زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال هفتم، شماره بیست و پنجم، پاییز ۱۳۹۴، صفحه ۱-۱۶
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۰۷/۲۶
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۴/۰۲/۰۶
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۴/۰۴/۰۹
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۴/۰۶/۰۹

سنجش محتوای فنل و فلاونوئید تام و بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ درختان انجیر (*Ficus carica*) و لرگ (*Pterocarya fraxinifolia*) با روش اسپکتروفتومتری و کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا

ناصر جعفری [۱]*، پوراندوخت نادری [۱] و محمد علی ابراهیم‌زاده [۲]
[۱] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران
[۲] مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

چکیده

در پژوهش حاضر، فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ درختان لرگ (*Pterocarya fraxinifolia*) از تیره Juglandaceae و انجیر (*Ficus carica*) از تیره Moraceae، با روش اسپکتروفتومتری و کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا بررسی شد. برای این منظور، برگ‌های درختان انجیر از جنگل نور در مازندران، جنگل شصت کلاته در گلستان و جنگل اسالم در گیلان و برگ‌های درختان لرگ از جنگل نور در مازندران و روستای وطنای بندرگز در گلستان و جنگل اسالم در گیلان جمع‌آوری شدند. میزان ترکیبات فنلی (گالیک اسید، کوماریک اسید و کوئرستین) نیز با روش کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا اندازه‌گیری شد. در آزمون به دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد DPPH غلظت مهار ۵۰ درصد حداکثر ۲۱/۴±۵۹۵/۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر در عصاره متانولی برگ لرگ مشاهده شد. با توجه به زمان بازداری، میزان سه ترکیب فنلی گالیک اسید، کوماریک اسید و کوئرستین در عصاره‌های متانولی برگ انجیر و در عصاره‌های متانولی برگ لرگ، گالیک اسید و کوماریک اسید شناسایی شدند. بیشترین میزان گالیک اسید (۷۸/۹۳) و کوماریک اسید (۸/۱۴) در عصاره‌های برگ‌های لرگ اسالم و کمترین میزان گالیک اسید (۸/۵۶) و کوماریک اسید (۰/۸۹) بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن خشک در عصاره‌های برگ انجیر نور مشاهده شد. بر اساس کروماتوگرام استاندارد زمان بازداری گالیک اسید (۲/۳۸۳)، کوماریک اسید (۳/۸۱۷) و کوئرستین (۷/۲۱۷) گزارش شد. پژوهش حاضر نشان داد که بین عوامل خاک نظیر: پتاسیم، سدیم، فسفر و ازت با میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدان فنلی در عصاره‌های برگ هر دو گیاه همبستگی معنی‌داری وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: انجیر، لرگ، ترکیبات فنلی، فلاونوئید، کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC)

* نگارنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: n.jafari@umz.ac.ir، شماره تماس: ۰۱۱۳۵۳۴۲۴۵۱

Copyright©2015, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

گیاهان گروه بزرگ و متنوعی از ترکیبات آلی به نام متابولیت‌های ثانوی را تولید می‌کنند که توسط انسان به عنوان ترکیب دارویی مصرف می‌شوند. متابولیت‌های ثانوی منحصر به یک گونه، اغلب طی یک دوره رشد و نموی خاص در گیاه تولید می‌شوند. متابولیت‌های ثانوی دارای عملکردهای اکولوژیک مهم در گیاهان هستند. این دسته از ترکیبات، گیاهان را فقط در مقابل میکروب‌ها حفظ نمی‌کند بلکه در برابر گیاه‌خواران، رقابت گیاه با گیاه و همزیستی گیاه با میکروب نیز نقش دارند (Wink, 2010). متابولیت‌های ثانوی در زیست فناوری به عنوان دارو، علف‌کش‌های زیستی، عوامل طعم دهنده، رنگ‌های طبیعی، سمّ‌ها، مواد توهم‌زا (مانند کوکائین، هروئین، مورفین) و عطرها استفاده می‌شوند (Mazid *et al*., 2011).

درخت انجیر با نام علمی *Ficus carica* از تیره *Moraceae* (Rashidi and Noureddini, 2011) منشأ اصلی آن نواحی مدیترانه‌ای است، اما امروزه در اغلب نواحی دنیا می‌روید. در ایران، در اغلب جنگل‌های شمالی و سواحل دریای مازندران، آذربایجان، اصفهان، فارس، خوزستان و خراسان پراکندگی دارد (Tavakoli Saberi and Sedaghat, 2004). شواهد تاریخی نشان می دهد که مردم در دوران‌های قدیم درخت انجیر را به خوبی می شناختند و از آن استفاده می‌کردند، به طوری که در قدیمی‌ترین آثار، از مشخصات این درخت و فواید آن نام برده شده است. در گذشته از جوشانده برگ انجیر در بیماری دیابت و سنگ‌های کلیوی استفاده می نمودند (Rashidi and Noureddini, 2008). پژوهش‌های اخیر نشان می‌دهد جوشانده و عصاره الکلی برگ انجیر دارای اثر ضددیابت است و سطح گلوکز خون را کاهش می‌دهد (Kar *et al*., 2003). Browics (۱۹۷۸) لرگ را گونه‌ای با نیاز قابل توجه به رطوبت خاک و هوا معرفی نموده است که در خاک‌های آبرفتی (alluvial soil) یا دوره‌های پایدار غرقابی رشد می‌نمایند (Browics, 1978).

تنوع گسترده‌ای از مولکول‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر: ترکیبات فنلی، اسیدهای فنلی، فلاونوئیدها، کوئینون‌ها و تانن‌ها، توکوفرول‌ها، کاروتنوئیدها و آسکوربیک اسید در گیاهان حضور دارند. این آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در بخش‌های مختلف گیاه مانند: چوب، پوست، ساقه، میوه، برگ، ریشه، گل، دانه گرده و بذر توزیع شده‌اند (Chanwitheesuk *et al*., 2005). ترکیبات فنلی آنتی‌اکسیدانی ممکن است به عنوان اجزای مهارکننده رادیکال‌های آزاد یا کلات‌کننده یون‌های فلزی فعال در واکنش‌های احیا که قادر به کاتالیز پراکسیداسیون لیپیدها هستند، مصرف شوند (Schroeter *et al*., 2002). این ترکیبات در کموتاکسونومی نیز کاربرد وسیعی دارند. فلاونوئیدها یکی از بزرگترین گروه‌های ترکیبات طبیعی جزو ترکیبات فنلی هستند (Thrugnanavel *et al*., 2007). فلاونوئیدها و سایر ترکیبات فنلی انتشار وسیعی در گیاهان دارند و فعالیت زیستی متنوع این ترکیبات از جمله تأثیرات آنتی اکسیدان و ضد میکروبی آنها در بسیاری از بررسی‌ها گزارش شده است.

با توجه به کاربردهای فراوان گیاهان و عصاره آنها در صنایع مهمی همچون: داروسازی، غذایی، آرایشی و بهداشتی و عطرسازی و موقعیت ویژه جغرافیایی کشور

ایران با آب و هوای بسیار متنوع، بررسی وجود ارتباط بین عوامل محیطی و اکولوژیک با تولید و تجمع متابولیت‌های ثانویه در گیاهان می‌تواند بسیار مفید باشد.

مواد و روش‌ها

برگ های درختان انجیر از جنگل نور در مازندران، جنگل شصت کلاته در گلستان و جنگل اسالم در گیلان و برگ‌های درختان لرگ از جنگل نور در مازندران و روستای وطنای بندرگز در گلستان و جنگل اسالم در گیلان جمع‌آوری شد، ویژگی‌های اقلیمی مناطق جمع‌آوری گیاهان در جدول ۱ نشان داده شده است. برگ‌های استفاده شده در پژوهش حاضر، در تیر ماه ۱۳۹۱ در یک جهت شیب و با سه تکرار جمع‌آوری گردید و پس از شستشو با آب در محیط سایه در هوای آزاد خشک شدند. نمونه‌های خشک شده پس از پودر شدن در یخچال نگهداری شد و در زمان عصاره‌گیری متانول ۷۰ درصد به آن افزوده و با روش سوکسله عصاره‌گیری شد، متانول توسط دستگاه روتاری (تبخیر کننده چرخان) حذف شد و در نهایت، عصاره ها توسط دستگاه فریز درایر به طور کامل خشک شد. تمام مواد شیمیایی و حلال‌های مورد استفاده در پژوهش حاضر، دارای بالاترین درصد خلوص و از شرکت مرک آلمان تهیه شده بودند.

