بررسی ترکیبات فنلی و عملکرد آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های آبی و متانولی برگ سه گونه از جنس *Pistacia* در منطقه سروستان شیراز

علی خدیو سروستانی[1]، محمود دژم[1*]

[1]دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فسا، فسا، ایران

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۲/۷ تاریخ پذیرش: ۹۳/۳/۲۱

چکیده

این پژوهش به‌منظور بررسی کمی و کیفی ترکیبات فنلی و توان آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های آبی و متانولی برگ گونه‌های پسته اهلی (*Pistacia vera* L.)، بنه (Desf. *Pistaciaatlantica*) و کلخنگ (*Pistacia khinjuk* Stocks) در باغات منطقه سروستان شیراز در بهار ۱۳۹۱ انجام شد. آنالیز عصاره‌ها با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارکرد بالا (HPLC) نشان داد که از نظر نوع و میزان ترکیبات فنلی تفاوت‌های زیادی بین عصاره‌های گونه‌های مختلف وجود دارد. بیشترین و کمترین میزان ترکیبات فنلی به ترتیب در عصاره متانولی بنه و عصاره آبی پسته و کلخنگ یافت شد. ترکیبات وانیلین و اسید گالیک در عصاره‌های آبی و متانولی هر سه گونه وجود داشتند در حالی که ترکیب اسید سینامیک فقط در عصاره های متانولی هر سه گونه یافت شد و از نظر مقدار نیز بالاترین غلظت را در بین سایر ترکیبات به خود اختصاص داد. در این پژوهش توان آنتی‌اکسیدانی با اندازه‌گیری میزان شکار رادیکال آزاد ۲،۲-دی‌فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH) ارزیابی گردید و نتایج نشان داد که توان آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها متفاوت بود و با افزایش غلظت، توانایی مهار رادیکال آزاد توسط عصاره‌ها افزایش یافت، به‌طوری‌که در غلظت ۳۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر عملکرد آنتی اکسیدانی عصاره های هر سه گونه بیشتر از استاندارد اسید گالیک بود. نتایج این پژوهش نشان داد که در بین عصاره‌های هر سه گونه، عصاره متانولی بنه دارای بیشترین توان آنتی‌اکسیدانی بود.

واژگان کلیدی: آنتی‌اکسیدان، بنه، پسته، ترکیبات فنلی و کلخنگ.

*نویسنده مسئول: mahmooddejam@yahoo.com

مقدمه

ترکیبات فنلی یکی از گسترده‌ترین گروه‌های مواد شیمیایی در گیاهان بوده و دارای اهمیت فیزیولوژیکی قابل ملاحظه‌ای می‌باشند و به نظر می‌رسد که اساس مولکولی تأثیر محافظت کنندگی ترکیبات فنلی در گیاهان وابسته به ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و توانایی شکار رادیکال‌های آزاد توسط آنها می‌باشد. تجمع ترکیبات فنلی با توجه به مرحله رشد، نمو و واکنش به تنش‌های محیطی کاملاً متفاوت بوده و میزان آنها در نتیجه توازن بین بیوسنتز و تجزیه آنها می‌باشد (Korkina, 2007). شواهد علمی نشان می‌دهد تنش اکسیداتیو که در نتیجه عدم توازن بین سطوح ملکول‌های اکسیدکننده و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی رخ می‌دهد می‌تواند منجر به برخی تغییرات بیوشیمیایی و در نتیجه بروز برخی بیماری‌ها و ناهنجاری‌ها در انسان شده و می‌تواند منجر به صدمه به زیست مولکول‌های اصلی نظیر چربی‌ها، پروتئین‌ها و DNA گردد. امروزه آشکار است که جهش‌زایی و دیگر اثرات منفی گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) در بیماری‌های مختلف در انسان نقش دارند. در دو دهه اخیر تاکید فراوانی بر جایگاه آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی شده است. در این میان ترکیبات فنلی نظیر توکوفرول‌ها (مثل ویتامین E و ترکیبات وابسته)، انواع مختلف فلاونوئیدها، اسید فلوئیک، تانن‌ها و لیگنان‌ها به‌عنوان منبع ملکول‌های فعال زیستی توجه زیادی به خود جلب نموده است. آنتی‌اکسیدان‌ها به‌دلیل ویژگی شکار رادیکال‌های آزاد به‌طور مستقیم ضد جهش‌زایی و ضدسرطان می‌باشند (Zayzafoon et al., 2010). این ترکیبات قادر به احیا رادیکال‌های آزاد نظیر سوپراکسید، پراکسیل و هیدروکسیل می‌باشند. علاوه بر اثرات شکارگری، این ترکیبات قادر به جلوگیری از فعالیت آنزیم‌ها و یا ترکیباتی می‌باشند که فرایندهای تولید ROS را کاتالیزور می‌نمایند (Abdelwahed et al., 2007).

