مجله پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۲۰/۳ شماره ۲/ سال ۱۳۸۹

شناسایی ترکیبات پلی فنلی و فلاونوئیدی میوه سیب ارقام ’زنوز‘ و ’گالا‘ با استفاده از کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا

لمیا وجودی مهربانی[۱*]، محمدرضا دادپور[۲]، عباس دل آذر[۳]، علی موافقی[۴] و جعفر حاجیلو[۲]

تاریخ دریافت: ۸۹/۱/۳۰ تاریخ پذیرش: ۸۹/۳/۱۸

۱- دانشجوی دکتری گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز
۲- استادیار گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز
۳- استاد گروه فارماکوگنوزی و مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشکده داروسازی
۴- دانشیار گروه علوم گیاهی دانشکده علوم پایه دانشگاه تبریز
* مسئول مکاتبه: E-mail: vojodilamia@gmail.com

چکیده

تجزیه کمی و کیفی ترکیبات پلی فنلی میوه سیب ارقام ’گالا‘ و ’زنوز‘ به وسیله HPLC تجزیه‌ای در زمان برداشت تجارتی میوه‌ها (شهریور ماه ۱۳۸۸) انجام شد. نتایج حاصل نشان دهنده وجود تفاوتهای کمی در میزان پلی فنلهای اندازه گیری شده در هر دو رقم سیب بود. در مجموع، سیب ’گالا‘ دارای مقادیر بیشتری از میزان ترکیبات پلی فنلی در مقایسه با ’زنوز‘ بود. بیشترین میزان ترکیبات پلی فنلی موجود در پوست سیب ’گالا‘ کوئرستین-۳-دی-گالاکتوزید (۴۵/۷۴٪)، سیانیدین-۳-گالاکتوزید (۴۲/۲۶٪) و در بذر میوه فلوریدزین دی هیدرات (۸۶/۲۵٪) بود. در پوست سیب ’زنوز‘ عمده ترین فلاونوئید اندازه گیری شده سیانیدین-۳-گالاکتوزید (۶۵/۳۸٪)، (-) اپی کتچین (۲۶/۱۲٪) و در بذر میوه فلوریدزین دی هیدرات (۸۲/۵۷٪) بود. همچنین پوست و گوشت میوه ’زنوز‘ حاوی اسیدهای فنلی و ترکیبات فلاوانولی بیشتری نسبت به پوست و گوشت میوه ’گالا‘ بودند. اسید کلروژنیک عمده ترین اسید فنلی مشاهده شده در پوست (۱/۰۱ میلی گرم/ گرم وزن خشک میوه) و (-) اپی کتچین (۰/۴۶ میلی گرم/ گرم وزن خشک میوه) عمده ترین فلاونوئید اندازه گیری شده در گوشت میوه ’زنوز‘ بود. با اینکه روتین هیدرات ۵/۸٪ از کل فلاونوئیدهای شناسایی شده در گوشت میوه ’زنوز‘ را شامل بود، اما این ترکیب در گوشت میوه ’گالا‘ دیده نشد. میزان اسید کافئیک در گوشت میوه ’زنوز‘ (۰/۲۵میلی گرم/ گرم وزن خشک میوه) بیشتر از گوشت میوه ’گالا‘ (۰/۰۷۸ میلی گرم/ گرم وزن خشک میوه) بود. در نهایت می‌توان گفت که با در نظر گرفتن مجموع ترکیبات پلی فنلی و فلاونوئیدی در بخشهای مختلف میوه، سیب ’زنوز‘ ویژگیهای کیفی قابل مقایسه‌ای با سیب رقم ’گالا‘ دارد.

واژه‌های کلیدی: آنتوسیانین، ترکیبات پلی فنلی، سیب، فلاونوئید، کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا

Identification of Polyphenolic and Flavonoid Compounds in 'Zonouz' and 'Gala' Apple Fruits by Means of High-Performance Liquid Chromatography

L Vojodi Mehrabani[1], MR Dadpour[2], A Delazar[3], A Movafeghi[4] and J Hadjilou[2]

Received: 19 April, 2010 Accepted: 8 June, 2010

[1]P.h.D student, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran
[2]Assistant Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran
[3]Professor, School of Pharmacy, Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Iran
[4]Associate Professor, Department of Plant Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Iran
*Corresponding author**:** Email: vojodilamia@gmail.com

Abstract

Qualitative and quantitative analyses of 'Zonouz' and 'Gala' apples polyphenolic compounds were carried out by HPLC during the commercial harvest time. The results showed qualitative differences between the two apple cultivars regarding polyphenolic compounds. In general, 'Gala' had higher polyphenolic compounds compared to 'Zonouz'. The highest polyphenolics content was recorded in the Gala's peel and seed. The predominant flavonoids in the Gala's peel were quercetin-3-D-galactoside and cyanidin-3-galactoside with 45.7% and 42.3% of the total identified components, respectively. Phloridzin dihydrate (86.3% of the total flavonoid compounds) contained the principal flavonoid compound in the Gala's seed. Cyanidin-3-galactoside and (-)-epicatechin were the main flavonoid compounds in the Zonouz's peel with 65.4 and 26.1% of the total flavonoids. Phloridzin dihydrate (82.6% of the total flavonoids) was the major flavonoid compound in the Zonouz's seeds. The Zonouz's Peel and pulp had higher flavonoid and phenolic acids content compared to Gala. Chlorogenic acid (1mg/g DW) and (-)-epicatechin (0.5mg/g DW) were the highest phenolic acid and flavonoid components in the Zonouz's peel and pulp, respectively. Rutin hydrate was another major flavonoid constituent of Zonouz's pulp with 5.8% of the total identified flavonoids. This compound was absent in the Gala's pulp. Caffeic acid content in the Zonouz's pulp (0.3 mg/g DW) was considerably higher than Gala (0.08 mg/g DW).

