نشریه فیزیولوژی محیطی گیاهی، سال دهم، شماره ۴۰، زمستان ۱۳۹۴ / صفحات: ۴۰-۳۱

مطالعه محتوی ترکیبات فنلی و فعالیت ضداکسایشی برگ درخت کلخونگ (*Pistacia khinjuk* Stocks.) در رویشگاه‌های طبیعی استان ایلام

علی‌اصغر حاتم‌نیا*[1]، پرویز ملک‌زاده[2]، خشنود نورالهی[3]، طاهره ولدبیگی[4]

[1]استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ایلام

[2]استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه قم

[3]استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام

[4]استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ایلام

تاریخ دریافت: ۹٤/۸/۲۷ تاریخ پذیرش:۹٤/۱۲/٦

چکیده

در این مطالعه محتوی فنل و فلاوونوئید کل و فعالیت ضداکسایشی در چهار ژنوتیپ کلخونگ در رویشگاه‌های طبیعی استان ایلام مورد ارزیابی قرار گرفت. فعالیت ضداکسایشی عصاره‌های متانولی برگ به وسیله ظرفیت جمع آوری رادیکال DPPH، ظرفیت جمع آوری رادیکال نیتریت و سنجش FRAP بررسی گردید. در میان نمونه‌های آزمایش شده، عصاره برگ ژنوتیپ‌های K3 و K4 به‌ترتیب دارای بیشترین و کمترین میزان محتوی فنل و فلاوونوئید کل بودند. نتایج نشان داد در میان همه ژنوتیپ‌های مطالعه شده بیشترین و کمترین فعالیت ضداکسایشی به ترتیب در ژنوتیپ‌های K3 و K4 مشاهده شد. طبق نتایج به‌دست آمده محتوی فنل و فلاوونوئید کل و فعالیت ضد اکسایشی در کلخونگ تحت عوامل مختلفی از قبیل عوامل ژنتیکی، محیطی و اکولوژیکی قرار می‌گیرد. به‌طوری‌که میزان محتوی فنل و فلاوونوئید کل و فعالیت ضداکسایشی در برگ کلخونگ با افزایش ارتفاع بیشتر شده و بیشترین میزان این ترکیبات در ژنوتیپ K3 در ارتفاع ۲۰۸۳ متر (کوه قلارنگ) مشاهده گردید. به هر حال، نتایج به‌دست آمده از این تحقیق نشان داد که ژنوتیپ K3 دارای بیشترین میزان محتوی فنل و فلاوونوئید کل بوده و به‌طور جالب توجه‌ای این ژنوتیپ در میان همه ژنوتیپ‌های مورد مطالعه دارای بیشترین فعالیت ضداکسایشی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: برگ، فعالیت ضداکسایشی، کلخونگ، محتوی فلاوونوئید کل، محتوی فنل کل

مقدمه

کلخونگ (*Pistacia khinjuk* Stocks) متعلق به خانواده Ancardiaceae و از جنس پسته می‌باشد. جنس پسته دارای ۱۱ گونه می‌باشد که در میان آنها سه گونه *P. vera*، *P. khinjuk* و *P. atlantica* در ایران وجود دارند. دو گونه *P. Khinjuk* و *P. atlantica* به‌ترتیب به کلخونگ و بنه معرف هستند و در ایران به‌صورت وحشی رشد می‌کنند. وسعت درختان کلخونگ حدود ۷۰۰ هزار هکتار می‌باشد و عمدتاً در نواحی غربی، جنوب غربی، مرکزی و شرقی کشور دیده می‌شود (توکلی و همکاران، ۱۳۹۲).

کلخونگ که در استان ایلام به اسم محلی "گنوشک نرمه" معرف می‌باشد از لحاظ ظاهری شبیه بنه (با اسم محلی گنوشک سخته) است. میوه کلخونگ همچون بنه دارای سه قسمت پوست سبز

*نویسنده مسئول: hatamniya60@gmail.com

بیرونی، پوست سخت وچوبی داخلی و قسمت مغز می‌باشد که نسبت به بنه کوچکتر و نرمتر می‌باشد. کلخونگ دارای کاربردهای غذایی و دارویی فراوانی می‌باشد. صمغ حاصل از درخت کلخونگ را سقز می‌نامند، که دارای خواص خوراکی، دارویی و صنعتی (تهیه آدامس، صنایع داروسازی، لاک، رنگ و پلیمر) فراوان است (Hatamnia et al., 2016a).