گیاهان جنس پیستاسیا که متعلق به خانواده پسته (Anacardiaceae) می‌باشند دارای ۱۱ گونه بوده که همه آنها از خود، تربانتین یا سقز ترشح می‌کنند. بیشتر این گونه‌ها جنگلی بوده، برخی از آنها به‌عنوان گیاهان زینتی و پسته خوراکی به‌عنوان گیاهی اهلی و میوه‌ای خشکباری شناخته شده است (Amri et al., 2013).

وجود ترکیبات فنلی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی در بخش‌های مختلف گونه‌های جنس *Pistacia* گزارش شده است. در پژوهشی حضور ترکیبات فنلی مختلف شامل اسید گالیک، کورستین، لوتئولین و چبولنیک اسید (chebulenic acid) در گونه *P. integerrima* گزارش شده است (Hirori et al., 1996). Benhammou و همکاران (۲۰۰۶) گزارش کردند که در عصاره‌های اتانولی برگ دو گونه *P.lentiscus* و *P.atlantica* استفاده از روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) امکان شناسایی ترکیبات فلاونولی، اسیدفنلیکی، فلاونی، آنتوسیانی، اسید گالیک و اسیدپاراکوماریک را میسر ساخت و مشخص شد که عصاره هر دو گونه دارای قدرت احیاء کنندگی بالایی بودند و قدرت احیا کنندگی عصاره گونه *P.lentiscus* نسبت به *P.atlantica* بیشتر بود. Kayani و همکاران (۲۰۰۷) در پژوهشی میزان فنل کل شاخساره گیاه کلخنگ را ۲۳۰ میکروگرم معادل تانیک اسید بر گرم وزن گیاه گزارش کردند. Alai و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند که میزان فنل کل گونه‌ای از جنس پسته (*Pistacia palaestina* Boiss.) در عصاره‌های آبی و متانولی به‌ترتیب ۴۲/۵ و ۵۲/۳ میلی‌گرم معادل گالیک اسید در گرم وزن خشک و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در عصاره‌های آبی و متانولی آن به‌ترتیب ۵۴۹ و ۵۹۰/۹ میکرومول معادل ترولوکس (Trolox) در گرم وزن خشک بود. Peksel (۲۰۰۸) مقدار کل ترکیبات فنلی عصاره برگ بنه را به میزان ۲۳۷/۱۵ میکروگرم معادل پیروکاکچول بر یک میلی‌گرم عصاره گزارش کرد. در این پژوهش میزان فعالیت

ضدرادیکالی آن در غلظت ۱۵ میکروگرم در میلی‌لیتر معادل ۸۵ درصد بازداندگی بود و در مقاسیه با آنتی‌اکسیدان‌های شناخته شده مانند اسیدآسکوربیک، عصاره برگ بنه از توان آنتی‌اکسیدانی قابل ملاحظه‌ای برخوردار بود. Joshi و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که در گونه *P. integerrima* ترکیبات فنلی وجود داشته و میزان آنها در عصاره متانولی و فراکشن اتیل استاتی عصاره متانولی به‌ترتیب ٤/۲۹ و ٦/۸۲ درصد بود و عصاره‌ها توان آنتی‌اکسیدانی بالایی داشتند. Cherbal و همکاران (۲۰۱۲) در پژوهشی میزان فنل کل عصاره برگ گونه *P. lentiscus* را معادل ۱/۳۵±٦۳۲/۹ میلی‌گرم معادل گالیک اسید در گرم عصاره گزارش کردند. در این پژوهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ‌های این گونه در غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ۷٦/٤ درصد شکار ترکیب DPPH بود که نسبت به ترکیب استاندارد اسید گالیک کمتر ولی با ترکیب استاندارد آلفا-توکوفرول برابری می‌نمود.

از آن جایی که در رابطه با توان آنتی اکسیدانی و میزان و نوع ترکیبات فنلی گونه‌های پسته اهلی (*Pistacia vera* L.)، بنه (Desf.*Pistaciaatlantica*) و کلخنگ (*Pistacia khinjuk*Stocks) گزارشات بسیار کمی وجود دارد، هدف از این پژوهش بررسی کمی وکیفی عصاره‌های آبی ومتانولی برگ این سه گونه با روش کروماتوگرافی مایع با کارکرد بالا (HPLC) و تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آنها بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: برگ‌های پسته اهلی رقم احمد آقایی از درختان ده ساله از باغات پسته شهرستان سروستان در ۷۵ کیلومتری جنوب شیراز و برگ‌های دو گونه بنه وکلخنگ از درختان بالغ در اطراف شهرستان سروستان با مختصات جغرافیایی طول شرقی ۵۳ درجه و ۱۳ دقیقه و عرض شمالی ۲۹ درجه و۱۷ دقیقه و ارتفاع ۱۵۷۰ متر از سطح دریا در بهار سال ۱۳۹۱ جمع‌آوری گردیدند. پس از شناسایی، نمونه‌هایی از هر سه گونه در هرباریوم دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فسا قرار داده شد.

