نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۲۷ شماره ۳/ سال ۱۳۹۶/ صفحات ۶۵ تا ۷۶

ارزیابی میزان ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره آبی و الکلی میوه نسترن وحشی (*Rosa canina* L.) شمال ایران

سمیه رضایی ارمی[۱] و زینب رفتنی امیری*[۲]

تاریخ دریافت: ۹۵/۳/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۵/۹/۲۰

[۱]دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده مهندسی زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

[۲]دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده مهندسی زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

* مسئول مکاتبه: Email: zramiri@gmail.com

چکیده

امروزه به علت اثرات منفی آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی، صنعت غذا توجه بیشتری به آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی کرده است. در این پژوهش ترکیبات فنولی میوه نسترن وحشی (*Rosa canina* L.) بعنوان منبع طبیعی آنتی‌اکسیدان، با سه حلال متانول ۸۰٪، اتانول ۵۰٪ و آب در سه بازه زمانی ٦، ۱۲ و ٢٤ ساعت استخراج شد و سپس میزان ترکیبات فنولی کل توسط روش فولین سیوکالتو و میزان ترکیبات فلاونوئیدی آن تعیین گردید. همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با سه روش آزمون مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH (دی فنیل پیکرو هیدرازیل)، آزمون قدرت احیاکنندگی و فعالیت آنتی-اکسیدانی کل در غلظت‌های مختلف بررسی و با آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی BHA و BHT مقایسه شد. نتایج این پژوهش نشان داد که تاثیر نوع حلال بر میزان استخراج معنی‌دار بوده و بالاترین میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی مربوط به عصاره متانولی ۸۰٪ بود. هم‌چنین با افزایش زمان استخراج میزان ترکیبات فنولی افزایش یافت. عصاره متانولی بیشترین میزان ترکیبات فنولی (۸۰/ ۷ ± ۲۹ /۲۳۵ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم عصاره خ) و فلاونوئیدی (۲۱/ ۰ ± ۰۰ /۱٤ میلی-گرم کوئرستین بر گرم عصاره) را داشت. کمترین IC_{50} در آزمون مهار رادیکال DPPH (٤٨/٠٦ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، قدرت احیاکنندگی (۷۳/۰۰) و آنتی اکسیدانی کل (۲۱۸/۷۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) مربوط به عصاره متانولی بوده است که در اکثر موارد فعالیت بالاتری نسبت به آنتی‌اکسیدان سنتزی BHA داشتند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی در عصاره‌ها وابسته به غلظت بود. نتایج این پژوهش نشان داد میوه نسترن کوهی به عنوان منبع غنی از ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی است. با این‌حال مطالعه بیشتر جهت بهره‌گیری از آن به عنوان یک نگهدارنده در سیستم‌های غذایی توصیه می‌گردد.

واژگان کلیدی: ترکیبات فنولی، ترکیبات فلاونوئیدی، عصاره، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، نسترن وحشی

مقدمه

آنتی‌اکسیدانها به دلیل نقش بالقوه‌ای که در صنعت غذا و سلامتی بشر دارند بسیار موردتوجه هستند و در مقادیر اندک، قادر به مهار یا به تاخیر انداختن اکسیداسیون ملکول‌های حساس می‌باشند (چکروان و همکاران ۲۰۱۵). ترکیبات فنولی به عنوان متابولیت‌های ثانویه گروه بزرگی از ملکول‌ها هستند که به طور گسترده‌ای در گیاهان توزیع شده‌اند. فنول‌ها به عنوان ملکول زیست

فعال موجود در میوه‌ها دارای ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی می‌باشند. این ترکیبات فعالیت آنتی-اکسیدانی خود را از طریق مکانیسم‌های مختلف مانند مهار رادیکال‌های آزاد، تبدیل محصولات اولیه اکسیداسیون به ترکیبات غیراکسیداتیو، شلات‌کردن فلزات و کاهش غلظت اکسیژن به انجام می‌رساند (تلیلی و همکاران ۲۰۱۵ و مواریس و همکاران ۲۰۱۵).