اندازه‌گیری میزان کل ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی: محتوای تام فنلی با استفاده از معرف فولین-سیوکالتیو اندازه‌گیری شد. به ۰/۵ میلی‌لیتر از هر عصاره (۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) ۲/۵ میلی‌لیتر واکنشگر فولین-سیوکالتیو ۰/۲ نرمال افزوده شد، پس از ۵ دقیقه ۲ میلی‌لیتر از محلول ۷۵ گرم بر لیتر کربنات سدیم به آن اضافه شد. پس از ۲ ساعت، جذب مخلوط در طول موج ۷۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفتومتر (مدل JENWAY 6305، شرکت JENWAY، انگلستان) در مقابل بلانک خوانده شد، از گالیک اسید به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد. میزان تام فنولیک بر اساس میزان معادل میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره گزارش شد. آزمایش‌ها سه بار تکرار و میانگین آنها گزارش شد (Slinkard and Singleton, 1977).

محتوای تام فلاونوئید با استفاده از معرف آلومینیوم کلرید اندازه‌گیری شد. به ۰/۵میلی‌لیتر از هر عصاره (۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۰/۱میلی‌لیتر از محلول آلومینیوم کلرید ۱۰ درصد در اتانول، ۰/۱ میلی‌لیتر از استات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد. جذب مخلوط ۳۰ دقیقه پس از نگهداری در دمای اتاق، در طول موج ۴۱۵ نانومتر در مقابل بلانک خوانده شد. از کوئرستین به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد. میزان فلاونوئید بر اساس میزان معادل میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره گزارش گردید (Chang *et al*., 2002). آزمایش‌ها سه بار تکرار و میانگین آنها گزارش شد.

شرایط کروماتوگرافی مایع: ابتدا آشکارساز UV به مدت ۱۰ دقیقه گرم شد و پیش از تزریق نمونه فاز متحرک به مدت ۲۰ دقیقه در شرایط آزمایش از ستون جداسازی عبور داده شد. سپس، ۲۰ میکرولیتر از نمونه‌ها به دستگاه تزریق شدند. جداسازی در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد و در طول موج ۲۸۰ نانومتر انجام شد (Hurst *et al*., 1983).

آماده‌سازی نمونه‌ها و استاندارد برای کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا: جهت تهیه محلول استاندارد، ۵ میلی‌گرم کوماریک اسید،

کوئرستین و گالیک اسید در ۵۰ میلی‌لیتر متانول حل شد، سپس از این محلول، غلظت‌های پایین‌تر تهیه شد. پس از آن، محلول از فیلتر ۰/۲ میکرولیتر عبور داده شد. مقدار ۲۵ میلی‌گرم از عصاره‌های خشک مناطق مختلف به طور جداگانه در ۲۵ میلی‌لیتر متانول حل و از فیلتر ۰/۲ میکرولیتر عبور داده شد. محلول‌ها جهت تزریق به دستگاه HPLC (High Performance Liquid Chromatography) (مدل AZURA، شرکت KNAUER، آلمان) آماده شد.

تجزیه خاک: نمونه‌های خاک ابتدا در شرایط آزمایشگاه پهن و خشک شد؛ پس از کوبیده شدن و الک شدن از صافی ۲ میلی‌متری در ظروف درب بسته پلاستیک جهت انجام تجزیه فیزیکی و شیمیایی نگهداری شد. اسیدیته با استفاده از دستگاه pH متر با نسبت ۱ به ۲۵ مخلوط خاک و آب، دانه‌بندی با روش دانسی‌متر (روش بایکاس) درصد مواد آلی با روش والکلی و بلاک، هدایت الکتریکی توسط دستگاه هدایت الکتریکی‌سنج، ازت با روش کجلدال، فسفر قابل جذب با روش اُلسن، کلسیم و منیزیم با روش تیتراسون (کمپلکسومتری) اندازه‌گیری شد (Zarin Kafsh, 1983؛ Dewis and Freitas, 1984).

تحلیل آماری: تمامی اندازه‌گیری‌ها سه بار تکرار و داده‌ها به صورت Mean±SD گزارش شد. برای ترسیم منحنی‌ها از نرم‌افزار Excel و برای تحلیل آماری از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ استفاده شد. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون واریانس چند متغیره UNIANOVA و اختلاف آماری کمتر از ۵ درصد معنی‌دار در نظر گرفته شد. همچنین، ضرایب همبستگی ساده بین زوج صفات برای به دست آوردن میزان ارتباط صفات با یکدیگر با روش Pearson (۱۸۹۶) محاسبه شد.

جدول ۱- ویژگی‌های اقلیمی مناطق جمع‌آوری گیاه

منطقه جمع‌آوری	موقعیت جغرافیایی N	موقعیت جغرافیایی E	ارتفاع (متر بالای سطح دریا)	میانگین دمای سالانه (سانتیگراد)	میانگین حداکثر دمای سالانه (سانتیگراد)	میانگین حداقل دمای سالانه (سانتیگراد)	میانگین بارندگی (میلی‌متر)
اسالم	۳۷ ۴۱/۵۲۷′	۴۸ ۵۱/۷۲۱′	۲۲۹	۱۵/۱	۲۹/۶	۲/۸	۱۳۸۰/۸
نور	۳۶ ۳۴/۹۰۷′	۵۲ ۲/۸۸۹′	-۱۲	۱۶/۴	۲۸/۷	۳/۹	۱۲۹۳/۵
بندرگز	۳۶ ۴۲/۶۵۴′	۵۳ ۵۸/۲۳۳′	۱۶۶	۱۷/۸	۳۲/۶	۳/۴	۶۰۱
گرگان	۳۶ ۴۷/۴۲۴′	۵۴ ۲۱/۸۸۰′	۲۴۵	۱۷/۸	۳۲/۶	۳/۴	۶۰۱

نتایج

بازده استخراج عصاره های برگ درختان انجیر و لرگ جمع آوری شده از مناطق مختلف با استفاده از حلال متانول و با روش سوکسله اندازه‌گیری شد و راندمان بازده هر یک از آنها در جدول ۲ نشان داده شده است. کمترین میانگین درصد بازده عصاره در برگ‌های درختان انجیر جمع‌آوری شده از منطقه اسالم به میزان ۷/۴ درصد و بیشترین راندمان استخراج به میزان ۲۱/۳ درصد در عصاره برگ‌های درختان لرگ جنگل نور مشاهده شد.

محتوای تام فنلی: میزان کل ترکیبات فنلی با معرف فولین-سیوکالتیو (Slinkard and Singleton, 1977) به صورت اکی‌والان گالیک اسید در گرم عصاره بر اساس رابطه ۱ محاسبه شد و نتایج آن در جدول ۳

آمده است. نتایج ترکیبات فنلی تام عصاره‌های برگ انجیر و لرگ مناطق مختلف (بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید درگرم وزن خشک عصاره) بیشترین مقدار ترکیبات فنلی کل مربوط به عصاره‌های برگ‌های انجیر و لرگ منطقه اسالم گزارش شد.

رابطه ۱: $Y=0.005X + 0.063 \quad R^2=0.998$

محتوای فلاونوئیدی تام بر اساس رابطه ۲ برای عصاره متانولی برگ‌های مناطق مختلف به صورت اکی‌والان میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره محاسبه شد. مقدار ترکیبات فلاونوئیدی برگ‌های انجیر و لرگ در جدول ۴ نشان داده شده است. مقدار ترکیبات فلاونوئیدی عصاره‌های برگ انجیر مناطق مختلف (بر حسب میلی‌گرم کوئرستین درگرم وزن خشک عصاره) عصاره‌های برگ‌های انجیر و لرگ منطقه اسالم بیشترین مقدار ترکیبات فلاونوئیدی و عصاره‌های برگ‌های انجیر نور و لرگ بندرگز کمترین میزان فلاونوئید را داشتند.