تهیه عصاره‌ها: ابتدا برگ گونه‌های مورد نظر در سایه خشک شدند. جهت تهیه عصاره، ۱۰۰ گرم نمونه پودر شده از برگ هر گونه به نسبت ۱ به ۱۰ با آب یا متانول مخلوط گردید و به‌مدت یک ساعت روی شیکر قرار داده شد. نمونه‌ها به‌مدت ٢٤ ساعت در یخچال نگهداری شدند و مجدداً یک ساعت روی شیکر قرار گرفتند و در نهایت با استفاده از قیف بوخنر و کاغذ صافی (واتمن شماره ٤٢) و به کمک پمپ خلاء عصاره‌ها تهیه گردید. در ادامه عصاره‌های تهیه شده با استفاده از دستگاه روتاری و اپراتور مدل RV 10 کاملاً خشک شدند و وزن عصاره‌ها تعیین گردید.

اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH: ابتدا با استفاده از حلال متانول غلظت‌های مختلف عصاره‌ها و ترکیب استاندارد اسید گالیک ساخته شدند. ترکیب DPPH نیز با حلال متانول با غلظت ٤۰۰ پی‌پی‌ام تهیه شد. سپس غلظت‌های مختلف عصاره‌ها درون میکروپلیت ۹٦ تایی ریخته شد. برای هر غلظت ۸ خانه در نظر گرفته شد که ٤ خانه اول برای نمونه (sample) محتوی ۲۰ میکرولیتر عصاره + ۲۰۰ میکرولیتر DPPH و ٤ خانه دوم برای تصحیح (blank) محتوی ۲۰ میکرولیتر عصاره + ۲۰۰ میکرولیتر متانول بودند. برای شاهد (Control) نیز ٤ خانه محتوی۲۰ میکرولیتر متانول + ۲۰۰ میکرولیتر DPPH درنظر گرفته شد. پس از آن میکروپلیت ۹٦ تایی داخل میکروپلیت ریدر گذاشته شد تا ۱۰ ثانیه لرزانده شود و بعد از ۳۰

دقیقه جذب نمونه‌ها درطول موج ۵۱۵ نانومتر قرائت شد. پس از قرائت جذب نمونه‌ها درصد شکار رادیکال آزاد با فرمول زیر محاسبه شد.

A = (نمونه – تصحیح / شاهد) × ۱۰۰

درصد شکار رادیکال آزاد = A- ۱۰۰

سپس منحنی کالیبراسیون ترسیم و از روی معادله خط، میزان IC_{50} برای ترکیب استاندارد اسید گالیک وعصاره‌ها محاسبه گردیدودر آخر IC_{50} بدست آمده از ترکیب استاندارد و عصاره‌ها با هم مقایسه شدند (Bruits et al., 2001).

روش کروماتوگرافی مایع با کارکرد بالا: ابتدا ۱۵ گرم از هر نمونه پودرشده با ۱۵۰ میلی‌لیتر n–هگزان مخلوط شد و ۲٤ ساعت نگه‌داری گردید تا چربی‌زدایی صورت گیرد. سپس نمونه‌ها با کاغذ صافی جدا و در معرض هوا خشک گردید. پس از آن هر نمونه گیاهی به دو قسمت تقسیم شده و هر ۷/۵ گرم به‌صورت جداگانه با ۷۵ میلی‌لیتر حلال آب و یا متانول مخلوط شد و ۲٤ ساعت نگه‌داری گردید. درطی این ۲٤ ساعت هر نمونه ۱۵ دقیقه اولتراسونیک و ۷–٦ ساعت لرزانده شد و در بقیه مواقع در تاریکی نگهداری گردید. نمونه‌ها پس از ۲٤ ساعت از کاغذ صافی عبور داده شدند و محلول زیر کاغذ صافی با روتاری تغلیظ گردید. سپس ۰/۰۱ گرم از عصاره تغلیظ شده در ۱ میلی‌لیتر حلال (عصاره آبی در آب دیونیزه و عصاره متانولی در متانول) حل گردید و پس از عبور از فیلتر سرسرنگی ۰/۲۲ میکرومتری، ۲۰ میکرولیتر از آن به دستگاه HPLC تزریق شد. دستگاه مورد استفاده در این پژوهش Agilent سری ۱۲۰۰ بود که به یک تشخیص دهنده از نوع DAD در طول موج‌های ۲۸۰ و ۳۲۰ نانومتر مجهز بود. برای هر نمونه میزان ۲۰ میکرولیتر عصاره به فاز معکوس تزریق گردید که ستون آن از نوع Zorbaa eclipse با ابعاد ۵ میکرومتر (ID) و ۱۵۰× ٤/٦ میلی‌متر (FT) بود. فاز متحرک شامل ترکیبی از متانول و اسید فورمیک ۱ درصدبا نسبت‌های مختلف بود که در طی ۳۵ دقیقه با سرعت جریان یک میلی‌لیتر دردقیقه تزریق گردید. درجه حرارت آون در حد ۳۰ درجه سانتی‌گراد حفظ شد. ترکیبات فنلی استاندارد در این پژوهش شامل وانیلین، اسید سینامیک، اسید گالیک، کاتچین، اسید کافئیک، اسید کلروژنیک، روتین، کورستین، اسید پاراکوماریک و کارواکرول بودند. مساحت قله‌ها و زمان‌های بازداری با استفاده از نرم‌افزار Chemstation محاسبه گردید و مقادیر ترکیبات شناسایی شده درعصاره‌ها با مقایسه آنها با نمودارهای مربوط به ترکیبات استاندارد محاسبه شد و نتایج برحسب میلی‌گرم ترکیبات فنلی بر گرم وزن خشک ماده گیاهی گزارش گردید.