Key words: Apple, HPLC, Anthocyanin, Flavonoid, Polyphenolic compounds

مقدمه

جذابیت و خوش‌خوراکی میوه سیب برای مصرف کنندگان به خاطر ویژگیهای بصری (رنگ و اندازه) و ارگانولپتیک (سفتی، طعم و مزه) میوه تعیین می‌گردد. ترکیبات پلی فنلی و فلاونوئیدی در تشکیل رنگ میوه نقش اساسی دارند (اود و همکاران ۲۰۰۰). ترکیبات یاد شده همچنین نقش مهمی در درمان بیماری‌های حاد قلبی و انواع سرطان دارند این ترکیبات از اکسیداسیون چربی‌ها، پروتئین‌ها واسیدهای نوکلئیک جلوگیری می‌کنند (اود و همکاران b، ۲۰۰۱ و پاویا و همکاران، ۲۰۰۳). ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی موجود در میوه سیب در گروه آنتوسیانین (سیانیدین-۳- گالاکتوزید) ، دی‌هیدرو چالکون‌ها (فلوریدزین دی هیدرات) ، پروسیانیدین ها، کوئرستین گلیکوزیدها، روتین (فلاونول‌ها)، کتچین، اپی‌کتچین و پلی-مرهای آن (فلاوانول) و هیدروکسی سینامیک و بنزوئیک اسیدها (اسیدهای فنلی) طبقه‌بندی می‌گردند (اود و

همکاران b، ۲۰۰۱؛ و شیبر و همکاران،۲۰۰۱؛ اود و جگر، ۲۰۰۲ و لی و همکاران، ۲۰۰۴). این گروه از ترکیبات، نقش مهمی در واکنش گیاه به عوامل محیطی زنده (رادیکالهای آزاد اکسیژن، آفات و بیماریها) و غیرزنده (مانند آلودگی هوا، یون‌های فلزات سنگین و تابش UV) دارند (اود و همکاران، ۲۰۰۰؛ اود وهمکاران، a ۲۰۰۱؛ پتکوسک و همکاران، ۲۰۰۳؛ دل ریو و همکاران، ۲۰۰۴ و بخشی و اراکاوا، ۲۰۰۶).

مطالعات HPLC انجام شده روی ترکیبات فنلی گوشت و پوست سیب توسط اسکارپا و گونزالز (۱۹۹۸) و خانی‌زاده و همکاران (۲۰۰۷) نشان دهنده وجود تفاوتهایی در میزان تجمع ترکیبات پلی فنلی در بخشهای مختلف میوه بود. نتایج حاصل از آزمایشات انجام شده نشان دادند که بیشترین تجمع ترکیبات فنلی (روتین، فلاونول گلیکوزید، فلاوانول) در پوست و اسید کلروژنیک در گوشت سیب می باشد.

سیب رقم’گالا‘ یکی از مهمترین ارقام تجارتی سیب در جهان است که کشت آن در ایران به دلیل ویژگیهای کیفی و بازار پسندی آن رو به گسترش می‌باشد. از سوی دیگر، سیب رقم ’زنوز‘ یکی از ارقام مهم محلی و بازار پسند استان آذربایجان شرقی با ویژگی‌های ارگانولپتیک بالا می‌باشد. با توجه به موارد ذکر شده و با دقت نظر در این مسئله که در مورد ترکیبات پلی فنلی و آنتوسیانینی ارقام ’گالا‘ و ’زنوز‘ در ایران هیچ اطلاعاتی در دسترس نمی‌باشد، فلذا مطالعه ترکیبات عنوان شده به عنوان یکی از مهمترین مولفه های کیفی میوه سیب برای اولین بار در ایران مد نظر مطالعه حاضر خواهد بود.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در آزمایشگاه فارماکوگنوزی مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز و گروه علوم باغبانی دانشگاه تبریز در سال ۱۳۸۸ انجام شد.

مواد گیاهی: میوه سیب ارقام ’زنوز‘ و’گالا‘ به ترتیب در مرحله برداشت تجارتی میوه در اواخرشهریور ماه ۱۳۸۸ تهیه شدند. میوه سیب’ گالا‘ از درختان پیوندی روی پایه مالینگ مرتون ۱۰۶ و میوه سیب زنوز از درختان بذری سیب زنوز تهیه شدند. در هر دوی باغات نمونه برداری به صورت تصادفی از چهار جهت درخت انجام شد. نمونه‌ها بعد از جمع‌آوری بلافاصله به آزمایشگاه منتقل و به منظور حذف گرد وغبار و بقایای آفات با آب شسته شدند و سپس به وسیله حوله تمیز خشک گردیدند. پوست میوه‌ها با چاقوی تیز به صورت خیلی نازک جدا شد. گوشت میوه نیز بعد از جدا کردن بذور به صورت ورقه‌های نازک بریده شد. در مرحله بعد گوشت، پوست و بذر میوه‌ها به صورت جداگانه در آزمایشگاه در معرض هوا و در دمای معمول آزمایشگاه خشک شده وسپس جداگانه آسیاب گردیدند.

استانداردها و حلالهای مورد استفاده: روتین هیدرات، فلوریدزین دی هیدرات، اسید کلروژنیک، کوئرستین-۳-دی-گالاکتوزید، کوئرستین-۳- بتا-دی-گلوکوزید، اسید پارا-کوماریک ، -(-) اپی کتچین، سیانیدین-۳- گالاکتوزید و اسید گالیک از شرکت Sigma خریداری شدند. اسید کافئیک، اسید فرولیک، ترانس-۲- هیدروکسی سینامیک اسید و (+) کتچین از شرکت Sigma Aldrich تهیه شدند. ستونیتریل، ان-هگزان و فرمیک اسید از شرکت Merck ومتانول از شرکت Caledon خریداری شد.

استخراج ترکیبات پلی فنلی و فلاونوئیدی: به منظور استخراج ترکیبات پلی فنلی و فلاونوئیدی روی یک گرم از پوست، گوشت و بذر میوه خشک شده ده میلی لیتر حلال هگزان افزوده و به مدت بیست دقیقه در حمام التراسند (Power Sonic 505 Korea) در دمای آزمایشگاه عصاره گیری شد (کیم و همکاران ۲۰۰۶). سپس عصاره هگزانی به وسیله تبخیر در خلا (Heidolph Germany)

خشک شد. روی عصاره خشک شده مرحله قبلی ۱۰۰ میلی‌لیتر مخلوط متانول: آب (۱:۱) افزوده شد (لاتا و همکاران ۲۰۰۹). سپس به مدت بیست دقیقه در حمام التراسند قرار گرفت. عصاره‌های حاصل صاف شده، سپس به مدت ده دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور سانتریفوژ (USA Beckman j-25) شدند. ۲۰ میکرولیتر از عصاره حاصل برای شناسایی ترکیبات فنلی به وسیلهHPLC تجزیه‌ای مورد استفاده قرار گرفت.

کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC): شناسایی ترکیبات فنلی به وسیله روش لاتا و همکاران (۲۰۰۹) انجام شد. روش مورد استفاده امکان شناسایی ترکیبات فنلی را در زمان کوتاه (۳۰ دقیقه) فراهم می‌آورد. جداسازی به وسیله سیستم HPLC تجزیه‌ای (Cecil, English) مجهز به پمپ دوگانه (Cecil, 4100)، Degasser (Cecil) و آشکارکننده UV (Cecil, 4201 UV/Vis) انجام شد. جداسازی ترکیبات فنلی با استفاده از ستون فاز معکوس C۱۸ (به طول ۲۵۰ میلی‌متر و با قطر داخلی ۴/۵ میلی‌متر با اندازه ذرات ۵ میکرومتر) که به وسیله ستون محافظ C۱۸ (به طول ۵ میلی‌متر با قطر داخلی ۴ میلی‌متر با اندازه ذرات ۵ میکرومتر) محافظت می‌شد، انجام گرفت. شناسایی اجزای پلی فنلی در طول موج ۲۸۰ نانومتر انجام شد. با توجه به اینکه پیکهای مربوط به بعضی از استانداردها از قبیل فلاونولها و کلروژنیک اسید، فلوردزین دی هیدرات و سیانیدین-۳- گالاکتوزید با اختلاف زمانی اندکی از ستون خارج می‌شدند و همپوشانی طیفها وجود داشت، لذا برای رفع مشکل از سه سیستم متحرک متفاوت (با سرعت جریان ۱میلی‌لیتر در دقیقه) برای جداسازی ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی استفاده شد. برای شناسایی فلاوانول‌ها و اسیدهای فنلی (به غیر از کلروژنیک اسید) از سیستم حلال حاوی ۲٪ اسید استیک در آب (پمپ A) و متانول (پمپ B) استفاده شد. شیب غلظت خطی به کاربرده شده برای حلال متانول حاوی اسید استیک از B ۱۰٪ شروع شد و سپس در طی ۲۰ دقیقه به ۱۰۰ ٪ رسید. در فاصله زمانی ۲۰ تا ۲۵ دقیقه در این حالت باقی ماند. سپس در طی ۲ دقیقه دوباره به حالت اول خود یعنی B ۱۰٪ رسید، وتا زمان ۳۰ دقیقه در این حالت باقی ماند.

از ۰/۱٪ اسیدفرمیک در آب (پمپ A) و متانول (پمپ B) برای شناسایی کلروژنیک اسید، سیانیدین-۳-گالاکتوزید و فلوریدزین دی‌هیدرات استفاده شد. شیب غلظت خطی به کاربرده شده برای حلالها همانند شیب خطی به کاربرده شده برای شناسایی فلاوانول‌ها و اسیدهای فنلی (به غیر از اسید کلروژنیک) بود. برای جداسازی فلاونول‌ها از سیستم جریان حلال ۰/۲۵میلی مول بافر فسفات (pH=2.5) برای پمپ A و استونیتریل خالص برای پمپ B استفاده شد. از شیب غلظت خطی (۱۰-۳۰) در مدت ۳۰ دقیقه با همان فواصل زمانی ذکر شده در مورد فلاوانول‌ها و اسیدهای فنلی برای شناسایی ترکیبات استفاده شد.

شناسایی و کمیت‌یابی ترکیبات پلی فنلی و فلاونوئیدی

برای شناسایی ترکیبات پلی فنلی و فلاونوئیدی از مقایسه زمان بازداری (Rt) پیکهای مربوط به ترکیبات استاندارد با ترکیبات حاصل از عصاره‌ها (پوست، گوشت و بذر) استفاده شد. برای به دست آوردن زمان بازداری ترکیبات پلی فنلی و فلاونوئیدی، ترکیبات استاندارد با غلظت ۰/۲ میلی گرم در یک میلی‌لیتر متانول تهیه گردیدند. سپس برای شناسایی ترکیبات پلی فنلی عصاره‌ها و حصول به زمان بازداری استانداردها، ۲۰ میکرولیتر از عصاره و استانداردها به طور جداگانه به دستگاه HPLC تجزیه‌ای تزریق شدند. تعیین کمیت ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی با استفاده از روش اندازه‌گیری سطح زیر منحنی و مقایسه با استانداردهای مربوطه انجام گرفت. لازم به ذکر است که تزریق نمونه‌ها دو بار انجام گرفته و مقادیر ارائه شده میانگین دو تزریق می‌باشد.

تجزیه آماری

در این آزمایش، تجزیه واریانس داده‌های که از دو تکرار (دو بار تزریق) بدست آمده بودند، از طریق طرح کاملا تصادفی انجام گردید. مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون

چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱٪ صورت گرفت. برای این منظور از بسته نرم‌افزاری SPSS استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج نشان دهنده وجود تفاوتهای کمی (P<1%) در ترکیبات پلی فنلی دربخشهای مختلف میوه سیب ارقام ’گالا‘ و ’زنوز‘ بود (شکل ۱). اختلاف مشاهده شده در میزان ترکیبات پلی فنلی غالبا به دلیل وجود مقادیر بالای فلاونولها مخصوصا کوئرستین-۳-دی- گالاکتوزید در پوست سیب ’گالا‘ (جدول ۱) و اسید کلروژنیک در پوست سیب ’زنوز‘ (جدول۱) بود که با یافته‌های اسکارپا و همکاران (۱۹۹۸)، مارکوسکی و پلوچارسکی (۲۰۰۶) و لاتا و همکاران (۲۰۰۹) مطابقت دارد. شیبر و همکاران (۲۰۰۱) و تاکوس و همکاران (۲۰۰۶) بیان نمودند که تفاوت در میزان ترکیبات پلی فنلی و فلاونوئیدی بین واریته‌های مختلف سیب در آزمایشات مختلف به دلیل تفاوت در مواد ژنتیکی مورد استفاده، شرایط محیطی، روشهای خشک کردن نمونه ها و روشهای مورد استفاده در جداسازی ترکیبات بود. به دلیل تنوع زیاد ترکیبات پلی فنلی و فلاونوئیدی سیب، جداسازی و کمیت‌یابی این ترکیبات با چالشهای زیادی روبروست. در آزمایش حاضر با توجه به ثابت بودن شرایط آزمایش از فاز های متحرک آب متانول (حاوی ۲٪ اسید استیک برای شناسایی فلاوانول‌ها و اسیدهای فنلی به غیر از اسید کلروژنیک و ۰/۱٪ اسید فورمیک در آب و متانول برای شناسایی اسید کلروژنیک