رادیکال‌های آزاد طی پدیده‌های بیوشیمیایی طبیعی بدن تولید می‌شوند و افزایش مقدار آنها در داخل بدن می‌تواند سبب آسیب رساندن به لیپیدها، غشاها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک گردد و در نتیجه باعث ایجاد طیفی از بیماری‌های مختلف مانند سرطان‌ها، بیماری‌های قلبی- عروقی، التهابی و غیره شوند (Kaur and Kapoor, 2001; Hu and Willett, 2002). از طرف دیگر، این احتمال و گمان وجود دارد که بسیاری از ضداکساینده‌های سنتتیک که به‌طور گسترده‌ای در صنایع غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد سبب اثرات منفی روی سلامتی شوند، بنابراین به این دلیل گرایش به استفاده از ضداکساینده‌های طبیعی روز به روز رو به افزایش است. از این رو، در سال‌های اخیر مطالعات فراوانی روی ترکیبات ثانویه گیاهی صورت گرفته است که بتوانند به‌عنوان ضداکساینده با بیماری‌های مختلف مقابله نمایند، علاوه بر این این ثابت شده است که اثرات ضداکسایشی ترکیبات گیاهی به‌طور عمده به‌علت ترکیبات فنلی و فلاوونوئیدی می‌باشد. در میان گونه‌های گیاهی که حاوی ضداکسایندههای طبیعی هستند، گونه‌های مربوط به جنس پسته به‌عنوان منابع قابل توجه از ترکیبات فنلی شناخته‌اند و مطالعات روی این گونه‌ها در حال افزایش است. با این وجود مطالعات صورت گرفته روی گونه کلخونگ بیشتر روی ترکیبات اسیدهای چرب و اسانس میوه (Ghasemi Pirbalouti and Aghaee, 2011; Tavakoli and Haddad Khodaparast, 2013: Tavakoli et al., 2013) انجام شده است. به هر حال مطالعات صورت گرفته روی ترکیبات فنلی کلخونگ به‌عنوان ضد اکساینده انگشت شمار می‌باشد (Azadpour et al., 2015; Hatamnia et al., 2016a).

رشد و عملکرد گیاهان در رویشگاه‌های طبیعی تحت تأثیر فاکتورهای مختلفی از قبیل نوع ژنوتیپ، نوع اقلیم و ارتفاع از سطح دریا قرار دارد و هر یک از این عوامل می‌تواند تأثیر بسزایی بر کمیت و کیفیت محصول گیاهان داشته باشد (نجار فیروزجایی و همکاران، ۱۳۹۳؛ سروری و همکاران، ۱۳۹٤). تحقیقات نشان داده است که عوامل ژنتیکی و محیطی تأثیر معنی داری بر روی ترکیبات ثانویه دارند. از بین عوامل محیطی می‌توان به افزایش ارتفاع از سطح دریا اشاره کرد، به طوری‌که محققین نشان داده‌اند که با افزایش ارتفاع میزان ترکیبات فنلی و فلاوونوئیدی و همچنین خواص ضداکسایشی افزایش می‌یابد (Ghasemi et al., 2011; Tajali and Khazaeipoor, 2002). بنابراین هدف از مطالعه حاضر بررسی محتوی ترکیبات فنلی و فعالیت ضداکسایشی برگ چندین ژنوتیپ کلخونگ و همچنین ارزیابی نقش عوامل مختلف اکولوژیکی و محیطی روی فعالیت ضداکسایشی و میزان محتوی این ترکیبات بود.

مواد و روش‌ها

محل نمونه‌برداری: برگ‌های کلخونگ از چهار رویشگاه از استان ایلام در شهریورماه سال ۱۳۹۲ جمع‌آوری شدند (جدول ۱).

جدول ۱: مشخصات مربوط به رویشگاه‌های ژنوتیپ‌های مختلف *P.khinjuk*

ژنوتیپ	منطقه	ارتفاع از سطح دریا (متر)	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی
K1	آسمان آباد- کوه قلاجه	۱۸۱۵	۴۶° ۲۴'	۳۳° ۵۶'
K2	آسمان آباد- کوه نثار	۱۵۰۱	۴۶° ۲۳'	۳۳° ۵۳'
K3	ایلام- کوه قلارنگ	۲۰۸۳	۴۶° ۳۳'	۳۳° ۳۸'
K4	سرابله- بیجنوند	۱۱۵۳	۴۶° ۵۷'	۳۳° ۴۲'

تهیه عصاره گیاهی: پس از برداشت، نمونه‌ها در دمای اتاق به‌طور کامل خشک شدند. بعد از آن نمونه‌ها آسیاب شده و به‌صورت پودر نرم در آمدند. سپس این نمونه‌ها تا موقع عصاره‌گیری در دمای اتاق نگهداری شدند. ۱/۵ گرم از پودرهای آماده شده‌ی برگ‌ها درون دستگاه سوکسله و با استفاده از ۲۵ میلی‌لیتر متانول در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و به‌مدت ۳۰ دقیقه عصاره‌گیری صورت گرفت (Wijeratne et al., 2006).

تعیین محتوای فنل کل: برای اندازه‌گیری محتوای فنل کل عصاره‌ها از روش Tsantili و همکاران (۲۰۱۰) با اندکی تغییرات استفاده شد. به این ترتیب که ۲/۶ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۲ میلی‌لیتر شناساگر فولین- سیوکالتئو (FCR) به ۰/۲ میلی‌لیتر از عصاره مورد نظر اضافه و کاملا مخلوط شد. بعد از ۳ دقیقه ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷ درصد به آن اضافه شد و به‌صورت دوره‌ای به‌مدت ۲ ساعت در دمای اتاق بهم زده شد. با گذشت ۹۰ دقیقه جذب مخلوط در دمای اتاق و 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.

