تغییرات فصلی برخی از ترکیبات شیمیایی در چهار کلون چای (*Camallia sinensis* L.)

منصور افشار محمدیان*، ساره ابراهیمی نوکنده، و مریم مسیبی

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۹/۱۷، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۶/۰۳/۳۱)

چکیده:

چای یکی از قدیمی ترین نوشیدنی های جهان محسوب می شود و ترکیبات موجود در شاخساره های چای با توجه به شرایط آب و هوا، فصل، تنوع ژنتیکی و سن شاخه ها متفاوت هستند. در این تحقیق، شاخساره‌های چای شامل یک جوانه‌ی راسی و دو برگ مجاور از کلون-های ۱۰۰، ۲۷۸، ٤٥١ و DN، در سه فصل رویشی بهار، تابستان و پاییز از مرکز تحقیقات چای کشور (لاهیجان) جمع آوری شد. پس از عصاره گیری نمونه‌ها، میزان تغییرات فصلی، قدرت خنثی کنندگی رادیکال آزاد (DPPH)، ترکیبات کافئین، کلروژنیک‌اسید، کوئرستین، کاتچین و اپی‌گالوکاتچین نیز با دستگاه HPLC و پروتئین کل ارزیابی شد. نتایج این پژوهش نشان داد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی کلون‌های ۱۰۰ و ٤٥١ از اولین برداشت (بهار) تا سومین برداشت (پاییز) افزایش یافت، در حالیکه در کلون‌های ۲۷۸ و DN عکس این قضیه مشاهده شد. میزان پروتئین کلون‌های ۱۰۰ و DN در سه برداشت مختلف تغییرات ناچیزی را نشان داد. این نتایج، تاثیر تغییرات فصلی را بر روی ترکیبات شیمیایی شاخساره‌های جوان چای نشان می‌دهد.

کلید واژه: پروتئین کل، چای، ظرفیت آنتی اکسیدانی، کافئین، کوئرستین

مقدمه

چای (*Camallia sinenss*) گیاهی دولپه و همیشه سبز از خانواده Camelliaceae است. برگ سبز چای شامل ترکیبات مختلف از جمله پلی فنل ها، ترپنوئیدها و گروهی از ترکیبات شیمیایی و زیستی است که دارای خواص آنتی باکتریال و آنتی اکسیدانی هستند. تلخی چای نیز به علت وجود ترکیبات پلی فنلی که حدود ۳۰ درصد ماده‌ی خشک شاخساره‌ی جوان چای را تشکیل می‌دهند. پلی‌فنل‌ها ماده‌ی شیمیایی اصلی در چای هستند و شامل فلاوون‌ها، کاتچین‌ها، فلاونون‌ها، ایزوفلاون‌ها و غیره می‌باشند (Halliwell, 1995). پلی‌فنل‌های برگ چای، نمونه‌ای از آنتی‌اکسیدان‌های قوی هستند که اغلب نقش مهمی در پیشگیری از سرطان، از طریق جلوگیری از اکسیداسیون DNA در سلول دارند.

کلروژنیک‌اسید یکی دیگر از ترکیبات فنلی مهم است که در قهوه ، چای، آلو (Stacewicz *et al.*, 2001) هلو و بامبو (Kweon *et al.*, 2001) شناسایی شده است. این ترکیب یک حد واسط بیوسنتزی مهم در سنتز لیگنین است و از خاصیت آنتی اکسیدانی بالایی نیز برخوردار است (Boerjan *et al.*, 2003). فلاونوئیدها یکی از بزرگترین گروه‌های فنلی گیاهان هستند. دسته‌ای از فلاونوئیدهای گلیکوزیدی نیز در گیاهان وجود دارند که از آن جمله می‌توان به کامپفرول کوئرستین، ایزورامنتین، روتین و هسپریدین اشاره کرد (Victore *et al.*,1998).

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: afshar1357@gmail.com

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.23.24.7]

بیش از سه چهارم پلی‌فنل چای را فلاونول‌ها تشکیل می دهند. فلاونول‌ها گروهی از ترکیبات زرد رنگ هستند که به سرعت تغییر رنگ داده و قهوه‌ای می‌شوند. در برگ سبز چای بیش از ۲۳ نوع پلی‌فنل تشخیص داده شده که از نظر تقسیم بندی در گروه فلاونول‌ها قرار می‌گیرند. فلاونول‌های گیاه چای، از نظر ساختار شیمیایی خیلی نزدیک به کاتچین می باشند (معزی، ۱۳۸۸). کاتچین چای که در گذشته به غلط تانن نامیده می‌شد، یکی از مهم‌ترین ترکیبات شیمیایی برگ سبز و چای خشک است. میزان کاتچین موجود در برگ سبز چای نقش مهمی در ایجاد عطر، طعم، مایه‌دار بودن و یا غلظت رنگ نوشابه‌ی چای و نقش آنتی اکسیدانی دارد (معزی، ۱۳۸۸). برگ‌های سبز چای محتوی شش کاتچین اصلی هستند و اغلب ٤۲-۳۰ درصد از وزن خشک را در برگ چای شامل می‌شوند (Tijburg *et al.*, 1997). انواع کاتچین‌ها شامل اپی‌گالوکاتچین گالات (EGCG)، اپی کاتچین (EC)، کاتچین‌گالات (CG)، اپی‌کاتچین‌گالات (ECG)، اپی‌گالوکاتچین (EGC) و کاتچین (C)می باشند. دو کاتچین اپی‌گالوکاتچین‌گالات و اپی‌کاتچین گالات در مجموع ۷٦/۲ درصد کاتچین‌ها را شامل می‌شوند. نقش این دو در رنگ و طعم و کیفیت فرآورده بسیار تاثیرگذار است. کاتچین‌های چای دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی، حتی بیشتر از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی از قبیل ویتامین C و E و بتاکاروتن می‌باشند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی این نوع از پلی‌فنل های چای فقط به دلیل توانایی آنها در پاکسازی سوپراکسید نیست و اغلب به دلیل افزایش فعالیت بعضی از آنزیم‌های سم زدا از قبیل گلوتاتیون‌پراکسیداز، گلوتاتیون‌ردوکتاز، گلوتاتیون S ترانسفراز، کاتالاز و محصولات کوئینون در روده‌ی کوچک، کبد و ششها است. این ویژگی بسیار قوی آنتی‌اکسیدانی چای، احتمالا در جلوگیری از اختلالاتی چون تصلب شرائین در انسان مؤثر است (Adnan *et al*, 2013 ; Miura et *al.*, 2001; Alexandr Ya, 2015).