سیانیدین -۳- گالاکتوزید و فلوردزین دی هیدرات) و بافرفسفات و استونیتریل (برای شناسایی فلاونول‌ها) برای جداسازی کامل ترکیبات مورد نظر در پوست و گوشت میوه (شکل ۲) و از فاز متحرک آب و متانول حاوی ۲٪ اسید استیک برای جداسازی ترکیبات پلی فنلی موجود در بذر استفاده شد (شکل ۳). عمده‌ترین مشکل مشاهده شده در جداسازی ترکیبات پلی فنلی و فلاونوئیدی میوه سیب ارقام مورد مطالعه خروج همزمان فلاونولها و هم چنین شویش همزمان کلروژنیک اسید، فلوریدزین دی هیدرات و سیانیدین-۳- گالاکتوزید از ستون بود. همانگونه که ذکر گردید استفاده از سیستم‌های حلال متفاوت ذکر شده در بالا به همراه دمای ثابت مشکل فوق را مرتفع نمود. مارکوسکی و پلوچارسکی (۲۰۰۶) بیان نمودند که برای رفع مشکل شویش همزمان کوئرستین گلوکوزیدها باید شناسایی نمونه در دمای ثابت انجام گیرد. مطالعات HPLC انجام شده در سیب ’کریپس رد‘ نشان داد که به دلیل تنوع در ترکیبات فلاونولی سیب، جداسازی کامل آنها مشکل می باشد (تاکوس و همکاران ۲۰۰۶). میزان فلاوانولها در پوست (۲۶/۱۲٪)، گوشت (۸۹/۳٪) و بذر (۲۷/۴٪) ’زنوز‘بیشتر از پوست (۱۱/۳۹٪)، گوشت (۷۹/۴۱٪) و بذر (۱۳/۷۴ ٪) ’گالا‘ بود (شکل ۴). نتایج حاصل از آزمایش حاضر نشان داد که میزان کتچین و اپی کتچین (فلاوانولها) درپوست هر دو رقم سیب مورد مطالعه به ترتیب دو و سه برابر غلظت آنها در گوشت میوه بود. که با نتایج حاصل از آزمایشات تاکوس و همکاران(۲۰۰۶) همخوانی دارد. نتایج آزمایش حاضر نشان داد که تفاوت عمده مشاهده شده در محتوای کل فنلهای اندازه گرفته شده در دو رقم به دلیل تفاوت در غلظت فلاونولها مخصوصا مقادیر بالای کوئرستین-۳-دی-گالاکتوزید در پوست سیب ’گالا‘ بود (جدول۱).

کوئرستین-۳-دی-گالاکتوزید در پوست سیب ’گالا‘ ۴۵/۷۴٪ و’زنوز‘ ۱/۴٪ از کل ترکیبات فنلی را شامل شد، در حالیکه ترکیب فوق در گوشت و بذر ارقام مورد مطالعه مشاهده نگردید (جدول ۱). نتایج فوق با یافته‌های ساو و همکاران (۲۰۰۳) مطابقت دارد. گرچه کوئرستین-۳- بتا- دی-گلیکوزید درپوست و گوشت ’زنوز‘ وگوشت ’گالا‘ کمیت‌یابی شد، ولی این ترکیب در پوست و بذر ’گالا‘مشاهده نشد. تاکوس و همکاران (۲۰۰۶) بیان نمودند که در سیب ’کریپس رد‘ کوئرستین-۳-دی-گالاکتوزید فراوانترین فلاونول موجود در پوست میوه بود. در حالیکه سایر فلاونولها مقادیر کمتری را به خود اختصاص می‌دادند. در مطالعات HPLC انجام شده توسط اود و همکاران (۲۰۰۱a) در ارقام سیب ’جوناگولد‘ و ’الستار‘

گاها تجمعی از کوئرستین- ۳- گلیکوزید در پوست میوه سیب نیز مشاهده گردید.

میزان سیانیدین-۳-گالاکتوزید (آنتوسیانین) در پوست و گوشت سیب 'گالا' اندکی بیشتر از سیب 'زنوز' بود. (جدول ۱). بذر هر دو رقم فاقد آنتوسیانین بود (جدول ۱). نتایج حاصل از این آزمایش با نتایج حاصل از مطالعات HPLC انجام شده توسط تاکوس و همکاران (۲۰۰۶) در سیب 'کریپس رد'، اود و همکاران (۲۰۰۱a) در سیب 'جوناگولد' و 'الستار' و بخشی و اراکاوا (۲۰۰۶) در سیب 'جاناتان' مطابقت دارد.