تعیین محتوای فلاوونوئیدی کل: محتوی فلاوونوئید موجود در عصاره‌ها طبق روش Lenucci و همکاران (۲۰۰۶) با اندکی تغییرات سنجیده شد. به این صورت که ۱/۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۰۷ میلی‌لیتر نیتریت سدیم ۵ درصد به ۰/۲۵ میلی‌لیتر از عصاره‌های ۱۰ برابر رقیق شده اضافه و مخلوط شد. و بعد از زمان ۵ دقیقه ۰/۱۵ میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد به آن اضافه شد و اجازه داده شد تا واکنش کامل شود. بعد از زمان ۶ دقیقه، ۰/۵ میلی‌لیتر هیدرواکسید سدیم یک مولار به آن اضافه شد. در پایان به تمامی لوله‌های آزمایش یک میلی‌لیتر آب مقطر اضافه و بلافاصله جذب آن بوسیله‌ی دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۰nm سنجیده شد و مقدار آن با استفاده از منحنی استاندارد کاتچین محاسبه گردید.

ظرفیت جمع‌آوری رادیکال نیتریت: برای محاسبه ظرفیت جمع‌آوری رادیکال نیتریت از واکنش Griess Illosvoy استفاده شد (Garrat, 1964). ۲ میلی‌لیتر سدیم نیتروپروسید (۱۰ میلی‌مولار) و ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات سالین به ۵۰ میکرولیتر از عصاره‌ها اضافه گردید، سپس در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵۰ دقیقه انکوبه شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از مخلوط واکنش به یک میلی‌لیتر از معرف سولفانیلیک اسید (۰/۳۳ درصد در استیک اسیدگلاسیال 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 سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری گردید. در پایان به تمامی مخلوط‌های واکنش ۲ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه، و جذب محلول در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شد. درصد جمع‌آوری از رابطه‌ی زیر بدست آمد.

$$\text{درصد جمع‌آوری رادیکال نیتریت} = \frac{\text{جذب مخلوط واکنش همراه عصاره} - \text{جذب مخلوط واکنش بدون عصاره}}{\text{جذب مخلوط واکنش بدون عصاره}} \times 100$$

ظرفیت جمع‌آوری رادیکال DPPH: برای سنجش میزان جمع‌آوری رادیکال DPPH از روش Wu و همکاران (۲۰۰۳) با اندکی تغییرات استفاده شد. طبق این روش ۱/۵ میلی‌لیتر از DPPH (۰/۱۵ میلی‌مولار در اتانول ۹٦ درصد) به ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره‌ها اضافه گردید. سپس بعد از انکوبه کردن در تاریکی به‌مدت ۳۰ دقیقه جذب آن در ۵۱۵ نانومترخوانده شد. سپس درصد جمع‌آوری رادیکال DPPH با رابطه زیر محاسبه گردید:

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

EC_{50} غلظتی از عصاره بوده که در آن غلظت میزان جمع آوری رادیکال ۵۰ درصد بوده است.

سنجش FRAP: قدرت احیاکنندگی عصاره‌های قسمت‌های مختلف میوه با استفاده از سنجش FRAP[1] بر اساس روش Nilsson و همکاران (۲۰۰۵) تعیین گردید. ۳ میلی‌لیتر از معرف FRAP به ۵۰ میکرولیتر از عصاره‌های تهیه شده اضافه و کاملاً مخلوط شد. سپس در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه گردید و جذب واکنش در ۵۹۳ نانومتر اندازه‌گیری شد و میزان قدرت احیاء کنندگی آن را با استفاده از منحنی استاندارد اسید آسکوربیک محاسبه شد.

در این تحقیق اختلاف بین انواع ژنوتیپ‌ها با استفاده از آنالیز واریانس تک سویه (ANOVA) و تست Tukey در سطح آماری ۵ درصد (P<۰/۰۵) آنالیز و معنی‌دار گردید. همبستگی بین پارامترهای مختلف مورد مطالعه بررسی شد. برای رسم نمودارها از نرم افزار SPSS استفاده گردید.

نتایج

مقایسه محتوی فنل کل مربوط به عصاره‌های برگ ژنوتیپ‌های مختلف کلخونگ در جدول ۲ نشان داده شده است. اختلاف معنی‌داری در سطح آماری ۵ درصد (P<۰/۰۵) در محتوی فنل کل عصاره‌های مختلف مشاهده شد، به‌طوری‌که بیشترین و کمترین میزان فنل کل در عصاره برگ ژنوتیپ‌های K3 (۵۳/٤٤ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم ماده خشک) و K4 (٤٤/۸۹ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم ماده خشک) مشاهده شد.