روش‌های آماری: داده‌های مربوط به درصد شکار رادیکال‌های آزاد توسط نمونه‌ها به وسیله نرم‌افزار SAS مورد تجزیه آماری قرار گرفت و میانگین تیمارها با آزمون دانکن در سطح ۵ درصد مقایسه شدند. همچنین انحراف معیارداده‌ها نیز محاسبه گردید.

نتایج

در این پژوهش، درصد بازده انواع عصاره‌های آبی و متانولی در سه گونه پسته، بنه و کلخنگ متفاوت بود. در مجموع بیشترین بازده عصاره به میزان ۳٦/۵۵ درصد مربوط به عصاره آبی بنه و کمترین آن به میزان ۲۰/۵ درصد مربوط به عصاره متانولی بنه بود. در پسته بازده عصاره‌های آبی ومتانولی به‌ترتیب ۲۰/۵۸ و۲۲ درصد و در کلخنگ بازده عصاره‌های آبی و متانولی به‌ترتیب ۲۱/٤٦ و۲٦ درصد بود.

نتایج این پژوهش نشان داد که توان آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های آبی و متانولی سه گونه پسته، بنه و کلخنگ در مقایسه با ترکیب استاندارد اسید گالیک متفاوت و در هر عصاره با افزایش غلظت، درصد شکار رادیکال

آزاد افزایش یافت به طوری که در تمامی عصاره‌ها بالاترین درصد مهار رادیکال آزاد در غلظت ۳۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد. مقایسه میانگین داده‌ها بین عصاره‌های مختلف سه گونه در هر غلظت تفاوت‌های معنی‌داری را نشان داد. در غلظت ۳۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره‌های آبی و متانولی هر سه گونه نسبت به اسیدگالیک از توان آنتی‌اکسیدانی بالاتری برخوردار بودند و تفاوت معنی‌داری را نسبت به اسید گالیک نشان دادند. در غلظت ۱۶۰۰ میلی‌گرم در لیتر، بالاترین توان آنتی‌اکسیدانی مربوط به عصاره‌های متانولی سه گونه و عصاره آبی بنه بود و عصاره آبی پسته کمترین توان آنتی‌اکسیدانی را از خود نشان داد. در غلظت ۸۰۰ میلی‌گرم در لیتر، بیشترین درصد شکار رادیکال آزاد مربوط به عصاره‌های متانولی بنه و کلخنگ و عصاره آبی بنه بود که با ترکیب اسید گالیک تفاوت معنی‌داری نداشتند. در این غلظت نیز کمترین توان آنتی‌اکسیدانی مربوط به عصاره آبی پسته بود. همین روند در غلظت‌های پایین‌تر نیز مشاهده گردید (جدول ۱). در نمودار ۱ مقادیر IC_{50} مربوط به عصاره‌های آبی و متانولی گونه‌های پیستاسیاآورده شده است. در این پژوهش در هر سه گونه عصاره‌های متانولی نسبت به عصاره‌های آبی در تمامی غلظت‌ها از توان آنتی‌اکسیدانی بالاتری برخوردار بودند. در بین عصاره‌ها کمترین میزان IC_{50} مربوط به عصاره متانولی بنه و بیشترین میزان آن مربوط به عصاره آبی پسته بود. هرچند تمامی عصاره‌ها نسبت به اسیدگالیک IC_{50} بیشتری داشتند.

جدول ۱: مقایسه توان آنتی‌اکسیدانی (درصد مهار رادیکال آزاد) عصاره‌های سه گونه مورد مطالعه