ویژگی آنتی‌اکسیدانی بستگی به حضور و غلظت انواع مختلف ترکیبات فنولی دارد. فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها، تانن‌ها و اسیدهای فنولی از مهمترین ترکیبات فنولی هستند. رادیکال‌های آزاد عامل اصلی بسیاری از بیماری‌ها هستند. آنتی‌اکسیدان‌ها رادیکال‌های آزاد و آسیب ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن را خنثی می‌کنند (سینگ و کوماری ۲۰۱۵).

فلاونوییدها یکی از انواع پلی‌فنول‌ها با اثر آنتی‌اکسیدانی بسیار بالا و سمیت کمتر نسبت به آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی مانند BHA و BHT می‌باشد (آریانا و همکاران ۲۰۱٤). این ترکیبات زیست فعال بویژه ترکیبات فنولی به عنوان متابولیت‌های ثانویه، بخاطر اثرات سودمند مانند اثرات ضدسرطانی، ضدلخته شدن و ضدالتهابی. دارای اهمیت فوق العاده‌ای هستند (تلیلی و همکاران ۲۰۱٤). استرس‌های اکسیداتیو منجر به برهم خوردن تعادل بین تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و ظرفیت سلولی برای سم زدایی آنها شده که منجر به گسترش بیماری‌های مزمن می‌شود. آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی و سنتزی از بیماری‌های مختلف ممانعت می‌کنند. اما با توجه به کارایی بیشتر و اثرات جانبی کمتر آنتی-اکسیدان‌های طبیعی نسبت به آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی استفاده از این منابع آنتی‌اکسیدانی ترجیح داده می‌شود. هم‌چنین آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی تخریب کبد و بیماری سرطان را افزایش می‌دهند (چکروان و همکاران ۲۰۱۵). اخیرا دانشمندان علم غذا و تغذیه پیشنهاد دادند این مواد به عنوان بخشی ار رژیم غذایی مصرف شوند. از این رو محققان به فکر یافتن ترکیبات با منشا طبیعی و دارای خواص آنتی‌اکسیدانی می‌باشند و توجه زیادی به منابع گیاهی به علت ظرفیت آنها در محافظت در برابر تخریب اکسیداتیو شده است (یی و همکاران ۲۰۱۳). در این راستا، صنعت غذا توجه بیشتری به آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی کرده است که بتواند به عنوان افزودنی یا مکمل-های غذایی استفاده شود (تلیلی و همکاران ۲۰۱٤).

نسترن وحشی با نام علمی *Rosa canina* L. از خانواده *Rosacea* که تحت عنوان *dog rose* نیز شناخته می‌شود به صورت درختچه‌ای به ارتفاع ۲-۳ متر می‌باشد (اصغری و همکاران ۲۰۱۵). میوه کاذب این گیاه که *Rose hip* نامیده می‌شود در غذا، چای یا به شکل دارو در بسیاری کشورها مورداستفاده قرار می-گیرد. در ایران از این میوه برای تهیه مربا یا ترشی استفاده می‌شود (اصغری و همکاران ۲۰۱۵). گیاه نسترن وحشی به دلیل داشتن متابولیت‌های ثانویه چون فلاونوییدها، تانن‌ها، لیگنین و آنتوسیانین دارای خواص دارویی بسیاری می‌باشد (مظفریان ۱۳۸۵). این میوه دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطانی، ضدجهش‌زایی است. (رومان و همکاران ۲۰۱۳ و ارسوی و همکاران ۲۰۱۵). میوه نسترن وحشی یک منبع ارزشمند از فیتونوترینت‌ها مانند ویتامین ث، توکوفرول‌ها، فنول‌ها، کاروتنوئیدها، قندها، اسیدهای آلی، اسیدهای آمینه، اسیدهای چرب ضروری، پکتین و تانن‌ها هستند. میوه این گیاه غنی از پتاسیم، فسفر و ترکیبات فنولی است. وجود مقادیر زیاد ویتامین ث، ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و کاروتنوئیدها، بتاکاروتن، گلوتاتیون، آنتوسیانین و لیکوپن میوه نسترن وحشی را به عنوان یک منبع مهم ترکیبات آنتی‌اکسیدانی معرفی کرده است (نادپل و همکاران ۲۰۱٦ و دمیر و ازکان ۲۰۰۱ و ارسوی و همکاران ۲۰۱۵). میوه نسترن کوهی همچنین حاوی ویتامین‌ها ی B_1، B_2، K، E و مواد معدنی است (رومان و همکاران ۲۰۱۳). ثابت شده است که میوه این گیاه در درمان برخی بیماری‌های مزمن مانند سرماخوردگی، آنفولانزا، ورم مفاصل، رماتیسم، نقرس، سیاتیک، زخم