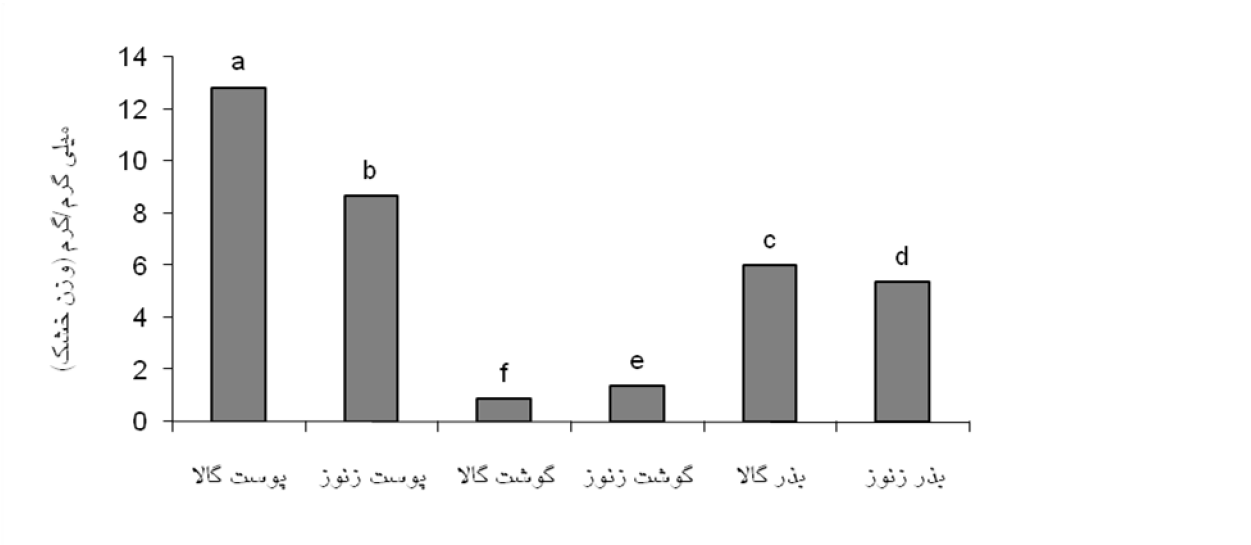
چنین به نظر می رسد که یکی از دلایل عمده وجود مقادیر بالای کوئرستین-۳- گیلکوزید در پوست سیب 'گالا' نسبت به سیب 'زنوز' در ارتباط با پتانسیل بالای این رقم در بیوسنتز ترکیبات فوق، یا اختلاف در شرایط آب هوایی منطقه پرورش دو رقم و یا نوع پایه استفاده شده برای درختان باشد. باتوجه به داده‌های هواشناسی (داده‌ها نشان داده نشده) مشخص شده است که از اواسط مرداد ماه به بعد در منطقه بستان آباد متوسط دمایی شبانه ۱۸ درجه سانتی گراد و دمای روزانه ۳۰-۲۴ درجه سانتی گراد بود که محدوده دمایی مناسبی برای بیوسنتز کوئرستین-۳- گیلکوزید و آنتوسیانین می‌باشد. نتایج حاصل از این آزمایش با نتایج حاصل از آزمایشات ری (۱۹۹۹) و ری و لنکستر (۲۰۰۱) در خصوص اثر اختلاف دمایی در بیوسنتز آنتوسیانین‌ها و کوئرستین گلیکوزیدها مطابقت دارد. از آنجائیکه بیوسنتز آنتوسیانین و کوئرستین گلیکوزیدها وابسته به نور است لذا چنین به نظر می رسد که در صورت استفاده از پایه مناسب، فرم دهی و هرس منظم درختان سیب 'زنوز' بتوان میزان بیوسنتز ترکیبات فوق را در سیب 'زنوز' بهبود بخشید. اود و همکاران(۲۰۰۱a) بیان نمودند که در ارقام سیب 'جوناگولد' و 'الستار' بخشهای در معرض نور میوه دارای مقدار زیادی سیانیدین -۳- گالاکتوزید و کوئرستین- ۳- گلیکوزید، نسبت به میوه‌های رشد کرده در سایه بودند.

جدول۱- مقادیر ترکیبات پلی فنلی اندازه گرفته شده توسط HPLC در بخشهای مختلف میوه سیب ارقام 'زنوز' و 'گالا' بر حسب میلی گرم/ گرم وزن خشک

		اسیدهای فنلی								فلاونوئیدها							
										آنتوسیانین	دی هیدرو چالکون	فلاونول			فلاوانول		
		اسید گالیک	ترانس-۲-هیدروکسی سینامیک اسید	اسید فرولیک	اسید کافئیک	اسید پارا-کوماریک	کلروژنیک اسید	سیانیدین-۳-گالاکتوزید	فلوریدزین دی هیدرات	روتین هیدرات	کوئرستین-۳-دی-گالاکتوزید	کوئرستین-۳-بتا-دی-گلیکوزید	(-) اپی کتچین	(+) کتچین
'گالا'	پوست	۰,۰۰۳c	۰,۰۹a	۰,۰۷b	۰,۷۷a	۰,۰۰۴d	۰,۲۲d	۴,۹۷a	۰,۰۰۶d	۰,۰۷b	۵,۳a	۰	۰,۹۶b	۰,۳۸b
	گوشت	۰,۰۰۰۹d	۰,۰۳۴c	۰,۰۲d	۰,۰۷d	۰,۰۰۴d	۰,۰۶f	۰,۱۲c	۰	۰	۰	۰,۰۱۲c	۰,۳۵f	۰,۱۹d
	بذر	۰	۰	۰,۰۴c	۰	۰,۰۱۶b	۰,۹۴b	۰	۴,۳۳a	۰	۰	۰	۰,۶۹d	۰

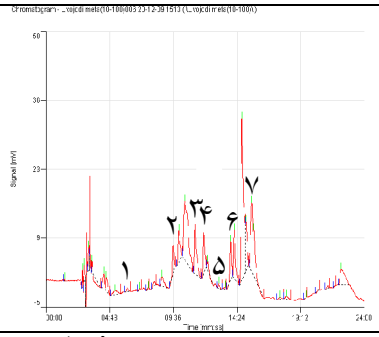
’زنوز‘	پوست	۰,۰۰۵b	۰,۰۰۷d	۰,۱۵a	۰,۱۷c	۰,۰۱۶b	۱,۰۱a	۴,۷۸b	۰,۲۵c	۰,۱۲a	۰,۱۳b	۰,۱۲a	۱,۳a	۰,۶۱a
	گوشت	۰,۰۰۰۶e	۰,۰۴b	۰,۰۷b	۰,۲۵b	۰,۰۶۴a	۰,۰۹e	۰,۰۱۲d	۰	۰,۰۴c	۰	۰,۰۳۰b	۰,۴۶e	۰,۳۱c
	بذر	۰,۰۰۶a	۰	۰,۰۴c	۰,۰۳e	۰,۰۱۴۶c	۰,۶۶c	۰	۳,۷۹b	۰	۰	۰	۰,۷۷c	۰,۰۳۶e

حروف موجود در کنار اعداد دهنده اختلاف معنی دار بین بخشهای مختلف میوه برای هر ترکیب در سطح احتمال ۱٪ بر مبنای آزمون دانکن می باشد



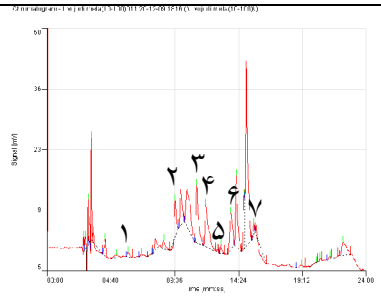
شکل ۱- مقدار ترکیبات پلی فنلی کل در بخشهای مختلف میوه سیب ارقام ’زنوز‘ و ’گالا‘