رابطه ۲: $Y=0.006X + 0.007 \quad R^2=0.999$

جدول ۲- درصد بازده عصاره‌های برگ انجیر و لرگ مناطق مختلف

نام گیاه	نمونه مورد بررسی	بازده استخراج (درصد)
انجیر	برگ انجیر اسالم	۷/۴
	برگ انجیر نور	۹/۵
	برگ انجیر گرگان	۹/۱
لرگ	برگ لرگ اسالم	۱۷/۱
	برگ لرگ نور	۲۱/۳
	برگ لرگ بندرگز	۱۵/۳

جدول ۳- محتوای تام فنلی موجود در عصاره‌های برگ انجیر و لرگ مناطق مختلف

نوع گیاه	نمونه مورد بررسی	ارزیابی محتوای تام فنلی (میلی‌گرم بر گرم)
انجیر	برگ انجیر اسالم	۱۹۲/۷۵ ±۸/۵
	برگ انجیر نور	۵۹/۷۵ ±۳/۲
	برگ انجیر گرگان	۱۴۰ ±۴/۳
لرگ	برگ لرگ اسالم	۳۸۲/۵۳ ±۹/۵
	برگ لرگ نور	۲۷۷ ±۸/۱
	برگ لرگ بندرگز	۲۳۷/۷۵ ±۶/۵

جدول ۴- محتوای تام فلاونوئیدی موجود در عصاره‌های برگ انجیر و لرگ مناطق مختلف

نوع گیاه	نمونه مورد بررسی	ارزیابی محتوای تام فنلی (میلی‌گرم بر گرم)
انجیر	برگ انجیر اسالم	۱۵۲/۲۹ ±۷
	برگ انجیر نور	۹۴/۷۹ ±۲/۱
	برگ انجیر گرگان	۱۰۵/۲۰ ±۲/۴
لرگ	برگ لرگ اسالم	۹۷/۵ ±۲/۷
	برگ لرگ نور	۸۸/۳۳ ±۳/۲
	برگ لرگ بندرگز	۶۶/۰۴ ±۲/۱

روش DPPH: استفاده از رادیکال آزاد DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) برای بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های گیاهی و به طور کلی آنتی اکسیدانی‌های طبیعی، یکی از پرکاربردترین روش‌های سنجش قدرت آنتی اکسیدان است. جدول ۵ میزان IC50 (غلظتی که در آن ۵۰ درصد رادیکال DPPH مهار می‌شود) عصاره‌های متانولی برگ‌های لرگ و انجیر جمع‌آوری شده از مناطق مختلف نشان می‌دهد. آسکوربیک اسید و BHA (Butylated Hydroxyanisole) به عنوان استاندارد مورد استفاده

قرار گرفت.

داده‌های جدول ۵ نشان می‌دهد که عصاره برگ‌های انجیر منطقه اسالم بهترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را در به دام‌اندازی رادیکال DPPH نسبت به دو منطقه دیگر دارند. عصاره‌های برگ‌های لرگ جمع‌آوری شده از هر سه منطقه نسبت به آنتی‌اکسیدان سنتزی BHA فعالیت آنتی‌اکسیدانی بهتری را در به دام‌اندازی رادیکال DPPH نشان دادند اما عصاره برگ‌های لرگ منطقه اسالم فعالیت آنتی‌اکسیدانی بهتری نسبت به دو منطقه دیگر داشت.

روش به دام‌اندازی رادیکال آزاد نیتریک اکسید: نتایج ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی دو گیاه لرگ و انجیر در روش به دام‌اندازی رادیکال آزاد نیتریک اکسید، با محاسبه IC50 در جدول ۶ نشان داده شده است. از کوئرستین به عنوان استاندارد برای مقایسه استفاده شد. با توجه به جدول ۶ عصاره‌های برگ‌های انجیر اسالم و گرگان فعالیت آنتی‌اکسیدانی بهتری نسبت به استاندارد کوئرستین در به دام‌اندازی رادیکال نیتریک اکسید داشتند، اما عصاره برگ‌های انجیر اسالم نسبت به دو منطقه دیگر بهترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را نشان دادند. عصاره برگ‌های لرگ اسالم و نور نسبت به استاندارد کوئرستین فعالیت آنتی‌اکسیدانی بهتری در به دام‌اندازی رادیکال نیتریک اکسید داشتند.

جدول ۵- ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های برگ انجیر و لرگ مناطق مختلف و استاندارد با روش DPPH

نوع گیاه	نمونه مورد بررسی	IC50 (میکروگرم بر میلی‌لیتر)
انجیر	برگ انجیر اسالم	۸۶/۵۵ ±۳/۹
	برگ انجیر نور	۴۱۲/۱۸ ±۱۳/۲۴
	برگ انجیر گرگان	۱۵۱/۰۳۸ ±۶/۶
	آسکوربیک اسید	۵/۰۴ ±۰/۰۲
	BHA	۵۳/۸۲ ±۳/۲
لرگ	برگ لرگ اسالم	۱۹/۰۹ ±۱/۱
	برگ لرگ نور	۲۳/۳۲ ±۰/۷
	برگ لرگ بندرگز	۳۸/۸۹ ±۱/۶
	آسکوربیک اسید	۵/۰۴ ±۰/۰۲
	BHA	۵۳/۸۲ ±۳/۲

جدول ۶- ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های برگ انجیر و لرگ مناطق مختلف و استاندارد با روش به دام‌اندازی رادیکال نیتریک اکسید

نوع گیاه	نمونه مورد بررسی	IC50 میکروگرم بر میلی‌لیتر
انجیر	برگ انجیر اسالم	۳۶ ±۱/۸
	برگ انجیر نور	۲۷۰ ±۷/۹
	برگ انجیرگرگان	۱۶۱/۱۲ ±۶/۲۸
	کوئرستین	۱۹۵ ±۶/۲
لرگ	برگ لرگ اسالم	۱۸/۵۲ ±۰/۴۸
	برگ لرگ نور	۳۰/۳۲ ±۱/۶
	برگ لرگ بندرگز	۲۶۱/۵۸ ±۷/۴
	کوئرستین	۱۹۵ ±۶/۲

ارزیابی میزان احیاکنندگی: در روش قدرت احیاکنندگی، توانایی عصاره ها برای احیای آهن سه ظرفیتی و تبدیل آن به آهن دو ظرفیتی سنجیده می‌شود. میزان جذب در آزمون احیاکنندگی عصاره های متانولی برگ‌های انجیر و لرگ در جدول‌های ۷ و ۸ نشان داده شده است. افزایش جذب در این طول موج بیانگر افزایش قابلیت احیاکنندگی است. از آسکوربیک اسید به عنوان استاندارد استفاده شد.

بر اساس جدول ۷ عصاره‌های برگ‌های انجیر اسالم فعالیت آنتی‌اکسیدانی بهتری را در آزمون احیاکنندگی آهن سه ظرفیتی نسبت به دو منطقه دیگر نشان دادند، در صورتی که فعالیت ضعیف‌تری نسبت به آسکوربیک اسید داشتند و با توجه به جدول ۸ عصاره‌های برگ لرگ اسالم هم فعالیت آنتی‌اکسیدانی بهتری را در آزمون احیاکنندگی آهن سه ظرفیتی نسبت به دو منطقه دیگر نشان دادند. میزان فعالیت احیاکنندگی آنها در غلظت‌های بالای آسکوربیک اسید هم بهتر است.

آزمون شلات‌دهندگی فلزات: میزان شلات‌دهندگی آهن توسط عصاره‌های برگ انجیر و لرگ با محاسبه IC50، در جدول ۹ نشان داده شده است. در این آزمون، EDTA به عنوان استاندارد انتخاب شد به طوری که به طور کامل یون آهن دو ظرفیتی را شلات داده و از محیط خارج می‌کند.

با توجه به جدول ۹ عصاره‌های برگ‌های انجیر منطقه نور فعالیت آنتی‌اکسیدانی بهتری را در آزمون شلات‌دهندگی آهن دو ظرفیتی نسبت به دو منطقه داشت. عصاره‌های برگ‌های لرگ منطقه نور هم در آزمون شلات‌دهندگی آهن دو ظرفیتی از فعالیت آنتی‌اکسیدانی خوبی نسبت به دو منطقه دیگر برخوردار بود.