مقایسه میانگین‌ها نشان داد که اختلاف معنی داری در محتوی فلاوونوئید کل در سطح آماری ۵ درصد (P<۰/۰۵) در بین ژنوتیپ‌های مختلف وجود دارد. نتایج مربوط به محتوی فلاوونوئید کل ژنوتیپ‌های مختلف کلخونگ در جدول ۲ ارائه شده است. یافته‌ها نشان دادند که عصاره برگ ژنوتیپ K3 با مقدار ۲/۹٦ میلی‌گرم کاتچین بر گرم ماده خشک بیشترین محتوی فلاوونوئید و عصاره برگ ژنوتیپ K4 با مقدار ۱/۸٤ میلی‌گرم کاتچین بر گرم ماده خشک کمترین محتوی فلاوونوئید را به خود اختصاص داده‌اند.

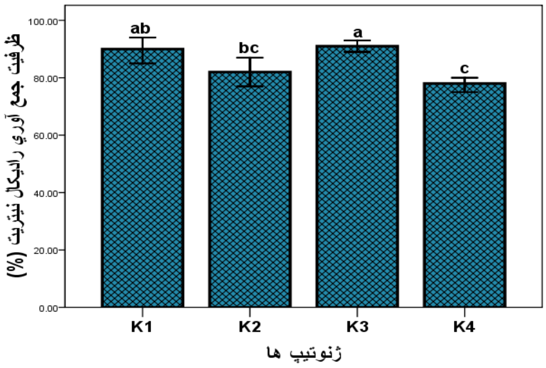
1.Ferric Reducing Antioxidant Power

جدول ۲: محتوی فنل (میلی‌گرم گالیک اسید/ گرم ماده خشک) و فلاوونوئید (میلی‌گرم کاتچین/ گرم ماده خشک) مربوط به عصاره‌های برگ ژنوتیپ‌های مختلف کلخونگ. داده‌ها بر اساس میانگین± انحراف معیار می‌باشد.

ژنوتیپ	محتوی فنل کل	محتوی فلاوونوئید
K1	٥٠/٨٨ ±١/٤١ ab	٢/٩٤ ±٠/١٣ a
K2	٤٨/٢٣ ±١/١٨ ab	١/٩٦ ±٠/١٠ b
K3	٥٣/٤٤ ±١/٨١ a	٢/٩٦ ±٠/١٢ a
K4	٤٤/٨٩ ±١/١٧ b	١/٨٤ ±٠/٠٧ b
میانگین	٤٩/٣٦ ±١/١٣	٢/٤٢ ±٠/١٦

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

شکل ۱ آنالیز آماری ظرفیت جمع آوری رادیکال نیتریت را نشان می‌دهد. نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بیشترین و کمترین میزان ظرفیت جمع آوری رادیکال نیتریت به ترتیب در عصاره برگ ژنوتیپ‌های K3 (۹۱/۵ درصد) و K4 (۷۸/٤ درصد) مشاهده شد. نتایج حاصله نشان داد که همبستگی مثبتی و معنی‌داری بین ظرفیت جمع‌آوری رادیکال نیتریت با محتوی فنل کل (r=۰/٦۹۵) و محتوی فلاوونوئید کل (r=۰/۸۵۸) مشاهده گردید (جدول ٤).

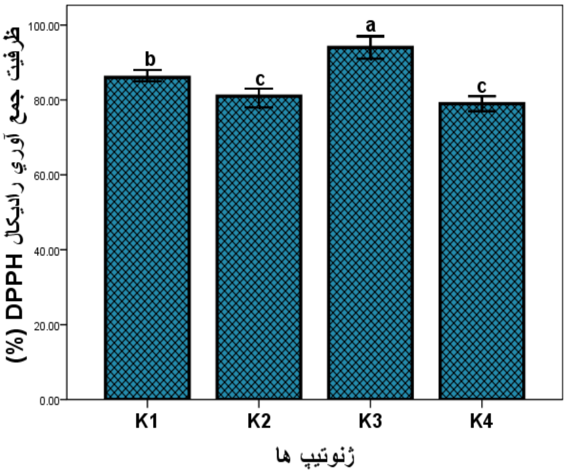


شکل ۱: ظرفیت جمع‌آوری رادیکال نیتریت (٪) در برگ ژنوتیپ‌های مختلف کلخونگ. ستون‌های عمودی نشانگر میانگین و انحراف معیار هستند. میانگین‌هایی که دارای حروف متفاوتی هستند دارای تفاوت آماری در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشند.

نتایج مربوط به ظرفیت جمع آوری رادیکال DPPH در شکل ۲ ارائه شده است. نتایج مقایسه میانگین نشان داد که ژنوتیپ‌های مختلف از نظر فعالیت ظرفیت جمع‌آوری رادیکال DPPH تفاوت معنی‌داری نشان داده‌اند، به‌طوری‌که بیشترین میزان فعالیت ظرفیت جمع‌آوری رادیکال DPPH به‌ترتیب در ژنوتیپ‌های K3 (۹٤/٤ درصد)، K1 (۸٦/۸ درصد)، K2 (۸۱/۳ درصد) و K4 (۷۹/۷ درصد) مشاهده شد. همبستگی مثبت و معنی‌داری بین ظرفیت جمع‌آوری رادیکال DPPH با محتوی فنل کل (r=۰/۸۲۷) و محتوی فلاوونوئید کل (r=۰/۸٤٦) مشاهده گردید (جدول ٤).