نوع عصاره	غلظت عصاره (میلی‌گرم در لیتر)					
	۳۲۰۰	۱۶۰۰	۸۰۰	۴۰۰	۲۰۰	۱۰۰
اسید گالیک	۹۰/۰۵±۰/۴۸b*	۹۰/۰۵±۰/۹۴a	۸۸/۸۹±۰/۴۰a	۸۸/۱۹±۰/۳۵a	۸۸/۲۵±۰/۴۰a	۸۶/۱۶±۰/۷۰a
عصاره آبی پسته	۹۴/۷۳±۴/۵۴a	۶۴/۸۶±۸/۸۱c	۲۸/۹۱±۱/۳۱d	۱۶/۰۸±۶/۴۳d	۱۰/۲۹±۴/۲۵ f	۲۵/۳۷±۱۷/۹۹cd
عصاره آبی بنه	۹۷/۳۱±۱/۶۵a	۹۰/۴۹±۳/۶۸a	۸۶/۵۱±۲/۱۵a	۴۶/۲۴±۴/۱۷c	۲۸/۶۲±۵/۰۶d	۲۴/۱۹±۱۰/۰۹cd
عصاره آبی کلخنگ	۹۵/۵۱±۱/۷۷a	۷۷/۵۷±۱۲/۷۹b	۴۵/۴۴±۳/۹۵c	۲۶/۷۰±۳/۲۵d	۱۸/۵۶±۵/۹۰e	۴۵/۳۰±۲۶/۱۶b
عصاره متانولی پسته	۹۵/۶۰±۱/۱۷a	۹۴/۴۹±۱/۶۶a	۶۸/۲۷±۱۱/۴۸b	۴۶/۶۴±۱۰/۲۴c	۲۸/۲۰±۵/۳۰d	۱۸/۱۹±۲/۵۷d
عصاره متانولی بنه	۹۵/۸۰±۱/۳۳a	۹۵/۸۰±۱/۷۶a	۹۴/۴۲±۱۰/۹۶a	۹۷/۴۷±۹/۲۴a	۶۸/۲۹±۵/۶۴b	۴۲/۰۱±۳/۸۱ bc
عصاره متانولی‌کلخنگ	۹۵/۴۷±۱/۴۱a	۹۶/۱۰±۲/۲۲a	۸۹/۰۷±۱۲/۳۲a	۷۰/۴۵±۱۰/۴۹b	۳۹/۲۳±۶/۰۲ c	۲۳/۲۱±۳/۰۲cd

*در هر ستون حداقل یک حرف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

شکل ۱: مقایسه میزان IC_{50} (میلی‌گرم بر لیتر) در عصاره‌های مختلف گونه‌های مورد مطالعه

نتایج حاصل از کروماتوگرافی مایع با کارکرد بالا نشان داد که در بین عصاره‌های آبی و متانولی سه گونه پسته، بنه و کلخنگ تفاوت‌های کمی و کیفی زیادی دیده می‌شود به گونه‌ای که برخی از ترکیبات فقط در نوع خاصی از عصاره‌ها و یا در گونه‌ای خاص یافت شدند (جدول ۲). آنالیز HPLC ترکیبات وانیلین، اسید گالیک، کاتچین، اسید کافئیک، روتین و کارواکرول را در عصاره آبی و ترکیبات ذکر شده بجز اسیدکافئیک و کارواکرول را در عصاره متانولی بنه شناسایی نمود. به‌علاوه در عصاره متانولی بنه ترکیبات اسید سینامیک و اسید پاراکوماریک نیز یافت شدند. در کلخنگ، ترکیبات وانیلین، اسید گالیک، کاتچین، روتین و اسید پاراکوماریک در عصاره آبی و ترکیبات وانیلین، اسید سینامیک، اسید گالیک، روتین و اسید پاراکوماریک در عصاره متانولی یافت شدند. ترکیبات وانیلین، اسید گالیک، کاتچین، روتین، اسید پاراکوماریک و کارواکرول در عصاره آبی پسته و ترکیبات وانیلین، اسید سینامیک، اسید گالیک و اسید پاراکوماریک در عصاره متانولی پسته یافت شد. ترکیبات اسید کلروژنیک و کوئرستین در هیچکدام از عصاره‌ها یافت نگردیدند و برعکس ترکیبات وانیلین و اسید گالیک در تمامی عصاره‌ها یافت شدند. اسید سینامیک فقط در عصاره‌های متانولی و کارواکرول فقط در عصاره‌های آبی یافت شدند. در بین گونه‌ها غلظت مجموع ترکیبات در عصاره‌های بنه بیشتر از دو گونه دیگر بود. غلظت مجموع ترکیبات فنلی در هر سه گونه در عصاره‌های متانولی بیشتر از عصاره‌های آبی بود. بیشترین میزان ترکیبات فنلی در عصاره متانولی بنه یافت شد به طوری که مقدار ترکیبات فنلی در این عصاره نسبت به عصاره آبی بنه ٤/٥ برابر بیشتر بود. کمترین میزان ترکیبات فنلی در عصاره‌های آبی کلخنگ و پسته وجود داشت به‌طوری که میزان آنها در عصاره‌های آبی کلخنگ و پسته حدود ۰/۰۷ عصاره متانولی بنه بود.