جدول ۷- ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های برگ انجیر مناطق مختلف با روش قدرت احیاکنندگی آهن سه ظرفیتی (میلی‌گرم در میلی‌لیتر)

نمونه‌ها/ غلظت	۲۵	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	۴۰۰
برگ انجیر اسالم	۰/۰۸۹ ±۰/۰۰	۰/۱۴۰ ±۰/۰۱	۰/۲۳۰ ±۰/۰۳	۰/۴۷۸ ±۰/۰۵	۰/۸۷۲ ±۰/۰۸
برگ انجیر نور	۰/۰۲۷ ±۰/۰۰	۰/۰۵۱ ±۰/۰۱	۰/۰۸۷ ±۰/۰۱	۰/۱۶۶ ±۰/۰۳	۰/۳۱۵ ±۰/۰۳
برگ انجیر گرگان	۰/۰۳۴ ±۰/۰۰	۰/۱۱۱ ±۰/۰۱	۰/۱۵۳ ±۰/۰۲	۰/۲۹۶ ±۰/۰۴	۰/۵۱۴ ±۰/۰۳
آسکوربیک اسید	۰/۳۵ ±۰/۰۱	۰/۴۱ ±۰/۰۱	۱/۰۳ ±۰/۰۵	۱/۴۵ ±۰/۰۵	۲/۰۴ ±۰/۱

جدول ۸- ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های برگ لرگ مناطق مختلف با روش قدرت احیاکنندگی آهن سه ظرفیتی (میلی‌گرم در میلی‌لیتر)

نمونه‌ها/ غلظت	۲۵	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	۴۰۰
برگ لرگ اسالم	۰/۱۸۸ ±۰/۰۳	۰/۳۹۴ ±۰/۰۴	۰/۸۰۶ ±۰/۰۷	۱/۳۳ ±۰/۱	۲/۲۲۵ ±۰/۲
برگ لرگ نور	۰/۱۳۸ ±۰/۰۲	۰/۲۶۰ ±۰/۰۲	۰/۴۹۶ ±۰/۰۵	۰/۹۸۲ ±۰/۱	۱/۸۹۰ ±۰/۱
برگ لرگ بندرگز	۰/۱۳۴ ±۰/۰۲	۰/۲۱۶ ±۰/۰۲	۰/۴۱۸ ±۰/۰۴	۰/۷۶۵ ±۰/۰۵	۱/۵۰۲ ±۰/۰۸
آسکوربیک اسید	۰/۳۵ ±۰/۰۱	۰/۴۱ ±۰/۰۱	۱/۰۳ ±۰/۰۵	۱/۴۵ ±۰/۰۵	۲/۰۴ ±۰/۱

جدول ۹- ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های برگ انجیر و لرگ مناطق مختلف با روش شلات‌دهندگی یون آهن دو ظرفیتی

نوع گیاه	نمونه مورد بررسی	IC50 (میکروگرم در میلی‌لیتر)
انجیر	برگ انجیر اسالم	۴۹۴/۴۴ ±۱۷/۳
	برگ انجیر نور	۷۵/۲۸ ±۴/۳
	برگ انجیرگرگان	۵۹۵/۱۲ ±۲۱/۴
	EDTA	۷/۹۳±۰/۰۲
لرگ	برگ لرگ اسالم	۴۵۲/۵۹ ±۱۵/۱
	برگ لرگ نور	۲۸۹/۱۹ ±۱۱/۳
	برگ لرگ بندرگز	۳۴۶/۶۵ ±۱۲/۴۲
	EDTA	۷/۹۳±۰/۰۲

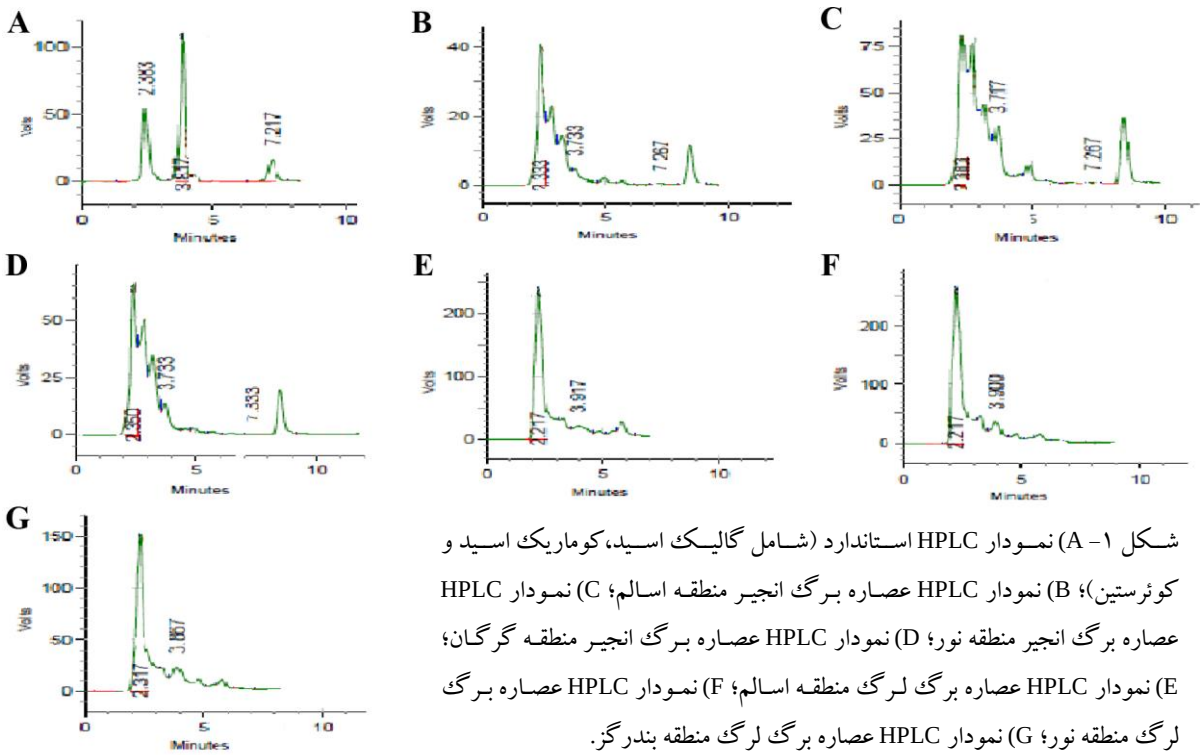
بررسی سه ترکیب فنلی با استفاده از HPLC:

باتوجه به زمان بازداری، میزان سه ترکیب فنلی شامل: گالیک اسید، کوماریک اسید و کوئرستین در عصاره‌های متانولی برگ انجیر و گالیک اسید و کوماریک اسید در عصاره های متانولی برگ لرگ شناسایی شد. میزان هر یک از ترکیبات با ارزیابی سطح زیر پیک ایجاد شده توسط هر ترکیب محاسبه شد. در جدول ۱۰ میزان این ترکیبات فنلی نشان داده شده است. عصاره برگ‌های انجیر اسالم بیشترین میزان گالیک اسید (۱۵/۲۳ میلی‌گرم بر گرم) و کوماریک اسید (۴/۵۵ میلی‌گرم بر گرم) را داشت. در صورتی که عصاره برگ‌های انجیر گرگان بیشترین میزان کوئرستین (۰/۵۳ میلی‌گرم بر گرم) و کمترین میزان گالیک اسید و کوماریک اسید را نسبت به دو منطقه دیگر داشت. در عصاره برگ لرگ کوئرستین وجود نداشت و بیشترین مقدار گالیک اسید (۷۸/۹۳ میلی‌گرم بر گرم) و کوماریک اسید (۸/۱۴ میلی‌گرم بر گرم) در عصاره‌های برگ لرگ اسالم یافت شد.

در شکل ۱- B تا F کروماتوگرام سه ترکیب فنلی موجود در عصاره‌های برگ انجیر و لرگ در مناطق مختلف نشان داده شده است. بر اساس کروماتوگرام استاندارد (شکل ۱-A) زمان بازداری گالیک اسید (۲/۳۸۳)، کوماریک اسید (۳/۸۱۷) و کوئرستین (۷/۲۱۷) مشاهده است. همان طور که در شکل ۱-A مشاهده می‌شود بیشترین زمان بازداری مربوط به کوئرستین و کمترین زمان بازداری مربوط به گالیک اسید است.

جدول ۱۰- میزان سه ترکیب فنلی موجود در عصاره برگ انجیر و لرگ مناطق مختلف

نمونه مورد بررسی	گالیک اسید (میلی‌گرم بر گرم)	کوماریک اسید (میلی‌گرم بر گرم)	کوئرستین (میلی‌گرم بر گرم)
برگ انجیر اسالم	۱۵/۲۳	۴/۵۵	۰/۴۶
برگ انجیر نور	۸/۵۶	۰/۸۹	۰/۴۳
برگ انجیر گرگان	۱۲/۸۱	۲/۱۱	۰/۵۳
برگ لرگ اسالم	۷۸/۹۳	۸/۱۴	–
برگ لرگ نور	۶۸/۲۰	۶/۲۶	–
برگ لرگ بندرگز	۴۴/۶۲	۵/۳۶	–



شکل ۱- A) نمودار HPLC استاندارد (شامل گالیک اسید، کوماریک اسید و کوئرستین)؛ B) نمودار HPLC عصاره برگ انجیر منطقه اسالم؛ C) نمودار HPLC عصاره برگ انجیر منطقه نور؛ D) نمودار HPLC عصاره برگ انجیر منطقه گرگان؛ E) نمودار HPLC عصاره برگ لرگ منطقه اسالم؛ F) نمودار HPLC عصاره برگ لرگ منطقه نور؛ G) نمودار HPLC عصاره برگ لرگ منطقه بندرگز.

ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک: ویژگی بافت خاک و میزان برخی از عناصر شیمیایی خاک پای درختان انجیر و لرگ در مناطق مختلف در جدول ۱۱ نشان داده شده است.

جدول ۱۱- ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک زیر درختان انجیر و لرگ مناطق مختلف

مکان جمع‌آوری	درصد شن	درصد لای	درصد رس	بافت خاک	درصد کربن آلی	اسیدیته کل اشباع	هدایت الکتریکی (میلی‌موس بر سانتی‌متر)	درصد ازت کل	فسفر قابل جذب (ppm)	پتاسیم قابل جذب (ppm)	سدیم (میلی‌اکی‌والان در لیتر)
اسالم (لرگ)	۶۶	۲۶	۸	شنی لومی	۲/۷۶	۶/۴۸	۰/۲۱	۰/۲۳	۱۴	۲۵۷	۲/۲
اسالم (انجیر)	۵۸	۳۰	۱۲	شنی لومی	۵/۳۴	۶/۶۲	۰/۴۸	۰/۴۴	۱۲	۲۱۶	۳/۳
نور (انجیر و لرگ)	۷۵	۱۵	۱۰	شنی لومی	۱/۴۸	۷/۸۳	۰/۳۴	۰/۱۲	۷/۲	۱۴۰	۵/۲
بندرگز (لرگ)	۳۷	۴۸	۱۵	لومی	۰/۹۷	۸/۲	۰/۳۵	۰/۰۸	۱۲	۱۹۴	۴/۰۵
گرگان (انجیر)	۲۷	۵۲	۲۱	شنی رسی لومی	۴/۸۷	۷/۶۹	۰/۴۲	۰/۴	۵/۵	۳۵۲	۵/۰۸

نتایج آماری: نتایج آماری و ضرایب همبستگی بین ترکیبات ثانوی برگ درختان انجیر و لرگ با عوامل اقلیمی و ادافیک در پیوست‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است. بر اساس آزمون دانکن، عصاره‌های برگ لرگ و انجیر اسالم بیشترین میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی کل، گالیک اسید و کوماریک اسید را داشتند و بهترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را نشان دادند. اما عصاره‌های برگ لرگ منطقه بندرگز و انجیر منطقه نور کمترین میزان این ترکیبات را داشتند و فعالیت آنتی‌اکسیدانی ضعیف‌تری را نسبت به دو منطقه دیگر نشان دادند. با توجه به آنالیز ضریب همبستگی بین زوج صفات (پیرسون) بین میزان فنل کل، فلاونوئید کل، گالیک اسید، کوماریک اسید عصاره‌های برگ‌های لرگ و IC50 آزمون DPPH، همبستگی منفی (به

ترتیب: r=-۰/۸۳، r=-۰/۹۹، r=-۰/۹۴ و r=-۰/۸۴) و معنی‌داری در سطح ۱ درصد وجود دارد.

در عصاره های برگ انجیر، میزان فنل کل، گالیک اسید، کوماریک اسید با IC50 آزمون DPPH همبستگی منفی (به ترتیب: r=-۰/۹۷، r=-۰/۹۷، r=-۰/۸۴) و معنی داری در سطح ۱ درصد نشان دادند اما محتوای فلاونوئیدی کل همبستگی منفی (r=-۰/۷۶) و معنی‌داری در سطح ۵ درصد را نشان داد. محتوای فنلی و فلاونوئیدی کل، گالیک اسید، کوماریک اسید عصاره‌های برگ‌های انجیر و IC50 آزمون نیتریک اکسید همبستگی منفی (به ترتیب: r=-۰/۹۸، r=-۰/۹۴، r=-۰/۹۷، r=-۰/۹۶) و معنی‌داری را در سطح ۱ درصد نشان دادند. فنل کل و گالیک اسید موجود در عصاره های برگ انجیر و IC50 آزمون شلات‌دهندگی آهن همبستگی مثبت (r=۰/۸۲، r=۰/۸۴) و معنی داری در سطح ۱ درصد را نشان داد، اما محتوای فلاونوئیدی کل و کوماریک اسید همبستگی معنی‌داری نشان ندادند. کوئرستین با آزمون DPPH و نیتریک اکسید همبستگی معنی‌داری نشان نداد، در صورتی که با آزمون شلات‌دهندگی آهن همبستگی مثبت (r=۰/۷۰) و معنی‌داری در سطح ۵ درصد را نشان داد.

محتوای فنلی و کوماریک اسید موجود در عصاره‌های برگ‌های لرگ همبستگی مثبت (r=۰/۷۰، r=۰/۶۷) و معنی داری در سطح ۵ درصد با میزان پتاسیم خاک نشان دادند و بین فلاونوئید و گالیک اسید و پتاسیم خاک همبستگی معنی‌داری مشاهده نشد. در عصارهبرگ‌های انجیر فقط بین کوئرستین و میزان پتاسیم خاک همبستگی مثبت (r=۰/۸۲) و معنی داری در سطح ۱ درصد مشاهده شد. محتوای فلاونوئید و کوماریک اسید موجود در عصاره برگ‌های لرگ همبستگی مثبت (r=۰/۸۹، r=۰/۸۲) و معنی‌داری در سطح ۱ درصد با میزان فسفر خاک نشان داد، اما بین فنل کل و گالیک اسید با فسفر خاک همبستگی معنی داری مشاهده نشد. در عصاره برگ های انجیر نیز بین این ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و فسفر خاک همبستگی معنی داری مشاهده نشد. بین هدایت الکتریکی و محتوای فنلی و کوماریک اسید موجود در عصاره‌های برگ لرگ همبستگی منفی (r=-۰/۹۱، r=-۰/۸۸) و معنی دار در سطح ۱ درصد وجود دارد اما بین فلاونوئید و گالیک اسید و هدایت الکتریکی خاک همبستگی منفی (r=-۰/۷۲، r=-۰/۶۷) و معنی‌داری در سطح ۵ درصد وجود دارد. در عصاره های برگ انجیر بین محتوای فنلی و فلاونوئیدی کل، گالیک اسید و کوماریک اسید و هدایت الکتریکی خاک همبستگی مثبت (به ترتیب: r=۰/۹۷، r=۰/۸۸، r=۰/۹۵، r=۰/۹۰) و معنی‌دار در سطح ۱ درصد مشاهده شد. بین مقدار اسیدیته خاک و محتوای فنلی و فلاونوئیدی کل، گالیک اسید و کوماریک اسید موجود در عصاره‌های برگ‌های لرگ همبستگی مثبت (به ترتیب: r=۰/۹۸، r=۰/۸۶، r=۰/۸۶، r=۰/۹۹) و معنی داری در سطح ۱ درصد مشاهده شد. بین مقدار اسیدیته خاک و محتوای فنلی و فلاونوئیدی کل، گالیک اسید و کوماریک اسید موجود در عصاره های برگ های انجیر همبستگی منفی (به ترتیب: r=-۰/۸۴، r=-۰/۹۶، r=-۰/۸۲، r=-۰/۹۳) و معنی‌داری در سطح ۱ درصد مشاهده شد. کوئرستین با اسیدیته و هدایت الکتریکی خاک همبستگی معنی‌داری نشان نداد.

بین میانگین حداقل دما با محتوای فنلی و فلاونوئیدی کل، گالیک اسید و کوماریک اسید

موجود در عصاره‌های برگ‌های انجیر همبستگی منفی (به ترتیب: r=-۰/۹۸، r=-۰/۹۴، r=-۰/۹۷، r=-۰/۹۶) و معنی‌داری در سطح ۱ درصد وجود دارد. این نتیجه بیانگر این است که در دماهای پایین میزان ترکیبات فنلی افزایش می‌یابد. میانگین حداکثر دما با محتوای فنلی و کوماریک اسید موجود در عصاره‌های برگ‌های لرگ همبستگی منفی (r=-۰/۷۳، r=-۰/۶۹) و معنی‌دار در سطح ۵ درصد نشان می‌دهد. میانگین دمای گرمترین ماه‌ها فقط با کوئرستین موجود در عصاره‌های برگ‌های انجیر همبستگی مثبت (r =۰/۸۲) و معنی‌داری در سطح ۱ درصد نشان داد. میزان بارندگی با محتوای فلاونوئید و گالیک اسید موجود در عصاره‌های برگ‌های لرگ همبستگی منفی (r=-۰/۸۶، r=-۰/۸۲) و معنی‌دار در سطح ۱ درصد نشان می‌دهد. میزان بارندگی فقط با کوئرستین موجود در عصاره‌های برگ انجیر همبستگی منفی (r=-۰/۷۶) و معنی داری در سطح ۵ درصد نشان داد.