معده، سنگ صفرا و کلیه موثر است. بعلاوه دارای ویژگی ضداکسیداتیو و ضدباکتری می‌باشد (اصغری و همکاران ۲۰۱۳).

هدف از این پژوهش، اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی، ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی میوه نسترن کوهی با آزمون‌های مختلف و مقایسه آن با آنتی‌اکسیدانهای سنتزی می‌باشد تا بتوان از خواص آنتی‌اکسیدانی این میوه در صنایع غذایی استفاده بهینه کرد.

مواد و روش‌ها

میوه نسترن وحشی از منطقه هزارجریب شهر نکا در شهریور ماه ۱۳۹٤ برداشت و بعد از جداسازی هسته‌ها از میوه، تا زمان آزمایش در دمای C° ۱۸- نگهداری شدند.

استخراج ترکیبات فنولی

میوه نسترن کوهی نگهداری شده در دمایC ° ۱۸- از فریزر خارج و توسط آسیاب خانگی کاملا خرد شد. سپس با نسبت ۱۰:۱ با حلال آب، متانول ۸۰٪ و اتانول ۵۰٪ مخلوط و بعد از طی مدت زمان استخراج (٦، ۱۲ و ۲٤ ساعت) با هم‌زدن توسط همزن مغناطیسی در دمای محیط، عصاره‌ها با کاغذ واتمن شماره یک فیلتر شدند. عصاره‌های الکلی به منظور تبخیر حلال در تبخیرکننده چرخشی در دمای C° ٤۰ و عصاره آبی در آون با دمای C° ٤۵ تیمار شده و برای آزمایشات بعدی در دمای C° ۱۸- نگهداری شدند (عربشاهی و عروج، ۲۰۰۷).

تعیین میزان ترکیبات فنولی

میزان کل ترکیبات فنولی با روش رنگ‌سنجی فولین-سیوکالتو اندازه‌گیری شد (عربشاهی و عروج ۲۰۰۷). ۲۰ میکرولیتر از محلول عصاره با ۱/۱٦ میلی‌لیتر آب‌مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالتو مخلوط شد. در ادامه بعد از ۱ تا ۸ دقیقه ۳۰۰ میکرولیتر از محلول (۲۰٪) کربنات سدیم اضافه گردید. نمونه‌ها بعد از هم زدن با همزن لوله‌ای به مدت ۳۰ دقیقه در بن‌ماری با دمای C° ٤۰ نگهداری شدند. سپس جذب نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷٦۰ نانومتر خوانده شد. اسیدگالیک به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون به‌کار رفت و میزان آن براساس معادل اسید گالیک در گرم عصاره خشک بیان شد. آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد و میانگین آنها گزارش شد.

اندازه گیری مقدار کل ترکیبات فلاونوئیدی

۰/۵ میلی لیتر از عصاره درون لوله آزمایش با ۱/۵ میلی‌لیتر متانول حل شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلراید ۱۰٪ و ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول پتاسیم استات ۱ مولار به آنها اضافه شد و پس از۳۰ دقیقه نگهداری در دمای اتاق جذب نمونه‌ها در طول موج ٤۱۵ نانومتر خوانده شد. از کوئرستین به عنوان استاندارد برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد (چانگ و همکاران ۲۰۰۲).