جدول ۲: میزان و نوع ترکیبات فنلی مختلف در گونه‌های پستاسیا با روش کروماتوگرافی مایع با کارکرد بالا

نوع ترکیبات (میلی‌گرم در گرم وزن خشک گیاه)	عصاره آبی بنه	عصاره متانولی بنه	عصاره آبی کلخنگ	عصاره متانولی کلخنگ	عصاره آبی پسته	عصاره متانولی پسته
وانیلین	۰/۰۳۳۰	۰/۰۲۹۷	۰/۰۰۱٤	۰/۰۰۰۹	۰/۰۰٤٤	۰/۰۰۱۳
اسید سینامیک	–	۱/٦۱۷۰	–	۰/٥۳۱٤	–	۰/۷٦٤۱
اسید گالیک	۰/۲۳۲۰	۰/۰۳٦۱	۰/۰۸۹۳	۰/۰۰۰۹	۰/۱۰٥۹	۰/۰۰۱۲
کاتچین	۰/۰٦٤۲	۰/۰۲۹۹	۰/۰۳۳۳	–	۰/۰۱۲۹	–
اسید کافئیک	۰/۰۰٦٥	–	–	–	–	–
اسید کلروژنیک	–	–	–	–	–	–
روتین	۰/۰٦۱٤	۰/۰۸۰٤	۰/۰۰٤۲	۰/۰۰۸۱	۰/۰۰۷۹	–
کورستین	–	–	–	–	–	–
اسید پاراکوماریک	–	۰/۰۰۷۱	۰/۰۰۱٥	۰/۰۰۰٦	۰/۰۰۱۹	۰/۰۰۰٦
کارواکرول	۰/۰۰۰٤	–	–	–	۰/۰۰۰٥	–
مجموع	۰/۳۹۷٥	۱/۸۰۰۲	۰/۱۲۹۷	۰/٥٤۱۹	۰/۱۳۳٥	۰/۷٦۷۲

بحث

در این پژوهش بیشترین بازده عصاره مربوط به عصاره آبی بنه و کمترین آن مربوط به عصاره متانولی بنه بود. حسین‌زاده و همکاران (۲۰۱۲) در پژوهشی میزان عملکرد عصاره آبی برگ‌ها و میوه‌های پسته را به‌ترتیب ٤/٢٢ و ١٠ درصد و عصاره اتانولی را به‌ترتیب ٢٦ و ٦/٩ درصد گزارش نمودند. به نظر می‌رسد که عملکرد عصاره‌ها با توجه به نوع حلال، گونه و اندام مورد استفاده متفاوت است. در این پژوهش در هر عصاره با افزایش غلظت، توان آنتی‌اکسیدانی (درصد شکار رادیکال آزاد) افزایش یافت به‌طوری‌که در تمامی عصاره‌ها بالاترین درصد شکار رادیکال آزاد در غلظت ٣٢٠٠ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد. همچنین مقایسه میانگین داده‌ها بین عصاره‌های مختلف سه گونه در هر غلظت تفاوت‌های معنی‌داری را نشان داد. در غلظت ٣٢٠٠ میلی‌گرم در لیتر عصاره‌های آبی و متانولی هر سه گونه نسبت به اسیدگالیک از توان آنتی‌اکسیدانی بالاتری برخوردار بودند و تفاوت معنی‌داری را نسبت به اسیدگالیک نشان دادند. گزارشات متعددی در رابطه با توان آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها و اندام‌های مختلف گونه‌های جنس پستاسیا وجود دارد. Peksel (٢٠٠٨) در پژوهشی نشان داد که عصاره برگ بنه قادر به احیاء رادیکال DPPH بود و میزان فعالیت ضد رادیکالی آن در غلظت ١٥ میکروگرم در میلی‌لیتر معادل ٨٥ درصد بازداندگی بود و در مقاسیه با آنتی‌اکسیدان‌های شناخته شده مانند اسیدآسکوربیک، عصاره برگ بنه از توان آنتی‌اکسیدانی قابل ملاحظه‌ای برخوردار بود. Souri و همکاران (٢٠٠٤) نشان دادند که درصد جلوگیری از پراکسیداسیون در غلظت‌های ٠/٤، ٤ و ٤٠ میکروگرم عصاره میوه بنه به‌ترتیب ٧/١٣±٢٨/٧٥، ٣/٩٣±٥٠/٨٦ و ٢/٧٩±٥٦/٤٦ و میزان IC_{50} آن برحسب میکروگرم معادل ٠/١٤±٧/٥١ بود که در مقایسه با ترکیب آلفاتوکوفرولبا IC_{50} معادل ٠/٦٠ میکروگرم فعالیت آنتی‌اکسیدانی بنه کمتر بود. Ilahi و همکاران (٢٠١٣) در پژوهشی نشان دادند که گونه *P.integerrima* در تمامی غلظت‌ها در مقایسه با اسید آسکوربیک فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری را به‌طور معنی‌داری نشان داد. Cherbal و همکاران (٢٠١٢) در پژوهشی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گونه *P. lentiscus* را با روش توانایی شکار ترکیب DPPH اندازه‌گیری کردند. نتایج آنها نشان داد که عصاره آبی-متانولی برگ‌های این گونه در غلظت ٢٠٠ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای ظرفیت بالای آنتی‌اکسیدانی (٧٦/٤ درصد توانایی شکار ترکیب DPPH) بود که نسبت به ترکیب استاندارد اسید گالیک کمتر ولی با ترکیب استاندارد آلفا-توکوفرول برابری می‌نمود که با نتایج حاصل از این پژوهش مطابقت دارد. در مجموع به نظر می‌رسد تفاوت‌های گزارش شده در توان آنتی‌اکسیدانی گونه‌های مختلف پستاسیا وابسته به عواملی نظیر نوع گونه، نوع اندام، نوع حلال مورد استفاده جهت تهیه عصاره، محل جمع‌آوری نمونه گیاهی، نوع ترکیب استاندارد مورد استفاده و... باشد.