از جمله مواد نیتروژنه‌ی برگ سبز چای آلکالوئیدها هستند که حدود ۲ تا ٤ درصد وزن مواد جامد برگ سبز چای را تشکیل می‌دهند. در برگ چای، سه ماده‌ی آلکالوئیدی موسوم به کافئین، تئوبرومین و تئوفیلین وجود دارد (معزی، ۱۳۸۸). چای از منابع اصلی کافئین طبیعی است و به طور معمول، هر گرم برگ خشک چای دارای ۵۰-۲۰ میلی‌گرم کافئین است (Yamauchi *et al.*, 2008). کافئین از نظر داروشناسی یک ماده‌ی فعال محسوب می‌شود و بسته به میزان مصرف، اثراتی را مثل: افزایش فعالیت دستگاه عصبی مرکزی، افزایش هوشیاری و تمرکز و کاهش خستگی (با مصرف متوسط و نه زیاد)، گشادکننده‌ی مجاری تنفسی، افزایش جریان خون کلیوی، افزایش ورود کلسیم به ماهیچه‌های قلبی و سایر بافت ها وغیره در بدن اعمال می‌کند (معزی، ۱۳۸۸). پروتئین‌ها از جمله مهم‌ترین مواد برگ سبز چای می‌باشند که در فرآیند تولید شکسته شده و به اسیدهای آمینه تبدیل می‌شوند. از نقطه‌نظر بیوشیمی، هرگاه مقدار پروتئین در گیاه از حد معینی تجاوز نماید، موجب کاهش میزان کاتچین و در نتیجه تنزل کیفیت و مرغوبیت می‌شود. به طور کلی، مقدار پروتئین در برگ سبز بوته‌ی چای پرورش یافته در زیر درختان سایه افکن، به مقدار قابل ملاحظه‌ای افزایش پیدا می‌کند. استفاده از این گونه برگ‌های چای که حاوی مقادیر بالاتری از پروتئین هستند، در تولید چای سیاه موجب کاهش رنگ و طعم می شود، در حالی که در تولید چای سبز هر قدر درصد پروتئین های برگ سبز چای بیشتر باشد، چای تولید شده از مرغوبیت و کیفیت بیشتری برخوردار خواهد شد.

مطالعاتی در رابطه با تغییرات فصلی ترکیبات چای در فصول مختلف برداشت در کشورهای مختلف انجام شده است، اما تاکنون تحقیقات کمی در این رابطه در ایران صورت گرفته است. گزارش‌هایی وجود دارد که نشان داده‌اند میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی برگ چای با تغییرات آب و هوا، تنوع گونه‌ای و سن برگ‌ها تغییر می‌یابند. نصیری‌راد و همکاران (۱۳۸۷) به مطالعه‌ی میزان تغییرات ترکیبات فنلی، در چای سبز (رقم هیبرید چینی) جمع‌آوری شده در فصول مختلف برداشت پرداختند و مشاهده کردند که گیاهان چای برداشت شده در فصل بهار و تابستان، دارای سطوح بالاتری از پلی‌فنل‌ها نسبت به گیاهان چای حاصل از برداشت پاییز بودند. آنها دمای هوا و میزان دریافت نور خورشید را عامل مهمی در مقدار بالای پلی فنل‌های گیاهان چای فصول بهار و تابستان معرفی کردند. Wei

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.23.24.7]

و همکاران (۲۰۱۱) که برخی از ترکیبات موجود در برگ چای ۱۰ منطقه‌ی مختلف ژاپن را مطالعه کردند، گزارش کردند که محتوای کاتچین می‌تواند تحت تاثیر عوامل محیطی افزایش یا کاهش یابد. Wang و همکاران (۲۰۱۱) در پژوهشی که بر روی ۳ کلون مختلف گیاه چای در کشور چین پرداختند، نشان دادند که بین متوسط دمای روزانه و مقدار پلی فنل ها همبستگی شدید وجود دارد و می‌تواند روی میزان پلی فنل ها و هم در میزان هر کدام از انواع فلاونول‌ها به تنهایی، تاثیرگذار باشد.

برگ‌های جوان، ترد و شادابی که از بوته‌های چای چیده می‌شوند، بخش مرغوب مورد استفاده‌ی این گیاه برای چایسازی هستند. ترکیبات مهم ایجاد کننده‌ی رنگ و طعم در چای، در قسمت‌های جوان شاخساره که در برگیرنده‌ی غنچه و برگ‌های اول می‌باشند، بیشتر است. برداشت برگ سبز چای در ایران از اوایل اردیبهشت تا اوایل آبان در سه چین (برداشت) عمده شامل چین بهار، تابستان و پاییز انجام می شود. میزان تولید محصول و کیفیت آن در زمان‌های مذکور با توجه به شرایط آب‌و هوایی متفاوت است. در این پژوهش با اعمال برگ‌چینی استاندارد یک غنچه و دو برگ در دوره‌های برگ‌چینی بهار (اردیبهشت)، تابستان (تیر) و پاییز (آبان)، به بررسی تغییرات فصلی برخی از ترکیبات فنلی و غیر فنلی سه ژنوتیپ انتخابی داخلی ۱۰۰، ۲۷۸ و ۴۵۱ و رقم سریلانکایی DN پرداخته شد. هدف از انجام این پژوهش، ارزیابی برخی ترکیبات شیمیایی شاخساره‌های جوان چای در سه فصل رویشی بهار، تابستان و پاییز با توجه به تغییر عوامل موثر بر رشد و نمو چهار رقم گیاه چای در فصول متفاوت و در شرایط باغ چای (نه در گلخانه) بود.

مواد و روش ها

نمونه‌برداری: شاخساره‌های جوان چای شامل یک جوانه‌ی راسی و دو برگ مجاور، از کلون‌های ۱۰۰، ۲۷۸، ۴۵۱ و کلون خارجی DN، از مرکز تحقیقات چای کشور (لاهیجان)، در سه فصل رویشی بهار، تابستان و پاییز (۱۵ اردیبهشت، ۱۵ تیر و ۱۵ آبان) جمع‌آوری و سپس نیمی از نمونه‌ها به مخزن حاوی نیتروژن مایع انتقال داده شدند و پس از بسته‌بندی و نامگذاری، در فریزر ۷۰- درجه نگهداری شدند. کلون‌های ۲۷۸، ۴۵۱ و ۱۰۰ ازکلون‌های امیدبخش چایکاری منطقه‌ی غرب گیلان هستند که در برنامه‌ی اصلاح نباتی به روش گزینش کلونی (Clonal selection) انتخاب و در جریان مقایسات نهایی عملکرد و کیفیت قرار دارند. از نظر محصول برگ سبز (دو برگ و یک غنچه‌ی جوان) و نیز از لحاظ خصوصیات کیفی نوشابه، دارای تفاوت معنی‌داری نسبت به بوته‌های بذری موجود در باغ‌های چای فعلی می‌باشند.

رقم کلونی DN یکی از ارقام مقاوم به خشکی و نیز متحمل به نماتد مولد زخم ریشه‌ی چای است که سال‌ها پیش در کشور سریلانکا انتخاب و پس از مقایسات عملکرد، کیفیت و سنجش مقاومت نسبت به عوامل فوق، به عنوان یک رقم برای چایکاران مناطق مختلف سریلانکا معرفی شده است. این رقم با هدف بهره‌برداری در برنامه‌های اصلاح چای در ایران، حدود بیست سال پیش وارد کشور شده و در کلکسیون ژرم پلاسم چای نگهداری می‌شود (غلامی، ۱۳۹۱).

موقعیت و ویژگی‌های آب‌وهوایی: نمونه‌برداری از مرکز تحقیقات چای کشور واقع در شهر لاهیجان انجام شد. این شهر در ناحیه‌ی کوهپایه‌ای در ۵۰ درجه و صفر دقیقه‌ی شرقی و در ۳۷ درجه و ۱۱ دقیقه‌ی شمالی عرض جغرافیایی قرار دارد. در تابستان اقلیم لاهیجان گرم و مرطوب است. در زمستان، ابتدا بادهای گرم شدید می‌وزد و سپس برف می‌بارد. رطوبت نسبی ۷۶ تا ۷۹ درصد بوده و البته گاهی به صددرصد نیز می‌رسد.