ارزیابی فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH[1]

توانایی مهار رادیکال آزاد DPPH به روش لی و همکاران (۲۰۰۵) انجام شد. برای تعیین قدرت عصاره‌ها در مهار رادیکال‌های آزاد DPPH، ابتدا ۳ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره در متانول ۸۰٪ (۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۲۰۰و ٤۰۰) با ۱ میلی‌لیتر از محلول متانولی یک میلی‌مولار DPPH به شدت مخلوط شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در مکانی تاریک نگهداری و در نهایت جذب آن در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. نمونه شاهد این آزمون شامل ۱ میلی‌لیتر از محلول DPPH و ۳ میلی‌لیتر متانول بود. نتایج با آنتی-اکسیدان‌های سنتزی BHA و BHT مقایسه گردید. جهت بررسی بهتر فعالیت آنتی‌رادیکالی از فاکتور IC_{50} استفاده شد که بیانگر درصدی از عصاره است که قادر به خنثی کردن ۵۰٪ از رادیکال‌های DPPH اولیه موجود در محیط است.

$$\text{درصد مهار رادیکال} = \frac{\text{جذب نمونه} - \text{جذب شاهد}}{\text{جذب شاهد}} \times ۱۰۰$$

[1]- 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها به روش قدرت احیاکنندگی

توانایی عصاره‌ها برای احیا آهن سه ظرفیتی توسط روش عربشاهی و عروج (۲۰۰۷) تعیین شد. در این روش ۱ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره (۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ٤۰۰ و ٦۰۰) در حلال استخراجی استفاده و با ۲/۵ میلی‌لیتر بافرفسفات (pH=6.6 و M=0.2) و ۲/۵ میلی‌لیتر فری‌سیانیدپتاسیم (۱۰ گرم در لیتر) کاملاً مخلوط شد و به مدت نیم ساعت در دمای ۵۰ $^{\circ}C$ نگهداری گردید. سپس ۲/۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید (۱۰۰ گرم در لیتر) به مخلوط فوق اضافه و کاملاً مخلوط شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه (۱۷۰۰g) سانتریفوژ گردید. پس از آن، ۲/۵ میلی-لیتر از محلول رویی با ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر کلریدآهن (III) (۱ گرم در لیتر) مخلوط گردید و در طول موج ۷۰۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر جذب آن خوانده شد. همچنین از BHA و BHT به عنوان شاهد مثبت استفاده گردید.

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها به روش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل[2]

در این روش غلظت‌های مختلف عصاره خشک شده (۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ٤۰۰، ۵۰۰ و ۸۰۰) در حلال‌های استخراجی تهیه شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از هر یک از غلظت‌ها و ۱ میلی‌لیتر از معرف (مخلوطی از اسید-سولفوریک ۰/٦ مولار، فسفات‌سدیم ۲۸ میلی‌مولار و مولیبدات‌آمونیوم ٤ میلی‌مولار) را در لوله اپندروف ریخته و پس از دربندی به مدت ۹۰ دقیقه در بن‌ماری ۹۵ $^{\circ}C$ نگهداری شد. بعد از سرد شدن آن تا دمای اتاق، جذب در طول موج ٦۹۵ نانومتر در برابر یک نمونه بلانک قرائت گردید. . فاکتور IC_{50} در بررسی ظرفیت آنتی اکسیدانی کل عصاره‌ها بیانگر غلظتی از عصاره است که در طول موج ٦۹۵ نانومتر جذبی معادل ۰/۵ داشته است. نمونه بلانک حاوی ۱ میلی‌لیتر محلول معرف و ۰/۱ میلی‌لیتر حلال استفاده شده بود که در شرایطی مشابه با بقیه نمونه‌ها انکوبه شده بودند (پرییتو و همکاران ۱۹۹۹).

تجزیه و تحلیل آماری

نتایج به دست آمده با استفاده از روش آنالیز واریانس (ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چنددامنه‌ای دانکن ($P<0/05$) بر پایه طرح کاملا تصادفی انجام شد. آنایز آماری با نرم افزار SPSS انجام شد. کلیه آزمایشات در سه تکرار انجام شد.