حروف موجود در ستونها نشان دهنده اختلاف معنی دار بین بخشهای مختلف میوه برای هر ترکیب در سطح احتمال ۱٪ بر مبنای آزمون دانکن می باشد



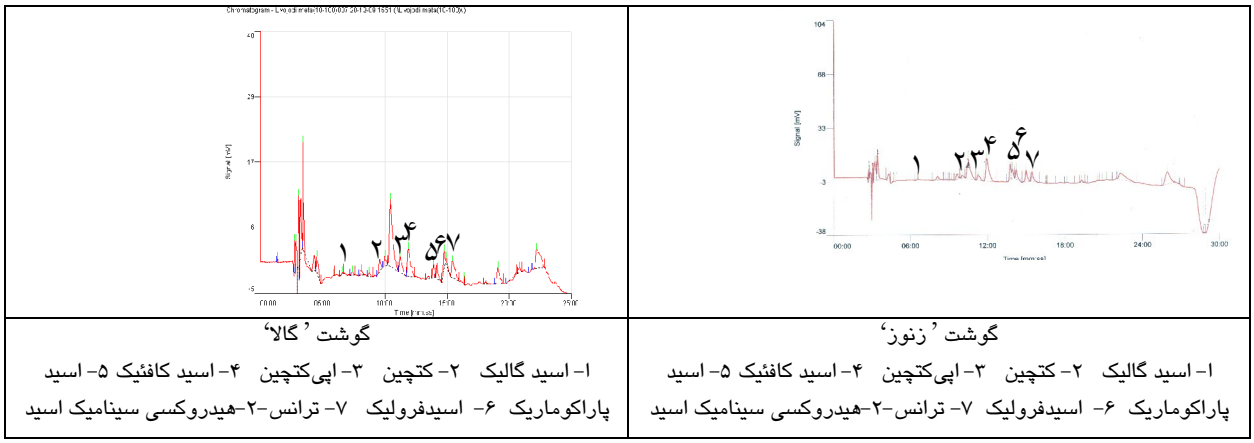
پوست ’گالا‘

۱- اسید گالیک ۲- کتچین ۳- اپی‌کتچین ۴- اسید کافئیک ۵- اسید پاراکوماریک ۶- اسیدفرولیک ۷- ترانس-۲-هیدروکسی سینامیک اسید



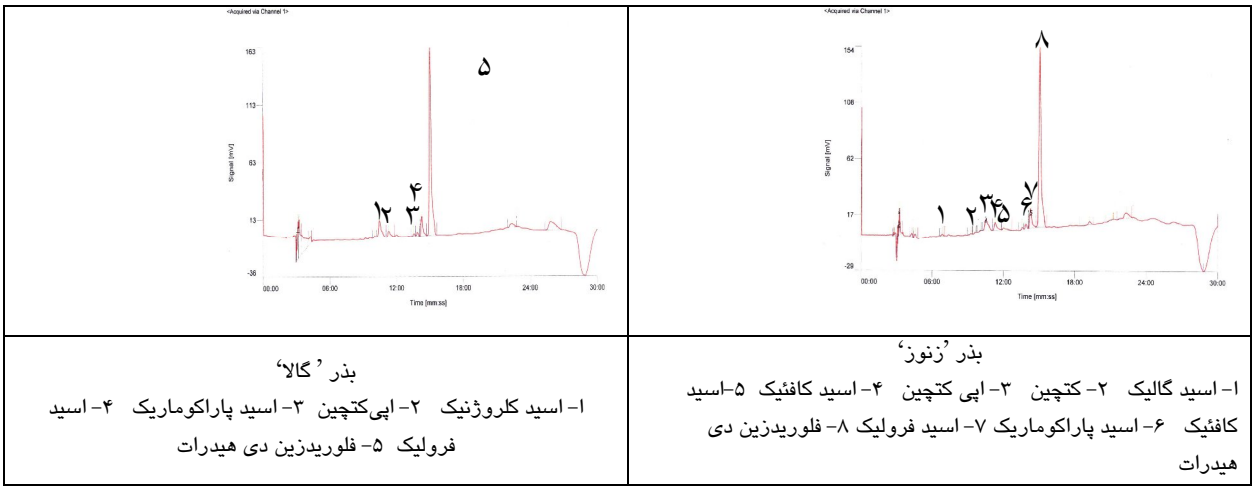
پوست ’زنوز‘

۱- اسید گالیک ۲- کتچین ۳- اپی‌کتچین ۴- اسید کافئیک ۵- اسید پاراکوماریک ۶- اسیدفرولیک ۷- ترانس-۲-هیدروکسی سینامیک اسید



شکل ۲ - کروماتوگرام عصاره‌های گوشت و پوست ارقام سیب ’گالا‘ و ’زنوز‘ با استفاده از فاز متحرک: ۲٪ اسیتک اسید در متانول و آب برای جداسازی ترکیبات پلی فنلی و فلاونوئیدی.

.



شکل ۳- کروماتوگرام عصاره‌های بذر ارقام سیب ’گالا‘ و ’زنوز‘با استفاده از فاز متحرک: ۲٪ اسیتک اسید در متانول و آب برای جداسازی ترکیبات پلی فنلی و فلاونوئیدی

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که میزان اسید کلروژنیک در پوست و گوشت’زنوز‘ بیشتر از ’گالا‘ بود. برعکس میزان کلروژنیک اسید در بذر ’گالا‘ بیشتر از ’زنوز‘ بود (جدول ۱). اود و همکاران (۲۰۰۱a,b) بیان نمودند که فلوریدزین، کتچین و اسید کلروژنیک اکثرا در بافتهای عمقی میوه تجمع می یابد. آنها همچنین بیان کردند که سطوح بالای ترکیبات ذکر شده در بافت‌های عمقی میوه نشان دهنده این واقعیت است که ژن‌های کنترل کننده بیوسنتز این ترکیبات وابسته به نور نمی‌باشند. پتکوسک و همکاران (۲۰۰۳) بیان نمودند که با نمو میوه میزان اسید کلروژنیک در میوه کاهش می یابد. آنها همچنین عنوان نمودند که وجود این ترکیب در میوه سیب در مقاومت به بیماری‌های قارچی تاثیر دارد.