همان‌گونه که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، ژنوتیپ‌های مختلف کلخونگ از نظر میزان شاخص EC_{50} تفاوت معنی‌داری نشان داده‌اند. میزان شاخص EC_{50} برای عصاره برگ ژنوتیپ‌های K1، K2، K3 و K4 به ترتیب ۰/۱۲۷، ۰/۲۵۸، ۰/۰۹۵ و ۰/۳۵٦ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. میزان شاخص EC_{50} رابطه منفی با فعالیت‌های ضداکسایشی دارد، چنانچه میزان کمتر شاخص EC_{50} نشان دهنده فعالیت ضداکسایشی بالاتر و بر عکس می‌باشد. بنابراین در بین چهار ژنوتیپ مختلف عصاره برگی ژنوتیپ K3 با کمترین میزان شاخص EC_{50} (۰/۰۹۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بالاترین فعالیت ضداکسایشی و عصاره برگی ژنوتیپ K4 با کمترین میزان شاخص EC_{50} (۰/۳۵٦ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) را به خود اختصاص داده‌اند. نتایج حاصله نشان داد که همبستگی منفی و معنی داری بین شاخص EC_{50} با محتوی فنل کل

(r =-۰/۷۸٦) و محتوی فلاوونوئید کل (r =-۰/۹۱۲) مشاهده گردید (جدل ٤).



شکل ۲: ظرفیت جمع‌آوری رادیکال DPPH (درصد) در برگ ژنوتیپ‌های مختلف کلخونگ. ستون‌های عمودی نشانگر میانگین و انحراف معیار هستند. میانگین‌هایی که دارای حروف متفاوتی هستند دارای تفاوت آماری در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشند.

براساس نتایج به‌دست آمده از میزان سنجش FRAP، اختلاف معنی‌دار بین ژنوتیپ‌های مختلف در سطح احتمال ۵ درصد مشاهده شد (جدول ۳). به‌طوری‌که، بیشترین میزان سنجش FRAP در عصاره برگ ژنوتیپ K3 (۸/۹۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و کمترین میزان در عصاره برگ ژنوتیپ K4 (۷/۳۹ میلی‌گرم بر میلی لیتر) می‌باشد. همبستگی مثبت معنی‌داری بین محتوی فنل و فلاوونوئید کل و با سنجش FRAP (به‌ترتیب، r=۰/۷۹٦ و r=۰/۸۷۰) مشاهده گردید (جدول ٤).

جدول ۳: شاخص EC_{50} (میلی‌گرم/ میلی‌لیتر) مربوط به ظرفیت جمع‌آوری رادیکال DPPH و سنجش FRAP (میلی‌گرم/ میلی‌لیتر) مربوط به عصاره‌های برگ ژنوتیپ‌های مختلف کلخونگ. داده‌ها براساس میانگین ± انحراف معیار می‌باشد.

شاخص EC_{50} (ظرفیت جمع آوری رادیکال DPPH)	سنجش FRAP	ژنوتیپ
۰/۱۲۷ ±۰/۰۰٤ c	۸/۷٤ ±۰/۲۰ ab	K1
۰/۲۵۸ ±۰/۰۱۳ b	۷/٦۲ ±۰/٤٦ ab	K2
۰/۰۹۵ ±۰/۰۰۲ c	۸/۹۹ ±۰/۳۸ a	K3
۰/۳۵٦ ±۰/۰۱۵ a	۷/۳۹ ±۰/۲۸ b	K4
۰/۲۰۹ ±۰/۰۳۱	۸/۱۸ ±۰/۲۵	میانگین

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

جدول ٤: همبستگی بین محتوی فنل کل، محتوی فلاوونوئیدها، ظرفیت جمع‌آوری رادیکال نیتریت، ظرفیت جمع‌آوری رادیکال DPPH، سنجش FRAP و EC_{50} در برگ ژنوتیپ‌های مختلف کلخونگ.

	محتوی فنل کل	محتوی فلاوونوئید	ظرفیت جمع‌آوری رادیکال نیتریت	ظرفیت جمع‌آوری رادیکال DPPH	سنجش FRAP	EC_{50}
محتوی فنل کل	۱	*۰/۸٤۱	*۰/٦۹۵	**۰/۸۲۷	**۰/۷۹٦	**-۰/۷۸٦
محتوی فلاوونوئید		۱	*۰/۸۵۸	**۰/۸٤٦	**۰/۸۷۰	**-۰/۹۱۲
ظرفیت جمع‌آوری رادیکال نیتریت			۱	**۰/۸۵۷	*۰/٦۸٦	**-۰/۸۹۱
ظرفیت جمع‌آوری رادیکال DPPH				۱	**۰/۷٦۱	**-۰/۸۵۷
سنجش FRAP					۱	**-۰/۷۷۷
EC_{50}						۱