همچنین نتایج این پژوهش با روش کروماتوگرافی مایع با کارکرد نشان داد که بین عصاره‌های آبی و متانولی سه گونه پسته، بنه و کلخنگ تفاوت‌های کمی و کیفی زیادی دیده می‌شود به گونه‌ای که برخی از ترکیبات فقط در نوع خاصی از عصاره‌ها و یا در گونه‌ای خاص یافت می‌شود. گزارشات متعددی در رابطه با میزان و نوع ترکیبات فنلی در انواع عصاره‌های مربوط به گونه‌های مختلف جنس پستاسیا وجود دارد. Joukki و Khazaei (٢٠١٠) در پژوهشی میزان فنل کل عصاره‌های متانولی و اتانولی میوه بنه را به‌ترتیب ٧/٢±١٦١/٠٧ و ٢٢/٤٢± ١٣٥/٢٧ میلی‌گرم معادل اسید گالیک بر گرم وزن‌تر گزارش نمودند. آنها همچنین میزان چندین ترکیب فنلی مانند اسید گالیک، اسید کلروژنیک، اسید سیناپیک، اسید پروتوکاتچوئیک، کاتچین و جوگلون را مشخص نمودند که در این میان

میزان تمامی ترکیبات در عصاره متانولی بیشتر از عصاره اتانولی بود و ترکیب جوگلون به‌ترتیب به میزان ٢٤ و ٢٣ میلی‌گرم در گرم وزن تر بیشترین غلظت را نسبت به سایر ترکیبات در عصاره‌های متانولی و اتانولی به خود اختصاص داد. در پژوهش کنونی نیز با آنالیز HPLC ترکیبات اسیدگالیک و کاتچین در عصاره متانولی برگ بنه شناسایی شد در حالی که این عصاره فاقد اسیدکلروژنیک بود. این تفاوت‌ها ممکن است به دلیل نوع اندام مورد استفاده جهت تهیه عصاره و یا شرایط اقلیمی متفاوت درختان مورد استفاده باشد. محققین تفاوت‌های مشاهده شده بین عصاره‌های مختلف را به تفاوت در قطبیت حلال‌های مورد استفاده مربوط می‌دانند (Silva et al., 2006; Huang et al., 2005; Javanmardi et al., 2003). عصاره‌گیری ترکیبات فنلی از مواد گیاهی به وسیله ساختار شیمیایی ترکیبات فنلی، نحوه عصاره‌گیری، اندازه ذرات گیاهی، زمان و شرایط نگهداری مواد گیاهی و وجود ترکیبات مداخله کننده تحت تاثیر قرار می‌گیرد. نوع حلال نیز یکی از عواملی است که تاثیر بسزایی بر عصاره‌گیری فنل‌ها دارد و در این راستا حلال‌های مختلفی نظیر آب، متانول، اتانول، استون و غیره مورد استفاده قرار می‌گیرد (Naczk and Shahidi, 2004). مجموع این عوامل می‌تواند بیان کننده تفاوت‌های کمی و کیفی در مواد فنلی گونه‌های مختلف جنس پستاسیا می‌باشد.

نتیجه‌گیری نهایی

در این پژوهش بیشترین توان آنتی‌اکسیدانی در عصاره‌های متانولی بنه دیده شد. همچنین بیشترین میزان ترکیبات فنلی نیز در این عصاره وجود داشت. از طرفی دیگر کمترین غلظت ترکیبات فنلی و کمترین توان آنتی‌اکسیدانی متعلق به عصاره‌های آبی پسته و کلخنگ بود. بنابراین می‌توان نوعی ارتباط و همبستگی را بین غلظت مواد فنلی و توان آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها مشاهده نمود. Alai و همکاران (٢٠٠٧) نیز گزارش کردند که در گونه‌ای از جنس پسته (*Pistacia palaestina* Boiss.) همبستگی خطی معنی‌داری بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و میزان فنل کل برای عصاره‌های آبی و متانولی وجود داشت و ضرایب همبستگی برای عصاره‌های آبی و متانولی به‌ترتیب ٠/٨٦٣ و ٠/٨٥٠ بود. همچنین Gardeli و همکاران (٢٠٠٨) همبستگی شدیدی را بین میزان فنل کل و خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گونه *P. lentiscus* مشخص نمودند. در مجموع نتایج این پژوهش مشخص کرد که تفاوت‌های کمی وکیفی زیادی در رابطه با ترکیبات فنلی عصاره‌های مختلف وجود داشت و همچنین توان آنتی‌اکسیدانی آنها نیز متفاوت بود.