بحث

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان می‌دهد که برگ‌های انجیر و لرگ منطقه اسالم بیشترین میزان فنل و فلاونوئید را نسبت به دو منطقه دیگر داشتند و بهترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را در آزمون‌های به دام‌اندازی رادیکال DPPH، نیتریک اکسید و احیاکنندگی آهن سه ظرفیتی نشان دادند. بنابراین، ترکیبات فنلی می‌تواند مسؤول فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های استخراج شده باشند. پیش از این مشابه این نتایج توسط Ghasemi و همکاران (۲۰۰۹) و Josuttis و همکاران (۲۰۱۲) نیز گزارش شده بود. به این مفهوم که سنتز ترکیبات فنلی می‌تواند تحت تأثیر عوامل مشترکی قرار داشته باشد. درصد مواد آلی و درصد ازت خاک با ترکیبات فنلی مورد آزمایش در عصاره‌های هر دو گیاه همبستگی مثبتی نشان داد، در صورتی که سدیم موجود در خاک همبستگی منفی نشان داد. هدایت الکتریکی و اسیدیته خاک با ترکیبات فنلی موجود در گیاه لرگ همبستگی منفی نشان دادند، اما در گیاه انجیر این همبستگی مثبت بود. میزان فسفر خاک با ترکیبات فنلی موجود در عصاره‌های برگ‌های لرگ همبستگی مثبتی داشت، اما در گیاه انجیر رابطه‌ای مشاهده نشد. بین پتاسیم خاک و برخی از ترکیبات فنلی مورد آزمایش در هر دو گیاه همبستگی مثبتی مشاهده شد.

با توجه به نتایج پژوهش حاضر، بین ارتفاع و میزان ترکیبات فنلی مورد آزمایش در عصارهبرگ‌های لرگ همبستگی منفی وجود دارد، اما این همبستگی در مورد گیاه انجیر مثبت است. البته هر دو گیاه جمع آوری شده از منطقه اسالم با ارتفاع بالاتر، بیشترین میزان ترکیبات فنلی را داشتند. Cary و Wink (۱۹۹۴) در مطالعه محتوای آلکالوئیدهای گیاه *Lupinu sargenteus* در کوه‌های راکی گزارش نمودند که با افزایش ارتفاع، محتوای این متابولیت‌ها کاهش می‌یابد، که فصل رشد طولانی‌تر در ارتفاعات پایین‌تر می‌تواند به رشد سریع گیاه منجر شود که به نوبه خود می‌تواند مقادیر بیشتری از منابع را به متابولیت‌های ثانویه جهت محافظت گیاه اختصاص دهد. ارتفاع، مؤثرترین عامل در تولید ترکیبات مؤثره گیاه *Thymus daenensis* در رویشگاه‌های غرب و مرکزی ایران شناخته شده است (Ghasemi *et al.*, 2011). Oloumi و Hassibi (۲۰۱۱) با بررسی محتوای متابولیت‌های ثانویه ریشه

گیاه شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra*) در رویشگاه‌های استان کرمان بیان کردند که ریشه‌های گیاهان رشد یافته در شرایط با ارتفاع پست‌تر، بیشترین کیفیت را از نظر ماده مؤثره گلیسیرین دارند و بیشترین مقدار ترکیبات فنلی در ریشه‌های به دست آمده از مناطق مرتفع‌تر وجود دارد. بنابراین، می‌توان چنین بیان کرد که شدت تابش اشعه مریی یا ماورای بنفش می‌تواند به عنوان عامل تنش بر تولید متابولیت ثانویه مؤثر باشد. در بررسی حاضر، متابولیت ثانویه همبستگی مثبتی را با ارتفاع نشان داد اما به علت رویش گیاه در مناطق با ارتفاع پست، تأثیر کمتری را در تولید متابولیت ثانویه می‌تواند داشته باشد. در مطالعه حاضر بین میانگین دمای محیط با فلاونوئید موجود در عصاره برگ‌های انجیر همبستگی معنی‌داری مشاهده شد، اما با سایر ترکیبات مورد آزمایش رابطه معنی‌داری مشاهده نشد.

میانگین حداقل دمای ماه‌های سرد با محتوای ترکیبات فنلی مورد آزمایش در عصاره گیاه همبستگی منفی نشان داد. بدین معنی که در دماهای پایین میزان ترکیبات فنلی افزایش می‌یابد. درجه حرارت پایین همراه با شدت نور، تنش فتو اکسیداتیو را با محدود کردن آنزیم‌های فتوسنتزی افزایش می‌دهد. در نتیجه، ترکیبات فنلی به عنوان محافظت کننده نوری افزایش می‌یابند (Close and Mc Arthur, 2002). ترکیبات ثانویه گیاهان طیف وسیعی از عملکردهای زیستی را نشان می‌دهند. بنابراین، شناسایی یک یا چند عامل زیست محیطی تنظیم‌کننده سنتز ترکیبات ثانویه در گیاهان بسیار سخت است (Stamp, 2003). گزارش شده است که فلاونوئیدها علاوه بر محافظت کننده نوری، به عنوان بازدارنده گیاهخواری، در زمان صدمه فیزیکی، حمله پاتوژن‌ها و ایجاد میکوریزا هم بیوسنتز آنها افزایش می‌یابد (Ponce *et al*., 2007). برگ گیاهان در منطقه اسالم به علت شدت نوری دریافت شده و حداقل دمای سالانه پایینی که دارند، بیشتر در معرض تنش‌های محیطی قرار دارند و میزان ترکیبات فنلی در آنها بیشتر است.

در مطالعه حاضر، اختلاف معنی‌داری بین محتوای فنل و فلاونوئیدی نمونه‌ها در مناطق مختلف مشاهده شد. آزمون عصاره‌ها، فعالیت آنتی‌اکسیدانی خوبی را در بعضی از آزمون‌ها نشان داد. نتایج بالا تأیید می‌کند که جغرافیا و اقلیم در مناطق مختلف تأثیر معنی‌داری در محتوای ترکیبات زیست فعال و فعالیت آنها دارد. تولید متابولیت‌های ثانویه درگیاهان تحت تأثیر عوامل محیطی و ژنی قرار دارد. به نظر می‌رسد تأثیر عوامل ژنتیک قوی‌تر از عوامل محیطی باشد (Martz *et al*., 2010). گیاهان با شیوه‌های متفاوتی در برابر تنش‌های محیطی واکنش نشان می‌دهند که این اختلاف به علت تفاوت در ژنتیک آنها است. عوامل محیطی هم نقش مهمی در تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارند. گیاهخواری، کمبود مواد مغذی، اشعه ماورای بنفش، دما، حمله پاتوژن‌ها، ارتفاع و آسیب های فیزیکی از جمله عوامل محیطی مهم مؤثر بر تولید ترکیبات فنلی در گیاهان هستند. بیشتر گیاهان با قرار گرفتن در برابر این عوامل محیطی تنش‌زا، تولید ترکیبات فنلی را در خود افزایش می‌دهند و از آنجایی که ترکیبات فنلی یکی از انواع آنتی اکسیدان‌های مهم طبیعی به شمار می‌روند، برای جامعه انسانی دارای اهمیت هستند. با توجه به این که در محیط‌های طبیعی مجموعه‌ای از عوامل می‌توانند بر تولید این ترکیبات در گیاهان مؤثر باشند، به نظر می‌رسد پایین بودن میانگین حداقل دمای سردترین ماه‌های سال و باز

بودن منطقه اسالم و دریافت شدت نور زیاد می‌تواند علت اصلی افزایش ترکیبات فنلی در این دو گونه معرفی کرد. برگ‌های درختان انجیر و لرگ می‌تواند به عنوان منبع آنتی اکسیدان گیاهی در صنایع غذایی، داروسازی و لوازم آرایشی مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

نگارندگان از گروه زیست‌شناسی دانشگاه مازندران و دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی ساری به خاطر همکاری در اجرای این پژوهش، صمیمانه قدردانی می‌نمایند.

منابع

Browics, K. (1978) Chorology of trees and shrubs in Southwest Asia. Polish Academy of Science 33(1): 167.

Cary, D. B. and Wink, M. (1994) Elevation variation of quinlizidine alkaloid contents in a lupine (*Lupinus argenteus*) of the Rocky Mountains. Chemical Ecology 2(4): 849-857.