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

نتایج مربوط به ظریب همبستگی بین شاخص‌های مختلف ضداکسایشی نشان داد که همبستگی مثبت و معنی‌داری بین ظرفیت جمع‌آوری رادیکال نیتریت با ظرفیت جمع‌آوری رادیکال DPPH (r =۰/۸۵۷) و سنجش FRAP (r =۰/٦٨٦) مشاهده شد و همچنین بین ظرفیت جمع‌آوری رادیکال DPPH و سنجش FRAP (r =۰/٧٦١) همبستگی بالایی مشاهده گردید. بین شاخص EC_{50} با ظرفیت جمع‌آوری رادیکال نیتریت، ظرفیت جمع آوری رادیکال DPPH و سنجش FRAP همبستگی منفی و معنی‌دار (به‌ترتیب، r= −۰/۸۹۱، r= −۰/۸۵۷ و r= −۰/۷۷۷) بدست آمد (جدول ٤).

بحث

نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داده‌اند که اختلاف معنی‌داری در میزان محتوی فنل و فلاوونوئید کل در بین ژنوتیپ‌های مختلف کلخونگ وجود دارد، به‌طوری‌که بیشترین میزان محتوی فنل و فلاوونوئید کل در ژنوتیپ K3 و کمترین میزان در ژنوتیپ K4 مشاهده شد (جدول ۲). گزارش‌های مربوط به تحقیقات قبلی نشان می‌دهد که محتوی فنل و فلاوونوئید کل تحت تأثیر فاکتورهای مختلفی از قبیل عوامل ژنتیکی و شرایط محیطی و اکولوژیکی قرار می گیرند (Akbari et al., 2012; Hatamnia et al., 2014; Hatamnia et al., 2016b). بنابراین اختلاف در میزان محتوی فنل و فلاوونوئید کل در این ژنوتیپ‌ها را می‌توان به عوامل محیطی و اکولوژیکی نسبت داد. میزان این ترکیبات با افزایش ارتفاع از سطح دریا ارتباط مثبت و معنی‌داری است، به‌طوری‌که بیشترین میزان این ترکیبات در ژنوتیپ K3 (کوه قلارنگ، ارتفاع ۲۰۸۳ متر) و کمترین میزان در ژنوتیپ K4 (منطقه بیجنوند، ارتفاع ۱۱۵۳ متر) مشاهده گردید. مطالعات نجار فیروزجایی و همکاران (۱۳۹۳) نیز نشان می‌دهد که عوامل محیطی و زیستگاه روی میزان ترکیبات ثانویه تأثیر گذار می‌باشد که در موافقت با نتایج این تحقیق است. ترکیبات فنلی و فلاوونوئیدی دارای فعالیت‌های بیولوژیکی متنوعی از قبیل فعالیت-های ضداکسایشی، ضدباکتریایی، ضدالتهابی و... می-باشند که این فعالیت‌ها را می‌توان به ظرفیت جمع آوری رادیکال‌های آزاد توسط این ترکیبات نسبت داد (Amarowicz et al., 2004; Chen et al., 2005)، به-طوری‌که تحقیقات متعددی نشان می‌دهند که بین محتوی فنل کل و فعالیت جمع آوری رادیکال‌های آزاد رابطه مستقیمی وجود دارد (Akbari et al., 2012; Gourine et al., 2010; Hatamnia et al., 2014; Hatamnia et al., 2016a, 2016b).

نیتریک اکسید با اکسیژن واکنش داده و رادیکال نیتریت را تشکیل می‌دهد، از طرف دیگر مواد ضداکساینده مانند ترکیبات فنلی و فلاوونوئیدی نیز می‌توانند با اکسیژن ترکیب شده 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 (Marcocci et al., 1994). در این تحقیق بین ظرفیت جمع‌آوری رادیکال نیتریت و محتوی فنل و فلاوونوئید کل همبستگی مثبت معنی‌داری بدست آمد، که این نتایج بیانگر این واقعیت است که ژنوتیپ K3 با میزان فنل و فلاوونوئید بالاتر دارای ظرفیت جمع آوری رادیکال نیتریت بیشتری می‌باشد (شکل ۱).

در سنجش DPPH، رادیکال DPPH توسط یک ترکیب ضداکساینده مانند ترکیبات فنلی و فلاوونوئیدی احیاء شده و به شکل خنثی تبدیل می‌گردد. این ترکیبات با دادن یک اتم هیدروژن به رادیکال DPPH سبب تبدیل آن به فرم احیاء شده می‌شوند (Sanchez-Moreno et al., 1999; Huang et al., 2005). عوامل ژنوتیپی، شرایط اکولوژیکی و

محیطی گیاه می‌تواند روی تولید ترکیبات فنلی و فلاوونوئیدی و در نهایت روی میزان فعالیت ضداکسایشی قسمت‌های مختلف گیاه تاثیر گذار باشد (Kalt, 2005; Akbari et al., 2012; Hatamnia et al., 2014). بنابراین، همان طوری‌که نتایج نشان داده‌اند ظرفیت جمع‌آوری رادیکال DPPH در بین ژنوتیپ‌های مختلف با شرایط محیطی متفاوت دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشد، به‌طوری‌که بیشترین میزان ظرفیت جمع‌آوری رادیکال DPPH در ژنوتیپ K3 در ارتفاع ۲۰۸۳ متری مشاهده شد که می‌توان به علت محتوی فنل و فلاوونوئید بالا در این ژنوتیپ باشد (شکل ۲).