نتایج و بحث

میزان ترکیبات فنولی

جدول ۱ نتایج آنالیز واریانس و مقایسه میانگین مقدار کل ترکیبات فنولی به دست آمده از حلال‌های اتانولی، متانولی و آبی را در زمان‌های مختلف در سطح احتمال ۵ درصد نشان می‌دهد. نوع حلال اثر معنی‌داری بر میزان ترکیبات فنولی داشته است به گونه‌ای که در بین حلال‌ها بیشترین و کمترین میزان استخراج به ترتیب مربوط به عصاره متانولی و آبی بود. دلیل این تفاوت را می‌توان این‌گونه توجیه کرد که آب با ایجاد محیط قطبی، برخی از ترکیبات فنولی با درجه قطبیت پایین را استخراج نمی‌کند. اما حلال‌های آلی در ترکیب با آب توانایی بالایی در استخراج دارند (چرینوس و همکاران ۲۰۰۷). پس تفاوت در قطبیت حلال دلیل اصلی تفاوت-های مشاهده شده در میزان ترکیبات فنولی است (رومبائو و همکاران ۲۰۰۹). به همین علت میزان ترکیبات فنولی استخراج شده با آب کمتر بود. در عوض با افزودن آب به حلال‌های آلی (متانول ۸۰٪ و اتانول ۵۰٪) یک محیط نسبتا قطبی تشکیل گردید که می‌تواند مقادیر و انواع بیشتری از ترکیبات فنولی با قطبیت متوسط را استخراج کند (چرینوس و همکاران ۲۰۰۷). از طرف دیگر حضور مقادیر مناسب آب در حلال آلی، به صورت مطلوبی موجب افزایش تورم بافت گیاهی گردید که این تورم، افزایش سطح تماس بین ماتریکس گیاهی و حلال

[2]- Total antioxidant activity

و در نتیجه افزایش استخراج را به همراه داشت (لی و همکاران ۲۰۱۰). در واقع میزان حلالیت ترکیبات فنولی وابسته به نوع حلال به کار رفته و برهم کنش آنها با ترکیبات فنولی است (سوزوکی و همکاران ۲۰۰۲). وانگ و همکاران (۲۰۰۷) پیشنهاد کردند که مخلوط آبی حلال متانول نسبت به آب خالص در استخراج ترکیبات فنولی ارجحیت دارد که مطابق با نتایج این تحقیق بود زمان استخراج نیز تاثیر معنی‌داری روی میزان استخراج ترکیبات فنولی کل داشت. زیرا با گذشت زمان حلال فرصت لازم برای نفوذ به درون بافت گیاهی را پیدا کرده و همچنین ترکیبات فنولی نیز فرصت کافی برای جدا شدن از ماتریکس و ورود به حلال داشتند (اسپینگو و همکاران ۲۰۰۷).

میزان ترکیبات فنولی به تنهایی معیار دقیقی به منظور فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیست. زیرا معرف فولین‌سیوکالتو به صورت غیراختصاصی با ترکیبات فنولی واکنش می‌دهد و علاوه بر ترکیبات فنولی، ترکیبات دیگر موجود در عصاره‌ها مانند اسیدهای آلی، قندها و ... نیز قادر به احیا این معرف هستند بنابراین نیاز به سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش‌های دیگر نیز است (محسن و آمار ۲۰۰۹).

میزان ترکیبات فلاونوئیدی

میزان کل ترکیبات فلاونوئیدی در جدول ۲ آورده شده است. هم‌چنان که در جدول مشاهده می‌شود تاثیر حلال بر روی میزان استخراج معنی‌دار بود. حلال متانول بالاترین مقدار ترکیبات فلاونوئیدی (۲۱/ ۰ ± ۰۰ /۱٤) و عصاره آبی (۷۳/ ۰ ± ۲۲ /۸) نیز کمترین میزان استخراج را به خود اختصاص دادند. شارما و همکاران (۲۰۱۵) در بررسی ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی میوه *Pyrus communis* که از خانواده *Rosaceae* می باشد گزارش کردند که عصاره متانولی این میوه حاوی مقادیر بالای ترکیبات فنولی (۱٤/۵ میکروگرم معادل گالیک اسید در هر میلی‌گرم عصاره) و فلاونوئیدی (۱۰/۳ میکروگرم در هر میلی‌گرم) می‌باشد.