Chang, C., Yang, M., Wen, H. and Chern, J. (2002) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Food and Drug Analysis 10: 178-182.

Chanwitheesuk, A., Teerawutgularg, A. and Rakariyatham, N. (2005) Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. Food Chemistry 92: 491-497.

Close, D. C. and Mc Arthur, C. (2002) Rethinking the role of many plant phenolics protection from photodamage not herbivores. Oikos 99: 166-172.

Dewis, J. and Freitas, F. (1984) Physical and chemical methods of soil and water analysis. FAO soil bulletin 10, Oxford and 1BH Publishing Co. PVT. LTD. New Dehli Bombay Calcutta.

Ghasemi, K., Ghasemi, Y. and Ebrahimzadeh, M. A. (2009) Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences 22(3): 277-281.

Ghasemi, P. A., Karimi, A., Yousefi, M., Enteshari, S. H. and Golparvar, A. R. (2011) Diversity of *Thymus daenensis* Celak in central and west of Iran. Medicinal Plants Research 5(4): 319-323.

Hurst, W. J., McKim, J. M. and Martin, A. (1983) High performance liquid chromatographic determination of glycyrrhizin in licorice products. Journal of Agricultural and Food Chemistry 31(2): 387-389.

Josuttis, M., Carlen, C., Crespo, P., Nestby, R., Toldam-Andersen, T. B., Dietrich, H. and Kruger, E. (2012) A comparison of bioactive compound of straw berry fruit from Europe affected by genotype and latitude. Berry Research 2(2): 73-93.

Kar, A., Choudhary, B. K. and Bandyopadhyay, N. G. (2003) Comparative evaluation of hypoglycaemic activity of some Indian medicinal plants in alloxan diabetic rats. Journal of Ethopharmacology 84: 105-108.

Martz, F., Jaakola, L., Julkunen-Tiitto, R. and Stark, S. (2010) Phenolic composition and antioxidant capacity of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) leaves in northern Europe following foliar development and along environmental gradients. Chemical Ecology 36: 1017-1028.

Mazid, M., Khan, T. and Mohammad, F. (2011) Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. Biology and Medicine 3(2): 232-249.

Oloumi, H. and Hassibi, N. (2011) Study the correlation between some climate parameters and the

content of phenolic compounds in roots of *Glycyrrhiza glabra*. Medicinal Plants Research 5(25): 6011-6016.

Pearson, K. (1896) Mathematical contributions to the theory of evolution. III. Regression, heredity and anmixia. Philosophical Transactions of the Royal Society Series A 187: 253-318.

Ponce, M. A., Scervino, J. M., Erra-Balsells, R., Ocampo, J. A. and Godeas, A. M. (2007) Flavonoids from shoots, roots and roots exudates of *Brassica alba*. Phytochemistry 65: 3131-3134.

Rashidi, A. A. and Noureddini, M. (2008) The effect of the aromatic water of *Ficus carica* leaves on the blood glucose levels in diabetic rats induced with streptozotocin. Tabib-e-Shargh 10(1): 1-7.

Rashidi, A. A. and Noureddini, M. (2011) Hypoglycemic effect of the aromatic water of leaves of *Ficus carica* in and streptozotocin induced diabetic rats. Pharmacologyonline 1: 372-379.

Schroeter, H., Boyd, C., Spencer, J. P. E., Williams, R. J., Cadenas, E. and Rice-Evans, C. (2002) MAPK signaling in neurodegeneration: influence of flavonoids and of nitric oxide. Neurobiology of Aging 23: 861-880.

Slinkard, K. and Singleton, V. L. (1977) Total phenol analysis automation and comparison with manual methods. American Journal of Enology and Viticulture 28: 49-55.

Stamp, N. (2003) Out of the quagmire of plant defence hypotheses. Quarterly Review of Biology 78: 23-55.

Tavakoli Saberi, M. and Sedaghat, M. R. (2004) Medicinal plants. 1st edition, Roozbehan Publications Tehran (in Persian).

Thrugnanavel, A., Amutha, R., Baby Rani, W., Indira, K., Mareeswari, P., Muthulaksmi, S. and Parthiban, S. (2007) Studies regulation of flowering in acid lime (*Citrus aurantifoila* swingle.). Research Journal of Agriculture and Biological Sciences 3(4): 239-241.

Wink, M. (2010) Functions and biotechnology of plant secondary metabolites. 2nd edition, Wiley-Blackwell Inc., Oxford.

Zarin Kafsh, M. (1983) Applied soil, evaluation, morfology and quantitative analysis soil-water-plant, 2nd edition, Tehran University Publications, Tehran (in Persian).

پیوست ۱- همبستگی بین محتوای ترکیبات فنلی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ انجیر، اقلیم و عوامل خاک. * معنی‌دار در سطح ۵ درصد، ** معنی‌دار در سطح ۱ درصد، بدون ستاره عدم وجود اختلاف معنی‌دار

عامل	فنل	فلاونوئید	دی فنیل پیکریل هیدرازیل	نیتریک اکسید	گالیک اسید	کوماریک اسید	کوئرستین	کربن آلی	اسیدیته	هدایت الکتریکی	نیتروژن	فسفر	پتاسیم	سدیم	ارتفاع	دما	دمای کمینه	دمای بیشینه	بارش باران
فنل	1	0.89**	-0.97**	-0.98**	0.98**	0.94**	0.34	0.95**	-0.84**	0.97**	0.95**	0.62	0.45	-0.80*	0.89**	-0.37	-0.98**	0.33	-0.06
فلاونوئید	0.89**	1	-0.97**	- 0.94**	0.84**	0.97**	-0.03	0.71*	-0.96**	0.88**	0.71*	0.89**	0.002	-0.96**	0.59	-0.74*	-0.94**	-0.12	0.43
دی فنیل پیکریل هیدرازیل	-.097**	-0.97**	1	0.93**	-0.97**	-0.84**	-0.49	-0.99**	0.71*	-0.93**	-0.99**	-0.43	-0.63	0.67	-0.96**	0.16	0.92**	- 0.52	0.23
نیتریک اکسید	-.098**	- 0.94**	0.93**	1	-0.97**	-0.96**	- 0.20	-0.89**	0.91**	-0.96**	-0.89**	- 0.72*	-0.31	0.87**	-0.81**	0.51	0.99**	-0.18	-0.14
گالیک اسید	0.98**	0.84**	-0.97**	-0.97**	1	0.90**	0.36	0.96**	-0.82**	0.95**	0.96**	0.58	0.5	-0.77*	0.90**	-0.33	-0.97**	0.36	-0.05
کوماریک اسید	0.94**	0.97**	-0.96**	-0.84**	0.90**	1	0.16	0.80**	-0.93**	0.90**	0.80**	0.82**	0.15	-0.87**	0.70*	-0.62	-0.96**	0.03	0.28
کوئرستین	0.34	-0.03	-0.49	-0.20	0.36	0.16	1	0.54	0.06	0.25	0.54	-0.33	0.82**	0.21	0.63	0.57	0.20	0.82**	-0.76*
کربن آلی	0.95**	0.71*	-0.99**	-0.89**	0.96**	0.80**	0.54	1	-0.66	0.91**	0.98**	0.36	0.69*	-0.62	0.98**	-0.09	-0.89**	0.59	-0.30
اسیدیته	-0.84**	-0.96**	0.71*	0.91**	-0.82**	-0.93**	0.06	-0.66	1	-0.85**	-0.66*	-0.90**	0.05	0.91**	- 0.53	0.78*	0.92**	0.19	-0.49
هدایت الکتریکی	0.97**	0.88**	-0.93**	-0.96**	0.95**	0.90**	0.25	0.91**	-0.85**	1	0.92**	0.63	0.4	-0.82**	0.85**	- 0.39	-0.96**	0.29	0.02
نیتروژن	0.95**	0.71*	- 0.99**	-0.89**	0.96**	0.80**	0.54	0.98**	-0.66*	0.92**	1	0.36	0.69*	-0.62	0.98**	-0.08	-0.89**	0.59	- 0.30
فسفر	0.62	0.89**	-0.43	-0.72*	0.58	0.82**	-0.33	0.36	-0.90**	0.63	0.36	1	-0.40	-0.87**	0.2	-0.94**	-0.73*	-0.52	0.76*
پتاسیم	0.45	0.002	-0.63	-0.31	0.5	0.15	0.82**	0.69*	0.05	0.4	0.69*	-0.40	1	0.07	0.80**	0.64	-0.30	0.98**	-0.88**
سدیم	-0.80**	-0.96**	0.67	0.87**	-0.77*	-0.87**	0.21	-0.62	0.91**	-0.82**	-0.62	-0.87**	0.07	1	- 0.49	0.77*	0.88**	0.21	-0.50
ارتفاع	0.89**	0.59	-0.96**	-0.81**	0.90**	0.70*	0.63	0.98**	-0.53	0.85**	0.98**	0.2	0.80**	-0.49	1	0.07	-0.80**	0.71*	- 0.45
دما	-0.37	-0.74*	0.16	0.51	-0.33	-0.62	0.57	-0.09	0.78*	-0.39	- 0.08	-0.94**	0.64	0.77*	0.07	1	0.52	0.74*	-0.92**
دمای کمینه	-0.98**	-0.94**	0.92**	0.99**	-0.97**	-0.96**	-0.20	-0.89**	0.92**	-0.96**	-0.89**	-0.73*	-0.30	0.88**	-0.80**	0.52	1	-0.16	- 0.15
دمای بیشینه	0.33	-0.12	- 0.52	- 0.18	0.36	0.03	0.82**	0.59	0.19	0.29	0.59	-0.52	0.98**	0.21	0.71*	0.74*	- 0.16	1	-0.94**
بارش باران	-0.06	0.43	0.23	- 0.14	-0.05	0.28	-0.76*	-0.30	- 0.49	0.02	-0.30	0.76*	-0.88**	- 0.50	- 0.45	-0.92**	- 0.15	-0.94**	1