استخراج عصاره: به منظور تهیه‌ی عصاره، از روش عصاره‌گیری بخشی و آراکاوا (۲۰۰۶) استفاده شد. به این ترتیب که مقداری از نمونه‌ی تازه‌ی هر یک از کلون‌ها که در فریزر ۷۰- نگهداری شده بود ، به مدت ۴۸ ساعت در آون با دمای ۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس ۰/۵ گرم از نمونه‌ی برگ خشک شده، در هاون ساییده شد و به میکروتیوپ‌هایی مشخص انتقال داده شد. پس از آن، به هریک از میکروتیوپ‌ها، ۱۵۰۰ میکرولیتر حلال استخراج شامل

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.23.24.7]

متانول- استیک اسید (نسبت ۸۵ به ۱۵) اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شد. سپس میکروتیوپ‌های حاوی نمونه، در سانتریفیوژ قرار گرفته و مدت ده دقیقه با سرعت (rpm) ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شد. محلول روشناور که حاوی عصاره‌ی گیاه بود، با دقت توسط سمپلر جدا شده و به میکروتیوپ‌هایی با ذکر مشخصات جهت ارزیابی انتقال داده شد. میکروتیوپ‌ها در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد برای استفاده در مراحل بعدی آزمایش قرار داده شدند. این عمل برای نمونه‌های هر یک از فصول بهار، تابستان و پاییز به صورت جداگانه در سه تکرار انجام شد (نمونه های جمع آوری شده سه بار عصاره گیری شدند). میکروتیوپ‌های حاوی عصاره در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد برای استفاده در مراحل بعدی نگه داشته شدند.

تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی: فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از سنجش پاک‌سازی رادیکال آزاد DPPH (۲ و۲- دی‌فنیل-۱- پیکریل‌هیدرازیل) ارزیابی شد (Kontogiorgis and Hadjipavlou-Litina 2005). برای این منظور، با استفاده از سمپلر، ۵۰ میکرولیتر از عصاره‌ی ۳۰ برابر رقیق شده، داخل میکروتیوپ ریخته شد. سپس ۹۵۰ میکرولیتر محلول ۰/۱ نرمال DPPH به آن اضافه شد. کنترل و بلانک نیز به ترتیب با ۱ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ نرمال در متانول و ۱ میلی‌لیتر حلال استخراج آماده شد. سپس میکروتیوپ‌ها به خوبی تکان داده شده و به مدت ۳۰ دقیقه در یک محفظه‌ی تاریک در دمای اتاق قرار داده شد. پس از گذشت این زمان، جذب کنترل و نمونه در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. با قرار دادن جذب مربوط به کنترل و نمونه در رابطه‌ی زیر، درصد جمع-آوری رادیکال آزاد بدست آمد. حجم نمونه‌ها برای آزمون ، بلانک (صفر) و استاندارد یک میلی‌لیتر بود. این آزمایش برای نمونه‌های هر کلون در هر فصل به طور جداگانه در ۳ تکرار انجام شد. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها به صورت درصد بازدارندگی DPPH با استفاده از رابطه۱ محاسبه شد.

$$\%DPPH_{sc} = (A_{cont} - A_{samp}) / A_{cont} \times 100$$ رابطه ۱

%DPPHsc= درصد بازدارندگی

A_{cont} = میزان جذب DPPH

A_{samp}= میزان جذب (نمونه + DPPH)

تعیین میزان ترکیبات فنلی: ابتدا عصاره‌های تهیه شده به مدت ۱۰ دقیقه در دور (rpm) ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. پس از آن حدود ۲۰۰ میکرولیتر از بخش روشناور برداشته شد و از فیلتر سرسرنگی یکبار مصرف با قطر منافذ ۰/۴۵ میکرومتر عبور داده شد. برای تهیه‌ی محلول استاندارد، به ۱ میلی‌گرم از هر استاندارد مقدار ۱ میلی‌لیتر از حلال استخراج مورد استفاده برای استخراج ترکیبات فنلی (متانول‌اسیدی با نسبت ۸۵:۱۵) اضافه شد. سپس محلول‌ها با استفاده از فیلتر سرسرنگی فیلتر شدند.

تعیین اجزای تشکیل دهنده‌ی مواد فنلی نمونه‌ها با استفاده از سیستم HPLC (Breeze system, Waters, Ma, USA)، مجهز به یک پمپ دوتایی (binary) نوع Waters ۱۵۲۵ و شناساگر UV-Visible (Waters Dual λ Absorbance 2487) انجام شد. جداسازی ترکیبات فنلی در یک ستون Symentery C18 (۱۵۰×۴/۶ میلی‌متر با قطر منافذ ۵ میکرومتر، (Waters, Dublin Ireland) با استفاده از دو حلال A (۹۵ درصد آب: ۵ درصد متانول (HPLC grade) و B (۵ درصد آب: ۹۵ درصد متانول) با pH حدود ۳ انجام شد. برای تنظیم pH حلال‌ها از استیک‌اسید استفاده شد. حلال‌ها قبل از استفاده با استفاده از فیلتر استات‌سلولز (Sartorios) فیلتر می‌شدند. ستون در دمای اتاق نگهداری می‌شد. سرعت جریان فاز متحرک داخل ستون یک میلی‌لیتر در دقیقه بود.

در این مطالعه ترکیبات فنلی اندازه‌گیری شده شامل کلروژنیک‌اسید، کاتچین، اپی‌گالوکاتچین، کوئرستین ۳-گالاکتوزید و کافئین بود. برای اندازه‌گیری ترکیبات فوق، شناساگر به ترتیب در طول‌موج‌های ۳۵۰، ۲۸۰، ۲۸۰، ۳۵۰ و ۲۸۰ نانومتر تنظیم شد. ابتدا ۵۰ میکرولیتر از محلول‌های استاندارد آماده شدند و در طول موج‌های مربوطه تزریق شدند و پیک‌های مربوط به استانداردها به دست آمد.

برای جداسازی و اندازه‌گیری مقدار این ترکیبات در عصاره‌ی تهیه شده از برگ گیاه چای، مقدار ۵۰ میکرولیتر از نمونه در هر یک از طول موج‌ها به دستگاه تزریق شدند. از

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.23.24.7]

عصاره‌های تهیه شده برای سنجش ترکیبات فوق استفاده شد. همه آنالیزها در ۲ تکرار انجام شد. به منظور آنالیز کمی، کروماتوگرام‌های حاصل از تزریق هر نمونه در هر تیمار، با کروماتوگرام‌های به دست آمده از تزریق استانداردهای مربوطه مقایسه و در نهایت غلظت این ترکیبات برحسب میکروگرم در یک گرم وزن خشک محاسبه شد.

سنجش پروتئین کل: به منظور سنجش فعالیت پروتئین کل نمونه های گیاهی، از بافر استخراج مناسب شامل بافر پتاسیم-فسفات ۵۰ mM با pH= ۵/۲، PVPP (Poly vinyl poly pyrolidon) ۲٪ و EDTA (Ethylene diamine tetra acetic acid) ۰/۵ mM استفاده شد.

