary (poly) phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. Antioxidants & redox signaling, 18(14): 1818-1892.

Garrat, D.C. (1964). The quantitative analysis of drugs (vol 3). pp. 456–458. Japan: Chapman and Hall.

Hatamnia, A.A., Abbaspour, N. and Darvishzadeh, R. (2014). Antioxidant activity and phenolic profile of different parts of Bene (*Pistacia atlantica* subsp. *kurdica)* fruits. Food chemistry, 145: 306-311.

Hatamnia, A.A., malekzadeh, P., Nourollahi, Kh. and Valadbeigi, V. (2015). A study on phenolic compounds content and antioxidant activity of kolkhoung (*Pistacia khinjuk* Stocks) leaf in natural habitat of Ilam province. Journal of Iranian Plant Ecophysiological Research, 40: 31-40.

Hertog, M.G., Hollman, P.C. and Venema, D.P. (1992). Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40(9): 1591-1598.

Heim, K.E., Tagliaferro, A.R. and Bobilya, D.J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. The Journal of nutritional biochemistry, 13(10): 572-584.

Hu, F.B. and Willett, W.C. (2002). Optimal diets for prevention of coronary heart disease. Jama, 288(20): 2569-2578.

Huang, D., Ou, B. and Prior, R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. Journal of agricultural and food chemistry, 53(6): 1841-1856.

Kaur, C. and Kapoor, H.C. (2001). Antioxidants in fruits and vegetables–the millennium's health. International journal of food science & technology, 36(7): 703-725.

Lenucci, M.S., Cadinu, D., Taurino, M., Piro, G. and Dalessandro, G. (2006). Antioxidant composition in cherry and high-pigment tomato cultivars. Journal of agricultural and food chemistry, 54(7): 2606-2613.

Marcocci, L., Packer, L., Droy-Lefai, M.T., Sekaki, A. and Gardes-Albert, M. (1994). Antioxidant action of *Ginkgo biloba* extracts EGb 761. Methods in Enzymology, 234: 462-475.

Milbury, P.E., Chen, C.Y., Dolnikowski, G.G. and Blumberg, J.B. (2006). Determination of flavonoids and phenolics and their distribution in almonds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54(14): 5027-5033.

Moure, A., Pazos, M., Medina, I., Domínguez, H. and Parajó, J.C. (2007). Antioxidant activity of extracts produced by solvent extraction of almond shells acid hydrolysates. Food Chemistry, 101(1): 193-201.

Rababah, T.M., Hettiarachchy, N.S. and Horax, R. (2004). Total phenolics and antioxidant activities of fenugreek, green tea, black tea, grape seed, ginger, rosemary, gotu kola, and ginkgo extracts, vitamin E, and tert-butylhydroquinone. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52(16): 5183-5186.

Rahemi, A., Fattahi Moghaddam, M.R., Ebadi, A., Taghavi, T. and Hassani, D. (2011). Fruit Characteristics of some Wild Almonds in Iran. Seed and Plant Improvement Journal, 27(4): 459-481.

Rajaei, A., Barzegar, M., Mobarez, A.M., Sahari, M.A. and Esfahani, Z.H. (2010). Antioxidant, anti-microbial and antimutagenicity activities of pistachio (*Pistachia vera*) green hull extract. Food and Chemical Toxicology, 48(1): 107-112.

Ryan, D., Robards, K., Prenzler, P. and Antolovich, M. (1999). Applications of mass spectrometry to plant phenols. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 18(5): 362-372.

Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J.A. and Saura-Calixto, F. (1999). Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. Food Research International, 32(6): 407-412.

Sfahlan, A.J., Mahmoodzadeh, A., Hasanzadeh, A., Heidari, R. and Jamei, R. (2009). Antioxidants and antiradicals in almond hull and shell (*Amygdalus communis* L.) as a function of genotype. Food Chemistry, 115(2): 529-533.

Tlili, N., Kirkan, B. and Sarikurkcu, C. (2019). LC–ESI–MS/MS characterization, antioxidant power and inhibitory effects on α-amylase and tyrosinase of bioactive compounds from hulls of *Amygdalus communis*: The influence of the extracting solvents. Industrial crops and products, 128: 147-152.

Tomaino, A., Martorana, M., Arcoraci, T., Monteleone, D., Giovinazzo, C. and Saija, A. (2010). Antioxidant activity and phenolic profile of pistachio (*Pistacia vera* L., variety Bronte) seeds and skins. Biochimie, 92(9): 1115-1122.

Tsantili, E., Shin, Y., Nock, J.F. and Watkins, C.B. (2010). Antioxidant concentrations during chilling injury development in peaches. Postharvest Biology and Technology, 57(1): 27-34.

Wijeratne, S.S., Abou-Zaid, M.M. and Shahidi, F. (2006). Antioxidant polyphenols in almond and its coproducts. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54(2): 312-318.

Wu, H.C., Chen, H.M. and Shiau, C.Y. (2003). Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). Food Research International, 36(9-10): 949-957.