جدول۱- مقدار کل ترکیبات فنولی (میلی گرم گالیک اسید در هر گرم عصاره)

حلال	زمان استخراج (ساعت)		
	٦	۱۲	۲٤
متانول ۸۰٪	۲۰٤/ ۰۸ ± ۱ /۵۷^{b}	۲۱۸/ ۱۲ ± ۱ /٤۰^{b}	۲۳۵/ ۲۹ ± ۷ /۸۰^{a}
اتانول ۵۰٪	۱۹٦/ ۰۰ ± ۵ /۸٤^{bc}	۲۱۱/ ۷۰ ± ۱ /۱٦^{b}	227/ ٤۸ ± ۰ /۷۵^{a}
آب	۱٤۹/ ۷۳ ± ۵ /٦٦^{d}	۱۵٦/ ۰٤ ± ۱ /۵۷^{d}	۱۷۵/ ۷۵ ± ۰ /۵۷^{c}

حروف مشابه از لحاظ آماری نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار با یکدیگر می‌باشد ($p>0.05$).

جدول۲- مقدار کل ترکیبات فلاونوئیدی (میلی گرم به گرم عصاره)

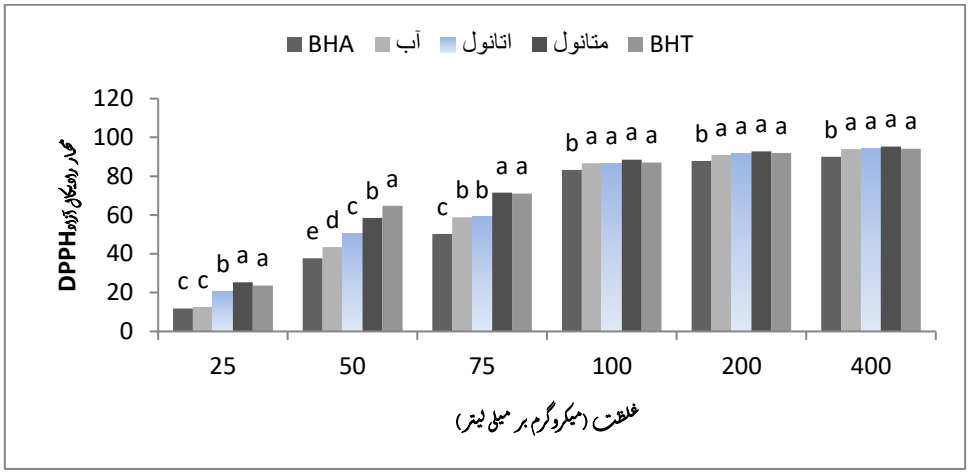
	متانول	اتانول	آب
ترکیبات فلاونوئیدی	۱٤/ ۰۰ ± ۰ /۲۱^{a}	۱۰/ ۷٦ ± ۰ /۲۸^{b}	۸/ ۲۲ ± ۰ /۷۳^{c}

حروف مشابه از لحاظ آماری نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار با یکدیگر می‌باشد ($p>0.05$).

میزان مهار رادیکال آزاد DPPH

آنتی‌اکسیدان‌ها با DPPH که یک رادیکال آزاد پایدار است واکنش داده و آن را به α و α دی‌فنیل β پیکروهیدرازین تبدیل می‌کنند. درجه بی‌رنگ شدن نشان‌دهنده پتانسیل مهاری آنتی‌اکسیدان‌هاست (نایدو و همکاران ۲۰۰۸). شکل ۱ میزان کاهش جذب محلول DPPH در حضور غلظت‌های مختلف عصاره نسترن وحشی را نشان می‌دهد. نتایج آنالیز واریانس نشان داد