برای استخراج عصاره، جهت سنجش میزان پروتئین از نمونه‌های تازه‌ی برگ گیاه چای استفاده شد. بدین منظور ابتدا ۰/۵ گرم بافت تازه‌ی برگ به کمک نیتروژن مایع پودر و به آن بافر استخراج فسفات اضافه شد. سپس نمونه‌ها در دمای ٤ درجه‌ی سانتی‌گراد با دور (rpm) ۱٤۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند (سانتریفیوژ یخچال‌دار مدل Hettich ساخت کشور آلمان). بعد از سانتریفیوژ، محلول رویی با دقت برداشته شده و به میکروتیوب دیگری انتقال یافته و جهت انجام آزمایش استفاده شدند.

جهت تعیین محتوای پروتئینی عصاره‌ی استخراج شده، از روش برادفورد (۱۹۷٦) استفاده شد. در این روش از پروتئین گاما گلوبولین پلاسمای گاوی (BSA) به عنوان پروتئین استاندارد، برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد. عامل ایجاد رنگ در روش برادفورد، ماده‌ای به نام کوماسی‌برلیانت‌بلو G-250 است. این ماده با آمینواسیدهای آروماتیک و بازی واکنش می‌دهد. بدین منظور عصاره‌ی استخراج شده، به ۲/۵ میلی‌لیتر معرف برادفورد اضافه و محتویات لوله‌ها پس از مخلوط شدن، به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی قرار گرفتند. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد و غلظت پروتئین کل بر اساس مقایسه با منحنی استاندارد محاسبه شد:

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: جهت آنالیز داده‌ها از نرم افزار SPSS 19 و برای مقایسه‌ی میانگین‌ها از آزمون دانکن و برای رسم نمودارها از نرم افزار Excell استفاده شد.

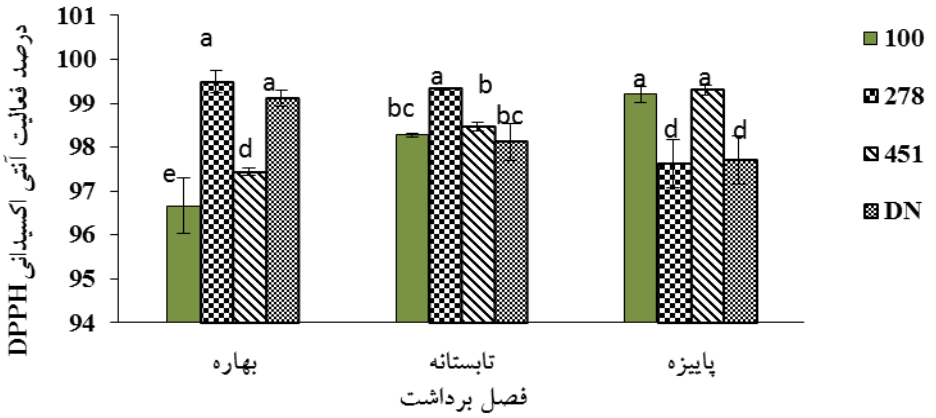
نتایج و بحث:

ظرفیت خنثی کنندگی رادیکال آزاد DPPH: تغییرات فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی گیاه چای در چهار کلون تحت مطالعه، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از فعالیت پاکسازی رادیکال آزاد نشان داد که کلون ۱۰۰ بهاره، دارای کمترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی بود و در برداشت‌های دیگر به تدریج بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن افزوده شد (شکل ۱). بصورت مشابه با کلون ۱۰۰، فعالیت آنتی‌اکسیدانی کلون ٤۵۱ نیز از برداشت اول تا برداشت سوم افزایش پیدا کرد و بر خلاف این دو کلون، از میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی کلون DN از اولین برداشت تا سومین برداشت کاسته شد. همان طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، کلون ۲۷۸ هم در برداشت بهاره و هم در برداشت تابستانه درصد بالایی از فعالیت آنتی اکسیدانی خود را حفظ کرده بود.

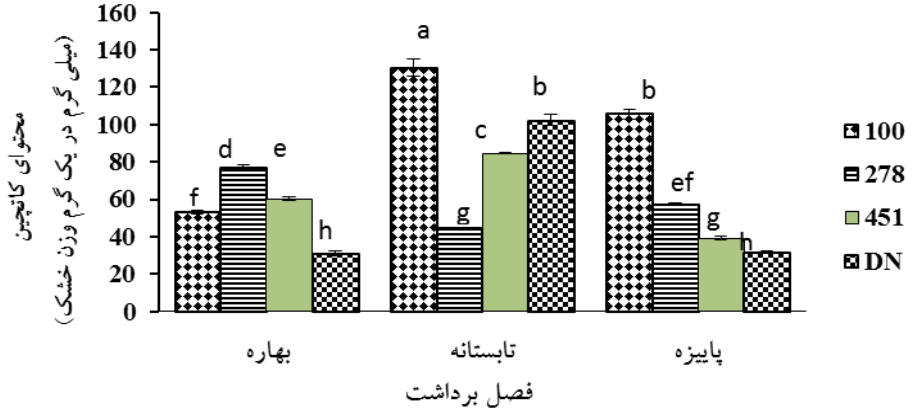
همانطور که مشخص است، میزان بالایی از فعالیت آنتی اکسیدانی در هر چهار کلون بررسی شده ی چای مشاهده شد، به طوری که کلون‌های ۲۷۸ و DN بهاره، ۲۷۸ تابستانه و ۱۰۰ و ٤۵۱ پاییزه مقادیر بالای ۹۹٪ را نشان دادند. در کلون‌های ۱۰۰ و ٤۵۱، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی از اولین برداشت تا سومین برداشت روند افزایشی نشان داد، در حالیکه در کلون های ۲۷۸ و DN عکس این قضیه مشاهده شد. گزارش‌هایی وجود دارد که نشان داده‌اند میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی برگ سبز چای با تغییرات آب‌وهوا، تنوع گونه‌ای و سن برگ‌ها تغییر می‌یابند (Leung and foster 1996) که نتایج حاصل از پژوهش حاضر، با یافته‌های این محققین مطابقت دارد. Ercisli و همکاران (۲۰۰۸) در مطالعه‌ای روی گیاه چای نشان دادند که میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در برداشت دوم (تیر ماه)، نسبت به دو برداشت دیگر (اردیبهشت و شهریور) بالاتر بود. در رقم ۲۷۸ و DN، کاهش در مقدار آنتی اکسیدان ها با عبور از فصل بهار به پاییز مشهود است که حاکی از تاثیر تغییرات فصلی در ترکیبات آنتی اکسیدان می باشد. در تحقیقی که

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.23.24.7]



شکل ۱- درصد فعالیت پاکسازی رادیکال آزاد کلون‌های ۱۰۰، ۲۷۸، ٤٥١ و DN گیاه چای در سه فصل رویشی بهار، تابستان و پاییز. میانگین هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک در سطح ۵ درصد آزمون دانکن اختلاف معنی داری ندارند.



شکل ۲- تغییرات محتوای کاتچین درکلون‌های ۱۰۰، ۲۷۸، ٤٥١ و DN گیاه چای در سه فصل رویشی بهار، تابستان و پاییز. میانگین هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک در سطح ۵ درصد آزمون دانکن اختلاف معنی داری ندارند.