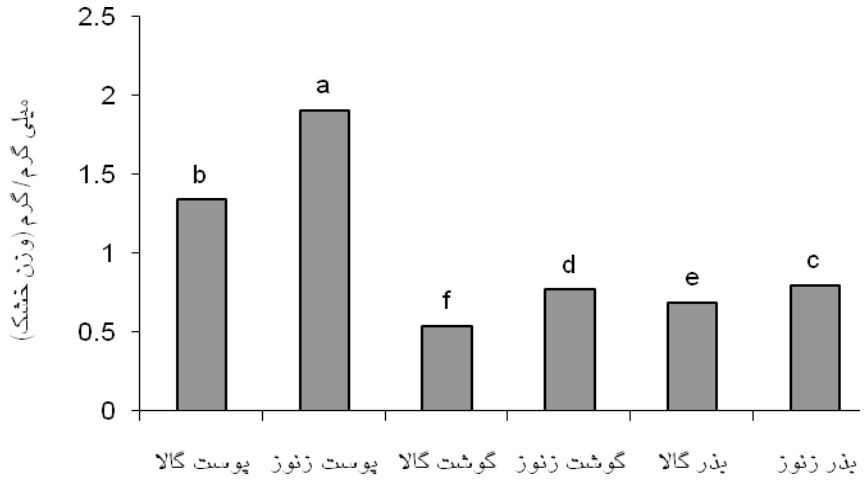
میزان اسیدهای فنلی کل اندازه گرفته شده در پوست و گوشت سیب ’زنوز‘ بیشتر از ’گالا‘ بود. ولی میزان این ترکیبات در بذر ’گالا‘ بیشتر از بذر ’زنوز‘ بود (شکل ۵). میزان اسید گالیک در پوست ’زنوز‘ بیشتر ازپوست ’گالا‘ و در گوشت ’گالا‘ بیشتر از گوشت ’زنوز‘ بود (جدول ۱). میزان اسید کافئیک در پوست’گالا‘ بیشتر از پوست ’زنوز‘ بود. میزان اسید کافئیک در گوشت ’زنوز‘ بیشتر از گوشت

’گالا‘ بود. اسید گالیک و اسید کافئیک در بذر سیب ’گالا‘ وجود نداشت. اما دربذر ’زنوز‘ این دو ترکیب به ترتیب ۱,۲٪ و ۷٪ از کل اسیدهای فنلی را شامل شدند (جدول ۱). اسید پارا- کوماریک، اسید کافئیک و اسید فرولیک به عنوان واحدهای آغازشگر بیوسنتز لیگنین عمل می‌کنند. با توجه به اینکه میزان ترکیبات ذکر شده در سیب ’زنوز‘ بیشتر از ’گالا‘ بود (جدول ۱)، لذا چنین به نظر می‌رسد که براساس یافته‌های هاکین (۲۰۰۰) میزان لیگنین در پوست میوه ’زنوز‘ بیشتر از پوست میوه ’گالا‘ باشد.

نتایج حاصل از آزمایش نشان داد که میزان فلوریدزین دی هیدرات (دی هیدرو چالکون) در بذر هر دو رقم بیشتر از پوست میوه بود. بیشترین میزان فلوریدزین دی هیدرات در بذر سیب ’گالا‘ (۸۶ ٪ کل ترکیبات فلاونوئیدی) مشاهده شد. در پوست سیب ’زنوز‘ و ’گالا‘ این ترکیب به ترتیب ۳/۴۱٪ و ۰/۰۶٪ از کل ترکیبات فلاونوئیدی راشامل شد. گوشت هر دو رقم سیب فاقد فلوریدزین دی هیدرات بود (جدول ۱). نتایج حاصل از این آزمایش با یافته‌های اود و همکاران (۲۰۰۱a) مطابقت دارد.

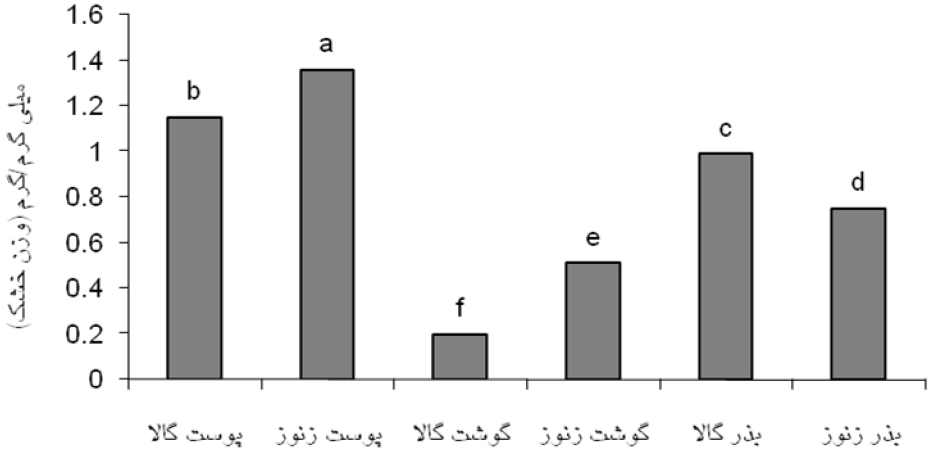
نتیجه‌گیری کلی

مطالعه فیتوشمیایی ترکیبات پلی فنلی و فلاونوئیدی سیب به دلیل اهمیت این ترکیبات در ویژگیهای بصری، ارگانولپتیک، انبارمانی میوه‌ها و نیز اهمیت این ترکیبات در سلامتی انسانها از مدتها پیش مورد توجه قرار گرفته و روش‌های مختلفی برای شناسایی این ترکیبات به کار گرفته شده است. روش مورد استفاده در این آزمایش به صورت کارآیی قادر به شناسایی ترکیبات پلی فنلی و فلاونوئیدی موجود در بخشهای مختلف میوه سیب بود. این آزمایش اولین گزارش در خصوص شناسایی و تعیین کمیت ترکیبات پلی فنلی و فلاونوئیدی میوه سیب ارقام ’گالا‘ و ’زنوز‘ در شرایط آب هوایی ایران می باشد. تفاوت کمی قابل توجهی بین دو رقم مورد مطالعه در میزان ترکیبات پلی فنلی و فلاونوئیدی بخشهای مختلف میوه وجود داشت. تفاوتهای مشاهده شده به دلیل حضور بیشتر کوئرستین-۳-دی-گالاکتوزید در پوست سیب ’ گالا‘ بود. در نهایت چنین به نظر می‌رسد که با در نظر گرفتن پروفایل ترکیبات پلی فنلی و فلاونوئیدی سیب رقم ’زنوز‘، این رقم قابلیت رقابت با سیب ’گالا‘ را دارد و از نظر بعضی از ترکیبات مخصوصا اسیدهای فنلی غنی‌تر از ’گالا‘ می باشد. با این حال به نظر می رسد که با انتخاب پایه مناسب و سیستم هرس و تربیت صحیح برای درختان ’زنوز‘ بتوان مجموع ترکیبات پلی فنلی و فلاونوئیدی (مخصوصا ترکیبات وابسته به نور) را در این رقم افزایش داد و ویژگیهای کیفی آن را هر چه بیشتر نزدیک به ارقام پذیرفته شده جهانی نمود. البته این ادعا نیازمند مطالعات بیشتری در این خصوص می باشد.