نوع و غلظت عصاره‌ها تاثیر معنی‌داری بر فعالیت آنتی-اکسیدانی دارد. افزایش غلظت تاثیر معنی‌داری بر مهار رادیکال آزاد DPPH داشت. با افزایش غلظت ترکیبات فنولی به دلیل افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل دهنده، احتمال دهندگی هیدروژن به رادیکال‌های آزاد افزایش می‌یابد (سانچز و همکاران ۱۹۹۹). همچنین عصاره‌های متانولی بالاترین قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH را داشتند و عصاره اتانولی و آبی در رتبه‌های بعدی قرار داشتند. تمامی عصاره‌ها در تمام غلظت‌ها فعالیت آنتی‌رادیکالی بالاتری نسبت به آنتی‌اکسیدان سنتزی BHA داشتند و عصاره‌ها در غلظت‌های بالاتر از ۲۰۰ پی‌پی‌ام تفاوت معنی‌داری در قدرت مهارکنندگی با آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT نداشتند. برای مقایسه بهتر فعالیت ضدرادیکالی عصاره ها از فاکتوری با عنوان IC_{50} استفاده می شود. IC_{50} به غلظتی از عصاره گفته می شود که در آن ۵۰٪ از رادیکال‌های آزاد مهار می‌شود. بنابراین هرچه این غلظت کمتر باشد نشان‌دهنده فعالیت آنتی‌رادیکالی بالاتر عصاره‌هاست. مقادیر IC_{50} عصاره‌ها در جدول ۲ آورده شده است. در مقایسه با آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی، عصاره‌ها IC_{50} کمتر و در نتیجه فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت به آنتی‌اکسیدان سنتزی BHA داشتند. فعالیت آنتی-اکسیدانی ترکیبات فنولی مانند فلاونوئیدها بستگی به ساختار شیمیایی آنها، بویژه توزیع گروه‌های هیدروکسیل دارد. یک غلظت بحرانی از ترکیبات فنولی برای مهار رادیکال‌های آزاد کافی است. احتمالا در غلظت‌های بالاتر به دلیل پیدایش نوعی اشباع‌شدگی افزایش غلظت تاثیر معنی‌داری روی میزان مهار رادیکال‌های آزاد ندارد. در کل، افزایش غلظت ترکیبات فنولی بطور مستقیم میزان توانایی عصاره‌های مختلف را در مهار رادیکال آزاد افزایش می‌دهد. در غلظت‌های بالاتر ترکیبات فنولی، به دلیل افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل موجود در محیط واکنش، احتمال دهندگی هیدروژن به رادیکال‌های آزاد و به دنبال آن قدرت مهارکنندگی عصاره افزایش می‌یابد. علت بالاتر بودن توانایی مهار رادیکال آزاد در عصاره متانولی را به میزان ترکیبات فنولی بالاتر آن نسبت داد. وقتی آنتی‌اکسیدان دهنده اتم هیدروژن به محلول DPPH اضافه می‌گردد جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر کاهش می‌یابد. زیرا رادیکال آزاد DPPH مهار می‌شود (لی و همکاران ۲۰۰۵). در واقع عصاره میوه نسترن وحشی سرشار از ترکیبات فنولی می‌باشد و این ترکیبات گروه مهمی از ترکیبات گیاهی به عنوان متابولیت‌های ثانویه را تشکیل می‌دهند. این ترکیبات به‌دلیل داشتن گروه‌های هیدروکسیل، توانایی خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد را داشته و می‌توانند به عنوان دهنده الکترون یا هیدروژن عمل کنند. تفاوت در فعالیت آنتی‌رادیکالی عصاره‌های مختلف دلایل متعددی می‌تواند داشته باشد. اما به دلیل ساختار پیچیده عصاره‌ها بیان همبستگی میان فعالیت آنتی‌رادیکالی و ترکیبات موجود در عصاره‌ها به آسانی امکان‌پذیر نیست که می‌توان به تفاوت در نوع و مقدار ترکیبات موثر موجود در آنها نسبت داد. اطلاعات بدست آمده روشن کرد که عمل عصاره‌ها به عنوان مهارکننده رادیکال آزاد می‌باشد و عصاره‌ها حاوی آنتی‌اکسیدان‌های اولیه هستند که با رادیکال‌های آزاد واکنش می‌دهند. اسریکانت و همکاران (۲۰۱۳) در بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره *musa rosacea* گزارش کردند که میزان IC_{50} عصاره الکی، استونی و هگزانی در آزمون مهار رادیکال DPPH به ترتیب ۱۱۶، ۲۴۵ و ۵۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود و فعالیت آنتی-اکسیدانی آنها وابسته به غلظت بود که همسو با نتایج این پژوهش می‌باشد.