توسط Erturk و همکاران (۲۰۱۰) انجام شد، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی شاخساره‌های چای، در برداشت سوم نسبت به دو برداشت دیگر بیشتر بود. این محققین تفاوت دمای روز و شب در ماه‌های مختلف برداشت، شدت تابش خورشید و باران‌های نامنظم در منطقه‌ی برداشت شاخساره را مهمترین عوامل القای تغییرات فصلی در برخی از ترکیبات بیوشیمیایی چای عنوان کردند. تغییرات عمده در فعالیت آنتی‌اکسیدانی برگ چای در زمان‌های مختلف برداشت، احتمالاً تاثیر تغییرات عوامل اکولوژیکی روی آن را نشان می‌دهد.

تغییرات محتوای کاتچین: در این پژوهش محتوای کاتچین عصاره‌ی برگ‌های کلون‌های ۱۰۰، ۲۷۸، ٤٥١ و DN توسط دستگاه HPLC مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل از آنالیز کروماتوگرام‌ها نشان دادند که کلون DN در دو برداشت بهار و پاییز دارای کمترین و کلون ۱۰۰ در برداشت تابستان و پاییز دارای بیشترین مقدار کاتچین بودند (شکل۲).

بطور کلی می‌توان گفت که هر یک از کلون‌ها در فصول مختلف برداشت، دارای مقادیر متفاوتی از کاتچین بودند. کلون‌های ۱۰۰، ٤٥١ و DN در برداشت دوم دارای بیشترین محتوای کاتچین بودند، در حالیکه محتوای کاتچین کلون ۲۷۸ در برداشت اول بیشتر بود.گزارش شده که مقدار کاتچین برگ سبز و چای خشک در دوره‌های مختلف برداشت بر حسب شرایط اقلیمی به خصوص تابش نور خورشید فرق می‌کند (Alexandr Ya, 2015). تولید کاتچین‌ها در گیاه چای در نور زیاد افزایش و با سایه کاهش می‌یابد. این پدیده به فعالیت

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.23.24.7]

فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز که آنزیم کلیدی در بیوسنتز حلقه‌ی B کاتچین می‌باشد، بستگی دارد. وقتی که گیاه در سایه قرار می گیرد (دور از نور)، فعالیت این آنزیم به شدت کاهش می‌یابد. بیوسنتز کاتچین‌ها همچنین با افزایش دما، احتمالا به علت القای بیوسنتز این ترکیبات در گرما و حالت تنش، افزایش می یابد (Wang *et al.*, 2011). همچنین مقدار کاتچین به وضعیت توپوگرافی مناطق چایکاری بستگی دارد و مقدار آن در بوت های چای پرورش یافته در دشت، به مراتب بیشتر از محصول باغات چای واقع در دامنه‌ی کوه و تپه‌ها می‌باشد. فاصله‌ی دو برگ‌چینی متوالی نیز در میزان کاتچین برگ‌ها تاثیرگذار است. اگر برگ‌چینی به اندازه‌ای عقب بیافتد که برگ‌ها مسن و خشبی شوند، میزان کاتچین کاهش یافته و به دنبال آن چای تولید شده از این برگ‌ها، از کیفیت پایین‌تری برخوردار خواهند شد. با شروع تابستان و بلند شدن طول روز و افزایش ساعات نور خورشید، بر میزان کاتچین در برگ‌های چای افزوده می‌شود (معزی، ۱۳۸۸) که نتایج این پژوهش نیز این مطلب را تایید می‌کند.

تغییرات محتوای اپی‌گالوکاتچین: با تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از داده‌های دستگاه HPLC، مقدار اپی‌گالوکاتچین کلون‌های مورد مطالعه، در سه برداشت بهاره، تابستانه و پاییزه که در شکل ۳ دیده می‌شود، نشان داد که کلون‌های ۱۰۰ و DN به ترتیب در فصل پاییز و تابستان دارای بیشترین مقدار اپی‌گالوکاتچین بودند.

در پژوهشی Wang و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند که محتوای اپی‌گالوکاتچین از برداشت تابستانه تا برداشت پاییزه کاسته می‌شود که نتایج ما در برخی از کلون‌ها مثل کلون ٤٥١ و DN نتایج آنها را تأیید می‌کند. بر اساس تحقیقات Lee و همکاران (۲۰۱۰)، شاخساره‌های چایی که در مناطق با دمای بالا و تابش و بارش زیاد رشد کرده بودند، سطوح پایین‌تری از اپی‌گالوکاتچین و کافئین نسبت به گیاهانی که در مناطق با دمای نسبتا پایین، نور کم و کم بارش کشت شده بودند را شامل می‌شدند. در پژوهشی دیگر Yaoو همکاران (۲۰۰۵) نیز به بررسی تغییرات فصلی برخی از ترکیبات فنلی چای پرداختند و مشاهده کردند که میزان فنلیک‌هایی مثل اپی کاتچین‌گالات و اپی‌گالوکاتچین گالات، در ماه‌های گرم سال بیشتر و در مقابل، میزان اپی‌گالوکاتچین و کاتچین کل در ماه های سرد سال بیشتر بود. آنها علت این تغییرات را تاثیر یک یا همه‌ی عوامل محیطی مختلف مانند طول روز، شدت تابش و دما که طی فصول مختلف تغییر می‌یابند، عنوان کردند.

تغییرات محتوای کافئین: محتوای کافئین عصاره‌ها، توسط دستگاه HPLC مورد ارزیابی قرار گرفتند. در این بررسی، محتوای کافئین کلون ۱۰۰ در دو برداشت بهار و تابستان، تفاوت معنی‌داری نشان نداد، ولی عصاره‌های بدست آمده از فصل پاییز این کلون، دارای کافئین بالاتری نسبت به دو فصل دیگر بودند. مقدار این ترکیب در کلون ٤٥١ از برداشت اول تا برداشت سوم به طور معنی‌داری کاهش یافته بود. بیشترین میزان کافئین در کلون DN در برداشت تابستان مشاهده شد و محتوای کافئین این کلون در دو برداشت دیگر تفاوت معنی داری نشان نداد. کلون ۲۷۸ نیز در برداشت بهاره بیشترین محتوای کافئین را داشت و در دو برداشت دیگر تفاوت معنی داری مشاهده نشد (شکل ٤).

مقدار کافئین بیش از ۸۰٪ پورین آلکالوئیدهای گیاه چای را تشکیل می‌دهد. همانطور که در شکل ٤ نشان داده شده است، کلون ۲۷۸ در برداشت اول، کلون DN در برداشت دوم و کلون ۱۰۰ در برداشت سوم دارای بیشترین مقدار کافئین بودند. کلون ٤٥١ از برداشت اول تا برداشت سوم روند کاهشی نشان داد. تولید و تجمع پورین آلکالوئیدها با تغییرات فصلی، همبستگی نشان می‌دهد. وجود شرایطی مثل دمای بالا، تابش و بارش زیاد دلیلی برای افزایش مقدار کافئین چای عنوان شده است(Wang *et al*, 2011).