منابع

1. Abdelwahed, A., Bouhlel, I., Skandrani, I., Valenti, K., Kadri, M., Guiraud, P., Steiman, R., Mariotte, A.M., Ghedira, K., Laporti, F., Dijoox-Franca, M.G., and Chekir-Ghedira, L. 2007. Study of anti-mutagenic and antioxidant activities of gallic acid and 1, 2, 3, 4, 6-pentagalloyl glucose from *Pistacia lentiscus:* confirmation by microarray expression profiling. Chemico-Biological Interactions, 165: 1-130.
2. Alai, F.Q., Tawaha, K., El-Elimat, T., Syouf, M., El-Fayad, M., Abulaila, K., Nielsew, S.J., Wheatons, W.D., Falkinham, J.O., and Oberlies, N.H. 2007. Antioxidant activity and total phenolic content of aqueous and methanolic extracts of Jordanian plants: an ICBG Project, Natural Product Research, 21: 1121-1131.
3. Amri, I., Lamia, H., Mohsen, H., Gargouri, S., and Bassem, J. 2013. Chemical composition and antifungal activity of three anacardiaceous species grown in Tunisia. Science International, 1:148-154.
4. Benhammou, N., Bekkara, F.A., and Anovska, P. 2008. Antioxidant and antimicrobial of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2: 22-28.
5. Bruits, M., Asres, K., and Bucar, F. 2001. The antioxidant activity of the essential oils of *Artemisia afra*, *Artemisia abyssinica* and

Juniperus procera. Phytotherapy Research, 15:103-108.

6.Cherbal, A., Kebieche, M., Madani, K., and El-Adawi, H. 2012. Extraction and valorization of phenolic compounds of leaves of Algeriam *Pistacia lentiscus*. Asain Journal of Plant Science, 3(11):131-136.

7.Gardeli, C., Vassiliki, P., Athanasios, M., Kibouris, T., and Komaitis, M. 2008. Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. Food Chemistry, 107:1120-1130.

8.Hirori, T., Takahashi, T. and Imamara, H. 1996. Wood extractives, XV, constituents of *Pistacia chinensis* wood. Nippon Mokuzi Gakkaishi, 12: 324-326.

9.Hosseinzadeh, H., Sajadi Tabassi, S.A., Milani Moghadam, N., Rashedinia, M., and Mehri, S. 2012. Antioxidant activity of *Pistacia vera* fruits leaves and gum extract. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 11: 879-887.

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

11.Ilahi, I., Samar, S., Khan, I., and Ahmad, I. 2013. *In vitro* antioxidant activities of four medicinal plants on the basis of DPPH free radical scavenging. Pakistan Journal of Pharmaceutical Science, 26: 949-952.

12.Javanmardi, L., Stushnoff, C., Locke, E., and Vivanco, J.M. 2003. Antioxidant activity and total phenolic contents of Iranian *Ocimum* accessions. Food Chemistry, 83: 547–550.

13.Joshi, U.D., and Mishra, S.H. 2009. *In vitro* antioxidant activity of galls of *Pistacia integerrima*. Pharmacology online, 2:763-768.

14.Joukki, M., and Khazaei, N. 2010. Compare of extraction of phenolic compounds from *Pistacia atlantica* in different solvents. Advances in Biomedical Research, 8:361-365.

15.Kayani, S.A., Masood, A., Achakzal, A.K., and Anbreen, Sh. 2007. Distribution of secondary metabolites in plants of Ouetta-Balochistan. Pakistan Journal of Botany, 39:1173-1179.

16.Korkina, L.G. 2007. Phenyl propanoid compounds in plant response to different stress factors. Acta Physiologia Planta, 19: 257-268.

17.Naczk, M. and Shahidi, F. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. Journal of Chromatography, 1054: 95-111.

18.Peksel, A. 2008. Antioxidative properties of decoction of *Pistacia atlantica* Desf. Leaves. Asian Journal of Chemistry, 20: 681-693.

19.Silva, E.M., Souza, J.N.S., Rogez, H., Rees, J.F., and Larondelle, Y. 2006. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. Food Chemistry, 101: 1012–1018.

20.Souri. E., Amin, Gh., Dehmobed-Sharifabadi, A., Nazif, A., and Farsam, H. 2004. Antioxidant activity of sixty plant from Iran. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 3: 55-59.

21.Zayzafoon, G., Odeh, A., Mohzia, Y., and Allaf, A.W. 2011. Measurements of essential oil extract and antioxidants in Syrian *Myrtus Communis* L. leaves using photochemilumine-science assay. Helvia Polonica, 57: 5-19.