نتایج این تحقیق نشان داد که خاصیت احیاء کنندگی ارتباط مستقیمی با شرایط محیطی داشته به طوری‌که ژنوتیپ‌های مختلف با شرایط محیطی متفاوت دارای تفاوت‌های معنی داری از لحاظ سنجش FRAP بوده و با افزایش ارتفاع میزان قدرت احیاء کنندگی نیز افزایش می‌یابد. Gourine و همکاران (۲۰۱۰) نیز نشان دادند که خاصیت احیاء کنندگی عصاره‌های برگ *Pistacia atlantica* متأثر از شرایط محیطی و اکولوژیکی است.

وجود همبستگی منفی و معنی دار بین شاخص EC_{50} با سنجش‌های مختلف اندازه‌گیری فعالیت ضداکسایشی بیان کنندهٔ این واقعیت است که شاخص EC_{50} با فعالیت ضد اکسایشی رابطهٔ معکوس دارد، به‌طوری‌که شاخص EC_{50} پایین تر نشان دهنده فعالیت ضداکسایشی بالاتر و بر عکس می‌باشد. نتایج این تحقیق نشان داد که همبستگی مثبت و معنی داری بین سه سنجش مختلف اندازه گیری شده (ظرفیت جمع آوری رادیکال DPPH، ظرفیت جمع آوری رادیکال نیتریت و سنجش FRAP) وجود دارد که این همبستگی زیاد بیانگر این واقعیت می‌باشد که این سه سنجش مختلف روش‌های مناسب و ایده‌آلی جهت بررسی فعالیت ضداکسایشی می‌باشد (آقایی و همکاران، ۱۳۹٤: حاتم نیا و ملک زاده، ۱۳۹٤).

نتیجه‌گیری نهایی

در این تحقیق همبستگی بالایی بین محتوی فنل و فلاوونوئید کل با فعالیت ضداکسایشی مشاهده شد، به‌طوری‌که ژنوتیپ K3 با بالاترین میزان محتوی فنل و فلاوونوئید کل دارای بیشترین فعالیت ضداکسایشی بود. بنابراین می‌توان فعالیت ضداکسایشی را به میزان بالای این ترکیبات نسبت داد. با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان بیان کرد که میزان ترکیبات فنلی، فلاوونوئیدی و در نتیجه فعالیت ضداکسایشی به فاکتورهای مختلفی از جمله عوامل ژنتیکی و شرایط محیطی و اکولوژیکی بستگی دارد، به‌طوری‌که در این تحقیق میزان ترکیبات فنلی، فلاوونوئیدی و فعالیت ضداکسایشی با افزایش ارتفاع بیشتر شد.

منابع

آقایی، ا.، درویش‌زاده، ر.، حاتم‌نیا، ع.ع. و عباسی، ن. (۱۳۹٤). سنجش فعالیت ضداکسایشی و محتوی فنل کل در قسمت‌های مختلف دانه چهار ژنوتیپ آفتابگردان (*Helianthus annus* L.). فصلنامه فیزیولوژی محیطی گیاهی. شماره ۳۸. سال دهم. جلد ۱. صفحات ۱۰-۱.

توکلی، ج.، حداد خداپرست، م.ح.، اسماعیل‌زاده کناری، ر.، امین‌لاری، م. و شریف، ع. (۱۳۹۲). بررسی قدرت آنتی‌اکسیدانی روغن پوست کلخونگ به‌عنوان منبع غذایی جدید در ایران. نشریه پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران. جلد ۹. شماره ۱. صفحات ٦۷-٦۱.

حاتم نیا، ع.ع. و ملک‌زاده، پ. (۱۳۹٤). سنجش میزان محتوی فنل کل و فعالیت ضداکسایشی در قسمت‌های

مختلف میوه بنه (*Pistacia atlantica* subsp. *Kurdica*). فصلنامه فیزیولوژی محیطی گیاهی. سال دهم. شماره ۳۷. جلد ۱. صفحات ۸-۱.

سروری، ا.، دیانتی تیلکی، ق.، رضایی، م.ب. و زادبر، م. (۱۳۹٤). تاثیر برخی فاکتورهای محیطی بر کمیت و کیفیت اسانس گیاه *Stachys lavandifolia* vahl. در استان خراسان رضوی (چناران). فصلنامه اکوفیتوشیمی گیاهان دارویی. دوره ۳، شماره ۲. صفحات ۷-۱.