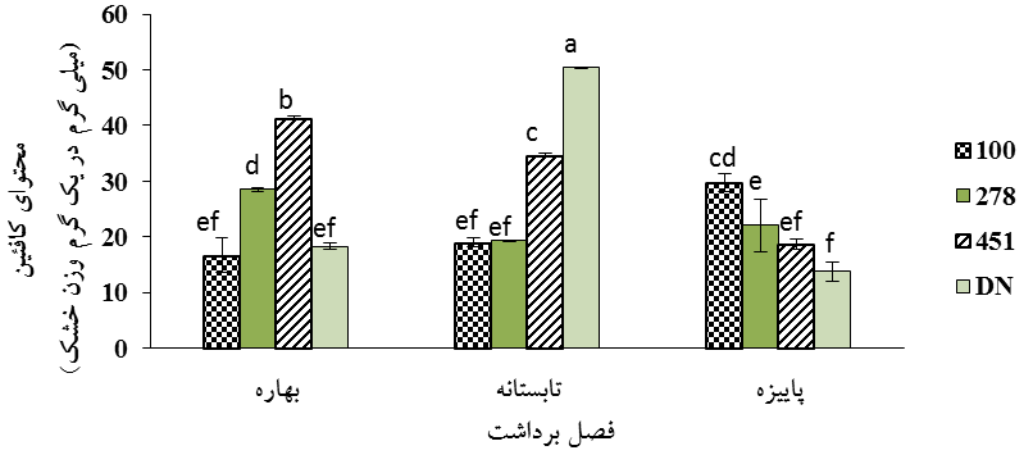
تغییرات محتوای کلروژنیک‌اسید: محتوای کلروژنیک‌اسید عصاره‌ی کلون‌های مورد مطالعه در شکل ۵ نشان داده شده است. با توجه به تجزیه و تحلیل داده‌های کروماتوگرام‌ها مشاهده شد که برداشت بهاره‌ی کلون DN دارای بیشترین میزان این ترکیب بود.

کلروژنیک‌اسید به یک خانواده از استرهای هیدروکسی

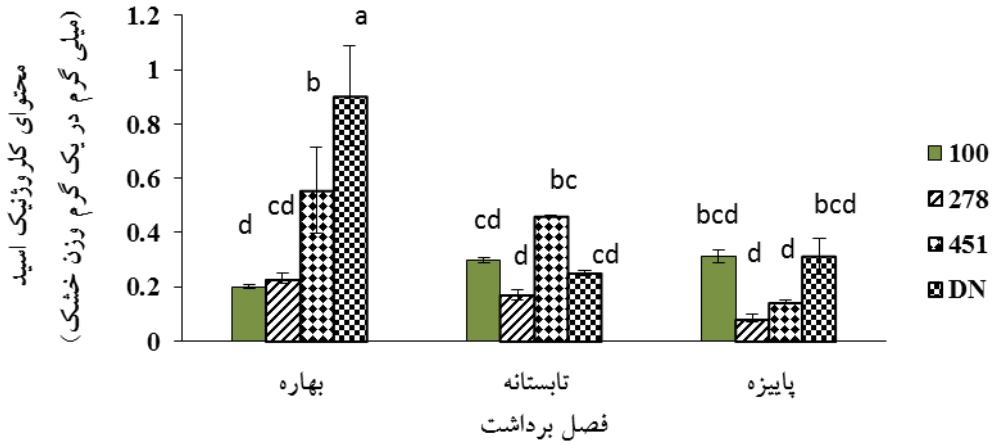
[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.23.24.7]

شکل ۳- تغییرات محتوای اپی‌گالوکاتچین درکلون‌های ۱۰۰، ۲۷۸، ٤٥١ و DN گیاه چای در سه فصل رویشی بهار، تابستان و پاییز. میانگین هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک در سطح ۵ درصد آزمون دانکن اختلاف معنی داری ندارند.



شکل ٤- تغییرات محتوای کافئین درکلون‌های ۱۰۰، ۲۷۸، ٤٥١ و DN گیاه چای در سه فصل رویشی بهار، تابستان و پاییز. میانگین هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک در سطح ۵ درصد آزمون دانکن اختلاف معنی داری ندارند.



شکل ۵- تغییرات محتوای کلروژنیک‌اسید درکلون‌های ۱۰۰، ۲۷۸، ٤٥١ و DN گیاه چای در سه فصل رویشی بهار، تابستان و پاییز. میانگین هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک در سطح ۵ درصد آزمون دانکن اختلاف معنی داری ندارند.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.23.24.7]

سینامیک‌اسید (شامل کافئیک‌اسید، فرولیک‌اسید و پاراکوماریک‌اسید) با کوئینیک‌اسید (Quinic acid) گفته می شود که دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی است (Clifford *et al.*, 2003; Altunkaya, 2014). در محتوای کلروژنیک‌اسید کلون‌های ۱۰۰ و ۲۷۸ در سه برداشت مختلف، تفاوت چندانی مشاهده نشد، اما در برخی از برداشت‌های کلون‌های ٤٥١ و DN در فصول مختلف، تغییرات معنی‌داری مشاهده شد که نشان می‌دهد عوامل محیطی در این کلون‌ها تاثیرگذار بوده است. صیادی و همکاران (۱۳۹۳) بیان داشتند که در تغییرات محیطی، بر محتوای کلروژنیک اسید گیاه افزوده شده است. گزارش شده است که بیوسنتز این متابولیت ها تنها تحت تأثیر ژنتیک گیاه نیست بلکه با توجه به الگوهای محیطی نیز تغییر می کند (Aliabadi-Farahani *et al.*, 2009).

تغییرات محتوای کوئرستین: نتایج حاصل از ارزیابی میزان کوئرستین عصاره‌ی گیاه چای در شکل ٦ آمده است. محتوای کوئرستین کلون ۱۰۰ از برداشت اول تا برداشت سوم روند افزایشی نشان داد و بیشترین مقدار این ترکیب در کلون ۱۰۰، در فصل پاییز مشاهده شد، در حالی‌که کلون‌های ۲۷۸ و DN در سه برداشت مختلف، تفاوت معنی‌داری نداشتند. کلون ٤٥١ در برداشت بهاره بیشترین و در برداشت تابستانه کمترین میزان این ترکیب را داشت.

Cary و Wink (۱۹۹٤) که به مطالعه‌ی آلکالوئیدهای گیاه *Lupinus argeneteus* پرداختند، بیان نمودند که شرایط اکولوژیکی مثل فصل رشد طولانی‌تر، می‌تواند منجر به رشد سریعتر گیاه شود که به نوبه‌ی خود می‌تواند مقادیر بیشتری از منابع را برای تولید متابولیت‌های ثانویه‌ای مثل آلکالوئیدها گیاه اختصاص دهد.

کلون ٤٥١ در سه برداشت مختلف دارای مقادیر مختلفی از این ترکیب بود، به طوریکه در برداشت اول دارای بیشترین و در برداشت دوم دارای کمترین مقدار کوئرستین بود. گزارشی نشان داده است که مقدار این ترکیب در ماه‌های مختلف سال در گیاه ژینگوبیلوبا نیز تغییر می‌یابد، به طوریکه بیشترین میزان کوئرستین این گیاه در فصل تابستان (تیر ماه) می‌باشد (رضازاده و همکاران ۱۳۸۵).