پیوست ۲- همبستگی بین محتوای ترکیبات فنلی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ لرگ، اقلیم و عوامل خاک. * معنی‌دار در سطح ۵ درصد، ** معنی‌دار در سطح ۱ درصد، بدون ستاره عدم وجود اختلاف معنی‌دار

عامل	فنل	فلاونوئید	دی فنیل پیکریل هیدرازیل	نیتریک اکسید	گالیک اسید	کوماریک اسید	کربن آلی	اسیدیته	هدایت الکتریکی	نیتروژن	فسفر	پتاسیم	سدیم	ارتفاع	دما	دمای کمینه	دمای بیشینه	بارش باران
فنل	1	0.88**	-0.83**	-0.73*	0.84**	0.97**	-0.59	0.98**	-0.91**	0.98**	0.52	0.70*	-0.77*	-0.97**	0.48	-0.95**	-0.73*	- 0.53
فلاونوئید	0.88**	1	-0.99**	- 0.95**	0.94**	0.87**	0.96**	0.86**	-0.72*	0.86**	0.05	0.29	-0.39	-0.82**	0.01	-0.96**	- 0.32	- 0.86**
دی فنیل پیکریل هیدرازیل	-0.83**	- .99**	1	0.98**	- 0.94**	-0.84**	- 0.98**	-0.83**	0.64	-0.83**	0.01	-0.21	0.32	0.78*	0.06	0.94**	0.25	0.90**
نیتریک اکسید	-0.73*	- .95**	0.98**	1	-0.93**	- 0.76*	-0.99**	-0.74*	0.54	-0.74*	0.18	-0.06	0.16	0.69*	0.22	0.89**	0.09	0.96**
گالیک اسید	0.84**	0.94**	- 0.94**	-0.93**	1	0.87**	0.94**	0.86**	-0.67*	0.86**	0.06	0.32	-0.40	-0.82**	0.04	- 0.94**	- 0.34	- 0.82**
کوماریک اسید	0.97**	0.87**	- 0.84**	-0.76*	0.87**	1	0.80**	0.99**	-0.88**	0.99**	0.46	0.67	-0.74*	-0.97**	0.43	0.96**	- 0.69*	- 0.57
کربن آلی	-0.59	0.96**	-0.98**	-0.99**	0.94**	0.80**	1	0.78*	-0.59	0.78*	- 0.12	0.12	-0.22	-0.74*	- 0.16	-0.92**	-0.15	- 0.94**
اسیدیته	0.98**	0.86**	-0.83**	-0.74*	0.86**	0.99**	0.78*	1	-0.89**	0.98**	0.5	0.70*	-0.77*	-0.98**	0.47	- 0.96**	- 0.72*	- 0.54
هدایت الکتریکی	-0.91**	- 0.72*	0.64	0.54	- 0.67*	- 0.88**	-0.59	-0.89**	1	-0.89**	- 0.61	-0.80**	0.83**	0.91**	- 0.61	0.82**	0.80**	0.33
نیتروژن	0.98**	0.86**	-0.83**	-0.74*	0.86**	0.99**	0.78*	0.98**	-0.89**	1	0.5	0.70*	-0.77*	-0.98**	0.47	- 0.96**	- 0.72*	- 0.54
فسفر	0.52	0.05	0.01	0.18	0.06	0.46	- 0.12	0.5	-0.61	0.5	1	0.94**	-0.92**	- 0.53	0.99**	- 0.26	-0.95**	0.43
پتاسیم	0.70*	0.29	- 0.21	- 0.06	0.32	0.67	0.12	0.70*	-0.80**	0.70*	0.94**	1	-0.97**	-0.74*	0.95**	- 0.49	-0.99**	0.19
سدیم	-0.77*	-0.39	0.32	0.16	- 0.40	-0.74*	- 0.22	-0.77*	0.83**	- 0.77*	-0.92**	-0.97**	1	0.78*	- 0.91**	0.57	0.98**	- 0.09
ارتفاع	-0.97**	-0.82**	0.78*	0.69*	-0.82**	-0.97**	-0.74*	-0.98**	0.91**	-0.98**	-0.53	-0.74*	0.78*	1	- 0.52	0.94**	0.76*	0.49
دما	0.48	0.01	0.06	0.22	0.04	0.43	-0.16	0.47	-0.61	0.47	0.99**	0.95**	-0.91**	-0.52	1	- 0.23	-0.94**	0.47
دمای کمینه	-0.95**	-0.96**	0.94**	0.89**	-0.94**	0.96**	-0.92**	-0.96**	0.82**	- 0.96**	- 0.26	-0.49	0.57	0.94**	- 0.23	1	0.52	0.74*
دمای بیشینه	- 0.73*	-0.32	0.25	0.09	-0.34	-0.69*	-0.15	-0.72*	0.80**	- 0.72*	-0.95**	-0.99**	0.98**	0.76*	- 0.94**	0.52	1	- 0.16
بارش باران	-0.53	-0.86**	0.90**	0.96**	-0.82**	- 0.57	-0.94**	-0.54	0.33	- 0.54	0.43	0.19	-0.09	0.49	0.47	0.74*	-0.16	1

Evaluation of phenolic content, total flavonoid and survey of antioxidant activity of leaves of *Ficus carica* and *Pterocarya fraxinifolia* trees using spectrophotometry and high performance liquid chromatograph methods

Naser Jafari [1]*, Pourandokht Naderi [1] and Mohammad Ali Ebrahimzadeh [2]

[1] Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran
[2] Pharmaceutical Sciences Research Center, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

Abstract

In this research, to evaluate the antioxidant activity of leaf *Pterocarya fraxinifolia* (Juglandaceae) and *Ficus carica* (Moraceae) extract were carried out by spectrophotometry and high performance liquid chromatography methods. The leaves of *P. fraxinifolia* and *F. carica* were collected from Whitney and Shast Kalate (Golestan), Noor (Mazandaran) and Asalem (Guilan) forests in Iran. Methanolc extract was used in different experiments. The phenolic compounds (gallic acid, coumaric acid and quercetin) were also measured by using high performance liquid chromatography (HPLC) method.The maximum IC50 for DPPH radical-scavenging activity (595.12±21.4 μg ml^{-1}) were observed in *P. fraxinifolia* leaves. According to the inhibition time, phenolic compound (gallic acid, coumaric acid and quercetin) in *F. carica* leaves and gallic acid and coumaric acid were detected of *Pterocarya* leaves methanol extracts. The maximum amount of gallic acid (78.93) and coumaric acid (8.14) in extracts *Pterocarya* leaves Asalem and the lowest gallic acid (8.56) and coumaric acid (0.89) milligrams per gram was observed in *Ficus* leaf of Noor forest. Based on the standard chromatogram retention time of gallic acid (2.383), coumaric acid (3.817) and quercetin (7.217) mg/g was reported. This study showed that soil factors, such as potassium, sodium, phosphorus and nitrogen compounds with antioxidant phenolic extracts of the leaves of both plants there is a significant correlation.

Key words: *Ficus carica*, *Pterocarya fraxinifolia*, Phenolic compounds, Flavonoids, HPLC

* Corresponding Author: n.jafari@umz.ac.ir