نجار فیروزجایی، م.، همتی، خ.، خراسانی‌نژاد، س.، دارائی‌گرمه‌خانی، ا. و باقری‌فرد، ا. (۱۳۹۳). اثر ارتفاع بر خصوصیات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی برگ گیاه گزنه (*Urtica dioica* L.) در استان‌های مازندران و گلستان. نشریه پژوهش‌های اکوفیزیولوژی گیاهی ایران. سال نهم. شماره ۳۵. شماره ۳. صفحات ۱۱-۱.

Akbari, V., Jamei, R., Heidari, R. and Jahanban Sfahlan, A. (2012). Antioxidant activity of different parts of Walnut (*Juglans regia* L.) fruit as a function of genotype. Food Chemistry. 135: 2404–2410.

Amarowicz, R., Pegg, R.B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B. and Weil, J.A. (2004). Free radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. Food Chemtry. 84: 551–562.

Azadpour, M., Rezaei, M., Taati, M., Ghasemi Dehnoo, M. and Ezatpour, B. (2015). Antioxidant, antibacterial, and wound-healing properties of methanolic extract of *Pistacia khinjuk*. Comparative Clinical Pathology. 24(2): 379–385.

Chen, C-Y., Milbury, P.E., Lapsley, K. and Blumberg, J.B. (2005). Flavonoids from almond skins are bioavailable and act synergistically with vitamins C and E to enhance hamster and human LDL resistance to oxidation. Journal of Nutrition. 135: 1366–1373.

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

Ghasemi, K., Ghasemi, Y., Ehteshamnia, A., Nabavi, M., Nabavi, F., Ebrahimzadeh, A. and Pourmand, F. (2011). Influence of environmental factors on antioxidant activity, phenol and flavonoid content of walnut. Medicinal Plant. 5(7): 1128–1133.

Ghasemi Pirbalouti, A. and Aghaee, K. (2011). Chemical Composition of Essential Oil of *Pistacia khinjuk* Stocks grown in Bakhtiari Zagross Mountains, Iran. Electronic Journal of Biology. 7(4): 67–69.

Gourine, N., Yousfi, M., Bombarda, I., Nadjemi, B., Stocker, P. and Gaydou, E.M. (2010). Antioxidant ativities and chemical composition of essential oil of *Pistacia atlanticafrom* Algerian. Industrial Ctops and Products. 31:203–208.

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., Rostamzad, A., Malekzadeh, P., Darvishzadeh, R., Abbaspour, N., Hosseini, M., Nourollahi, Kh. and Sheikh Akbari Mehr, R. (2016a). Antioxidant activity of different parts of *Pistacia khinjuk* Stocks fruit and its correlation to phenolic composition. Natural Product Research. Article in Press.

Hatamnia, A.A., Rostamzad, A., Hosseini, M., Abbaspour, N., Darvishzadeh, R., Malekzadeh, P. and Mohammad Aminzadeh, B. (2016b). Antioxidant capacity and phenolic composition of leaves from 10 Bene (*Pistacia atlantica* subsp. kurdica) genotypes. Natural Product Research. 30 (5): 600–604.

Hu, F.B. and Willett W.C. (2002). Optimal diets for prevention of coronary heart disease. Journal of the American Medical Informatics Association. 288: 2569–2578.

Huang, D., Ou, B. and Prior, R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53: 1841–1856.

Kalt, W. (2005). Effects of production and processing factors on major fruit and vegetable antioxidants. Journal of Food Science. 70: R11– R19.

Kaur, C. and Kapoor H.C. (2001). Antioxidants in fruits and vegetables – the millenium's health. International Journal of Food Science and Technology. 36: 70–725.

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: 398–415.

Nilsson, J., Pillai, D., Onning, G., Persson, C., Nilsson, A. and Akesson, B. (2005). Comparison of the 2,2'-azinobis-3-ethylbenzotiazo-line-6-sulfonic acid (ABTS) and ferric reducing anti-oxidant power (FRAP) methods to asses the total antioxidant capacity in extracts of fruit and vegetables. Molecular Nutrition & Food Research. 49: 239–246.

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.

Sanchez-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: 407–412.

Tajali, A. and Khazaeipoor, M. (2002). Effect of height and organs on flavonoids of *Crataegus microphylla.* International Journal of Biosciences. 7: 54–58.

Tavakoli, J. and Haddad Khodaparast, M.H. (2013). Evaluation the fatty acid composition of the oil from fruit hulls of two *Pistacia* species growing wild in Iran. Chemistry of Natural Compounds. 49: 83–84.

Tavakoli, J., Haddad Khodaparast, M.H., Aminlari, M., Esmaeilzadeh Kenari, R. and Sharif, A. (2013). Introduction *Pistacia khinjuk* (Kolkhoung) fruit hull oil as a vegetable oil with special chemical composition and unique oxidative stability. Chemistry of Natural Compounds. 49: 803–810.

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: 27–34.

Wijeratne, S.S.K., Abou-Zaid, M.M. and Shahidi, F. (2006). Antioxidant polyphenols in almond and its coproducts. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 54: 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: 949–957.