محتوای پروتئین کل: تغییرات غلظت پروتئین کل در فصول مختلف برداشت در کلون‌های مورد مطالعه در شکل ۷ نشان داده شده است. ابتدا منحنی استاندارد جذب، بر اساس جذب های خوانده شده، برای نمونه‌های استاندارد رسم و توسط شیب خط منحنی و معادله‌ی حاصل از این نمودار، غلظت پروتئین کل نمونه‌ها محاسبه شد.

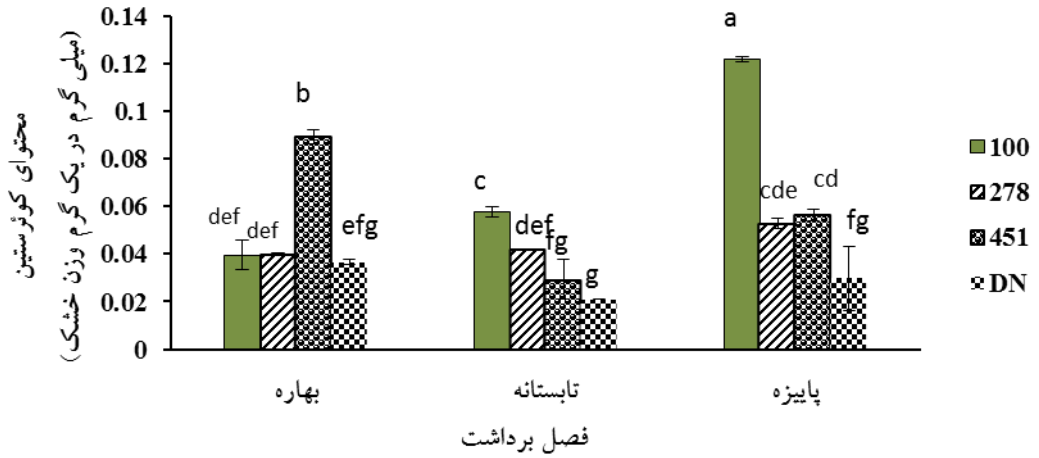
نتایج نشان داد که محتوای پروتئین کلون‌های ۱۰۰ و DN در سه برداشت مختلف، تفاوت معنی‌داری نداشتند. همچنین کلون ۲۷۸ در برداشت اول دارای کمترین و کلون ٤٥١ در برداشت دوم دارای بیشترین میزان پروتئین بود.

پروتئین از مهم‌ترین مواد گیاه چای می‌باشد، زیرا در فرآیند تولید چای سبز، پروتئین‌های آن تجزیه شده و آلدهیدها را می‌سازند که موجب ایجاد عطر و طعم چای می‌شوند. ولی همانطور که در مقدمه گفته شد، برعکس، در تولید چای سیاه، استفاده از برگ‌های چای که حاوی مقادیر بالاتری از پروتئین هستند، موجب کاهش رنگ و طعم می‌شود. در این پژوهش با توجه به شکل ۷ نشان داده شده است که محصول تابستانه‌ی کلون‌های ۲۷۸ و ٤٥١ و محصول پاییزه‌ی کلون ۲۷۸، دارای بیشترین محتوای پروتئین کل بودند. محتوای پروتئین کلون ۱۰۰ و DN در سه برداشت مختلف، تغییرات ناچیزی را نشان داد.

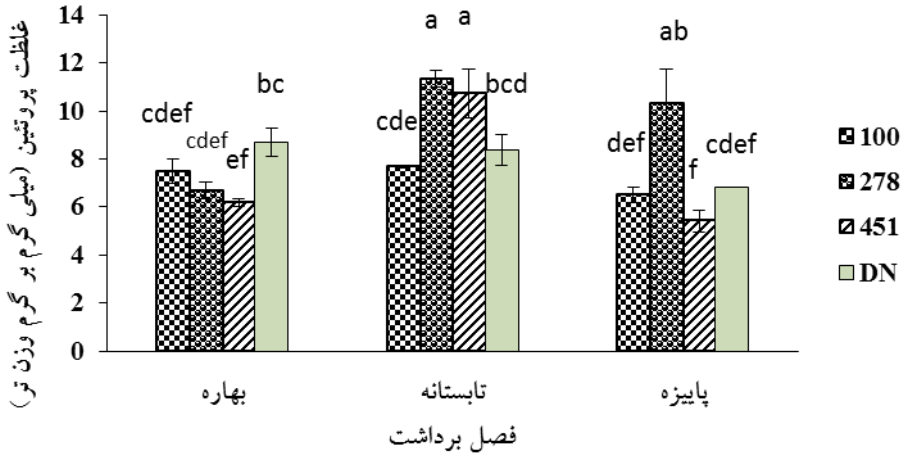
معزی (۱۳۸۸) اعلام کرد که محتوای پروتئین محصول بهاره، نسبت به برداشت تابستانه پایین است و یکی از علل کم‌رنگ بودن چای بهاره نسبت به تابستانه را محتوای پروتئینی پایین آن معرفی کرده است. احمد و همکاران (۲۰۱۱) که بررسی میزان تغییرات فصلی پروتئین گیاه *Mentha longifolia* پرداختند، مشاهده کردند که محتوای پروتئین این گیاه در فصول مختلف دارای مقادیر متفاوتی است و بیشترین مقدار پروتئین این گیاه را در برداشت پاییزه‌ی آن مشاهده نمودند. استفاده از شاخساره‌های چای با درصد پروتئین بالا، در تولید چای سبز باعث بهبود کیفیت رنگ و طعم می‌شود، این در حالی است که چای سیاه تولید شده از این نوع شاخساره‌ها از لحاظ کیفی به مراتب در سطح پایین‌تری قرار می‌گیرند. لذا، می

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.23.24.7]



شکل ٦- تغییرات محتوای کوئرستین درکلون‌های ۱۰۰، ۲۷۸، ٤٥١ و DN گیاه چای در سه فصل رویشی بهار، تابستان و پاییز. میانگین هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک در سطح ٥ درصد آزمون دانکن اختلاف معنی داری ندارند.



شکل ۷- تغییرات محتوای پروتئین کل درکلون‌های ۱۰۰، ۲۷۸، ٤٥١ و DN گیاه چای در سه فصل رویشی بهار، تابستان و پاییز. میانگین هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک در سطح ٥ درصد آزمون دانکن اختلاف معنی داری ندارند.

توان نتیجه گرفت که محصول برداشت دوم کلون‌های ۲۷۸ و ٤٥١ و همچنین برداشت پاییزه‌ی کلون ۲۷۸ که از سطوح پروتئینی نسبتاً بالایی برخوردارند، می‌توانند برای تولید چای سبز، بیشتر مورد توجه واقع شوند و کلون‌های با سطوح پروتئین کمتر نیز جهت تولید چای سیاه مورد استفاده قرار گیرند.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که کلون‌های ۱۰۰، ۲۷۸، ٤٥١ و DN دارای مقادیر متفاوتی از ترکیبات فنلی و محتوی پروتئین در سه برداشت مختلف در شرایط باغ بودند و احتمالا عوامل محیطی غیر قابل کنترل در باغ نظیر تفاوت دمای روز و شب در ماه‌های مختلف برداشت، شدت تابش خورشید و باران‌های نامنظم در منطقه‌ی برداشت شاخساره و تغییرات فصول مختلف (بهار، پاییز، زمستان) بر محتوای این ترکیبات تاثیرگذار بوده است که شاهد چنین تغییراتی در ترکیبات فنلی و محتوی پروتئین بوده ایم. با توجه به این اطلاعات می‌توان نتیجه گرفت که کیفیت و ارزش غذایی چای، از تغییرات آب‌و هوایی در طول سال به شدت تاثیر می‌پذیرد.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.23.24.7]

منابع:

رضازاده، ش. یزدانی، د. عطایی، پ. پیرعلی همدانی، م. و تقی زادفرید، ر.(۱۳۸۵) بررسی تغییرات فصلی فلاونوئیدهای گیاه *Ginkgo biloba L)* کاشته شده در ایران. فصلنامه ی گیاهان دارویی، سال ششم، شماره ی بیست و یکم، ۱۱-۱۹.