شکل ۴- مقادیر ترکیبات فلاوانولی بخشهای مختلف میوه سیب ارقام 'زنوز' و 'گالا'

حروف موجود در ستونها نشان دهنده اختلاف معنی دار بین بخشهای مختلف میوه برای هر ترکیب در سطح احتمال ۱٪ بر مبنای آزمون دانکن می باشد



شکل ۵- مقادیر اسیدهای فنلی کل بخشهای مختلف میوه سیب ارقام 'زنوز' و 'گالا'

حروف موجود در ستونها نشان دهنده اختلاف معنی دار بین بخشهای مختلف میوه برای هر ترکیب در سطح احتمال ۱٪ بر مبنای آزمون دانکن می باشد

سپاسگزاری

از خانم دکتر اثنی‌عشری، خانم بامداد، خانم مهندس ابقایی، از مدیریت جهاد کشاورزی شهرستانهای بستان آباد و مرند به خصوص آقای نامور و آقای مهندس پورحسن به دلیل همکاری در تهیه نمونه‌های مورد نیاز نهایت تشکر به عمل می آید. از آقای دکتر مطلبی‌آذر که تجزیه آماری این آزمایش را تقبل نمودند، نهایت تشکر به عمل می‌آید. از معاونت پژوهشی دانشگاه تبریز به دلیل تامین بخشی از هزینه‌های آزمایش تشکر به عمل می‌آید.

منابع مورد استفاده

Awad MA, Jager A and westing LM, 2000. Flavonoid and chlorogenic acid levels in apple fruit: characterization of variation. Sci Hort 83: 249-263.

Awad MA, Jager A, Plas LH and Krol AR, 2001. Flavonoid and chlorogenic acid changes in skin of ‘Elstar ’ and ‘ Jonagold ’ apples during development and ripening. Sci Hort. 90: 69-83.

Awad MA, Jager A, and Wagenmakers PS, 2001. Effects of light on flavonoids and chlorogenic acid levels in the skin of ‘ Jonagold ’ apple. Sci Hort. 88: 289-298.

Awad MA and Jager A, 2002. Formation of flavonoids, especially anthocyanin and chlorogenic acid in ‘Jonagold’ apple skin: influences of growth regulators and fruit maturity. Sci Hort. 93: 257-266.

Bakhshi D and Arakawa O, 2006. Induction of phenolic compounds biosynthesis with light irradiation in the flesh of red and yellow apples. J App Hort. 8(2): 101-104.

Del Rio JA, Gomez P, Baidez A, Fuster MD, Ortuno A and Frias V, 2004. Phenolic compounds have a role in the defence mechanism protecting grapevine against the fungi. Phytopathology. 43: 87–94.

Escarpa A and Gonzalez MC, 1998. High-performance liquid chromatography with diode-array detection for the determination of phenolic compound in peel and pulp from different apple varieties. J Chromatogr A 823: 331-337.

Hakkinen S, 2000. Flavonols and Phenolic Acids in Berries and Berry Products. PhD. Thesis. Department of Clinical Nutrition, Faculty of Medicine, University of Kuopio.

Khanizadeh S, Ding L, Tsao R, Rekika D, Yang R, Charies MT, Vigneault C, and Rupasinghe HP, 2007. Phytochemical distribution among selected advanced apple genotypes developed for fresh market and processing. J Agri Food Environ Sci. (E-journal), 1(2), (Accessible on line).

Kim KH, Tsao R, Yang R, and Cui SW, 2006. Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. Food Chem. 95: 466-473.

Lata B, Trampczynska A and Paczesna J, 2009. Cultivar variation in apple peel and whole fruit phenolic composition. Sci Hort. 121: 176- 181.

Li XJ, Hou JH, Zhang GL, Liu RS, Yang YG, Hu YX and Lin JX, 2004. Comparison of anthocyanin accumulation and morpho-anatomical feature in apple skin during color formation at tow habitats. Sci Hort. 99: 41-53.

Markowski J and Plocharski W, 2006. Determination of phenolic compounds in apples and processed apples products. J Fruit Ornam Plant Res. 14(2):133- 142.

Reay PF, 1999. The role of low tempereatures in the development of the red blush on apple fruite (‘Granny Smith’). Sci Hort. 79: 113-119.

Reay PF and Lancaster JE, 2001. Accumulation of anthocyanins and quercetin glycosides in 'Gala' and 'Royal Gala' apple fruit skin with UV-B visible irradiation: modifying effects of fruit maturity, fruit side, and temperature. Sci Hort. 90: 57-68.

Pavia EAS, Isaias RMS, Vale FHA and Queiroz CGS, 2003. The influence of light intensity on anatomical structure and pigment contents of *Tradescantia pallida* (Rose) Hunt. Cv.purpurea Boom (Commelinaceae) leaves. Braz Arch Biol Technol. 46: 617-624.

Petkovsek MM, Usenik V and Stampar F, 2003. The role of chlorogenic acid in the resistance of apples to apple scab (*Venturia inaequalis* (Cooke) G. Wind. Aderh.). Zb Bioteh Fak Univ Ljublj Kmet 81(2): 233-242.

Schieber A, Keller P and Carle R, 2001. Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr A. 910: 265-273.

Takos AM, Ubi BE, Robinson SP and Walker AR, 2006. Condensed tannin biosynthesis gene are regulated separately from other flavonoid biosynthesis genes in apple fruit skin. Plant Sci. 170: 487-499.

Tsao R, Yang R, Young JC and Zhu H, 2003. Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC). J Agric Food Chem. 6347-53.