غلامی، م. (۱۳۹۱) گزارش سالانه ی پروژه های تحقیقاتی چای. مرکز تحقیقات چای کشور. صفحه ی ۱۱۰.

معزی، غ. (۱۳۸۸) بیوشیمی و تکنولوژی فرآوری چای از آغاز تاکنون. انتشارات علمی گیاهان. ۴۹ – ۱۰۹.

نصیری راد، ا. احمدی، ج. اصغری، ب و حسینی، م. (۱۳۹۳) بررسی اثر تنش‌های خشکی و شوری بر میزان ترکیبات فنلی گیاه دارویی *Thymus vulgaris L*

Adnan, M., Ahmad, A., Khalid, N., Hayat, I., & Ahmed, I. (2013) Chemical composition and sensory evaluation of tea (*Camellia sinensis*) commercialized in Pakistan. Pakistan Journal of Botany, 45, 901-909.

Aliabadi-Farahani, H., Valadabadi, S.A., Daneshian, J., and Khalvati, M.A. (2009) Evaluation changing of essential oil of balm (*Melissa officinalis* L.) under water deficit stress conditions. Journal of Medicinal Plant Research, 3: 329-333.

From Turkish Tea Leaf (*Camellia Sinensis L.*). International Journal of Food Properties Vol 17, No 7.

Alexandr Ya, Y. Nemzer,B., Combet, E. and Yashin,Y. (2015) Determination of the Chemical Composition of Tea by Chromatographic Methods: A Review. Journal of Food Research; Vol. 4, No. 3. 56-88

Ahmad, I. Sajid, M. Ahmad, A. Ashraf, M. Hosseyn, M. and Ashraf, M.Y. (2011) Seasonal variation som medicinal and biochemical ingredients in *Menthal longifolia* (L.) huds. Pakistan journal of Botanny. 43: 69-77**.**

Bakhshi, D. and Arakawa, O. (2006) Induction of phenolic compounds biosynthesis with light irradiation in the flesh of red and yellow apples. Journal of Applied Horticulture 8 2.

Benzie, I.F.F. Strain J.J. (1999) The ferric reducing ability of plasma as a power: The FRAP assay. Analytical Bio Chemistry 239: 70-76.

Boerjan, W. Ralph, J. and Baucher, M. (2003) Ligninbiosynthesis. Annual Review of Plant Biology; 54: 519–46.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing of protein–day binding. Anal. Biochem 72, 248–54.

Cary, D.B. and Wink, M. (1994) Elevation variation of quinlizidine alkaloid contents in a lupine (*Lupinus argenteus*) of the Rocky Mountains. Journal Chemistry Ecological 20: 849 - 57.

Clifford, M.N. Johnston, K.L. Knigh, S. Kuhnert, N. (2003) Hierarchical scheme for LC-MS^n identification of chlorogenic acids. Journal of Agriculture and Food chemistry; 51 (10): 2900–2911.

Ercisli, S. Orham, E. Ozdemir, O. Sengul, M. and Gungor, N. (2008) Seasonal variation of votal phenolic, antioxidant activity, Plant Nutritional Elements, and Fatty Acids in Tea Leaves (*Camellia sinensis* var. *sinensis* clone Derepazari 7) Grown in Turkey. Pharmaceutical Biology; 46: 683-687.

Erturk, Y. Ercisli, S. Sengul, M. Eser, Z. Haznedar, A. and Turan, M. (2010) Seasonal variation of total phenolic, Antioxidant activity and Minerals in fresh tea shoots. Journal of Pharmaceutical Sciences; 23: 69-74.

Halliwell, B. (1995) How to characterise an antioxidant: An update. Biochemical Society Symposium 61: 73–101.

Kontogiorgis C. and Hadjipavlou-Litina D. (2005) J. Med. Chem; 48: 6400.

Kweon, M.H. Hwang, H.J. and Sung, H.C. (2001). Identification and Antioxidant Activity of Novel Chlorogenic Acid Derivatives from Bamboo (*Phyllostachys edulis*). Journal of Agriculture and Food Chemistry; 49 (20): 4646–46552.

Lee, J.E. Lee, B.J. Chung, J.O. Hwang, J.A. Lee, S.J. Lee, C.H. and Hong, Y.S. (2010) Geographical and Climatic Dependencies of Green Tea (*Camellia sinensis*) Metabolites: A 1H NMR-Based Metabolomics Study. Journal of Agricultural and Food Chemistry 58: 10582–10589.

Leung, A.Y. and Foster, S. (1996) Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs, and cosmetics. (New York: John Wiley & Sons, Inc.). 489–491 (2nd ed.).

Miura, Y. Chiba, T. and Tomita. R.(2001) Tea catechins prevent the development of atherosclerosis inapoprotein E-deficient mice. Journal of Nutrition; 131:27-32.

Stacewicz-Sapuntzakis, M. Bowen, P.E. Hussain, E.A. Damayanti-Wood, B.I. and Farnsworth, N.R. (2001). Chemical composition and potential health effects of prunes: a functional food? *Critical* reviews in food science and nutrition; 41: 251–86.

Tijburg, L. Wiseman, SA. Meijer, G. W. and Weststrate, J. A. (1997) Atherosclerosis Tea flavonoids and cardiovascular diseases: *A review*; 135: 37-48.

Victore, C. Haag – Berrurier, M. Lobstein-Guth, A. Balz, J.P. and Anton, R. (1988) Isolation of flavonol glycosides from Ginkgo biloba leaves. Journal Planta Medica 54: 245-7.

Wang, L.Y. Wei, K. Jiang, Y.W. Cheng, H. Zhou, J. He, W. and Zhang, C. C. (2011) Seasonal climate effects on flavanols and purin alkaloids of tea (*Camellia sinensis).* European Food Research and Technology 125: 44-48.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.23.24.7]

Wei, K. Wang, L. Y. Zhou, J. He, W. Cheng, H. Jiang, Y.W. and Zeng, J. M. (2011) Catechin contents in tea (*Camellia sinensis*) as affected by cultivar and environment and their relation to chlorophyll contents. Food Chemistry 125: 44-48.

Yamauchi, Y. Nakamura, A. Kohno, I. Hatanaka, K. Kitai, M. and Tanimoto, T. (2008) Quasi-flow injection analysis for rapid determination of caffeine in tea using the sample pre-treatment method with a cartridge column filled with polyvinylpolypyrrolidone. Journal of Chromatography 1177: 190–194.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.23.24.7]