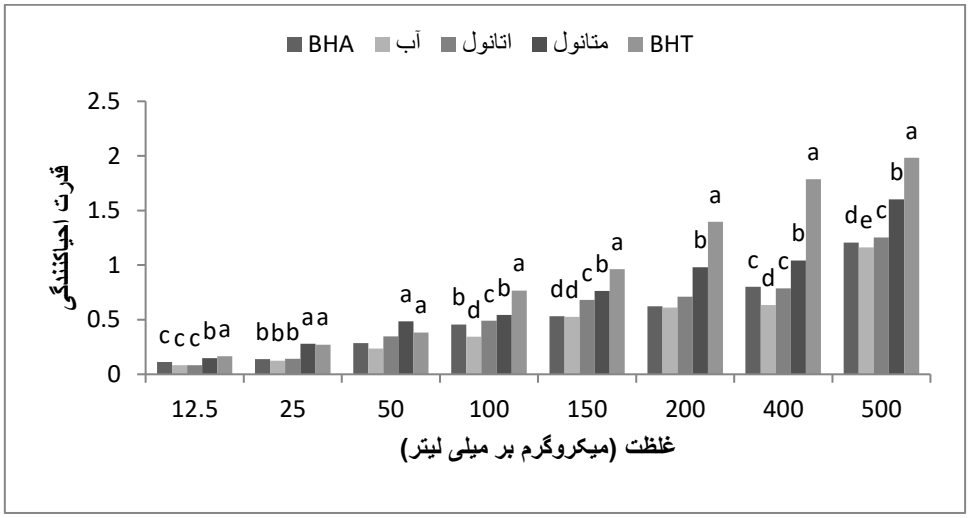


شکل ۱- مقایسه میانگین درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH غلظت‌های مختلف عصاره نسترن وحشی

حروف مشابه از لحاظ آماری نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار با یکدیگر می‌باشد ($p>0.05$).

ارزیابی قدرت احیاکنندکی عصاره‌های حاصل از نسترن وحشی

در این روش، احیا آهن (III) به عنوان معیاری برای قابلیت الکترون‌دهی به کار می‌رود. قدرت احیاکنندگی مرتبط با فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات زیستی می‌باشد (عربشاهی و عروج ۲۰۰۷). در روش قدرت احیاکنندگی، جذب نوری نمونه‌ها رابطه مستقیمی با قدرت احیاکنندگی دارد. یعنی جذب نوری بیشتر بیانگر خاصیت احیاکنندگی بیشتر است. شکل ۲ قدرت احیاکنندگی عصاره‌های حاصل از حلال‌های مختلف و مقایسه آن با آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی را نشان می‌دهد. ارتباط مستقیم بین افزایش غلظت عصاره‌ها و فعالیت احیاکنندگی آنها وجود دارد. همانطور که مشاهده می‌شود عصاره متانولی بالاترین نیروی احیاکنندگی را داشت. معمولا برای مقایسه قدرت احیاکنندگی از فاکتور IC_{50} استفاده می‌شود که بیانگر غلظتی از عصاره است که در طول موج ۷۰۰ نانومتر جذبی معادل ۰/۵ داشته باشد. بنابراین هر چه این غلظت کمتر باشد نشان‌دهنده قدرت احیاکنندگی بالاتر عصاره‌ها و در نتیجه فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتر آنهاست که به دلیل وجود ترکیبات فنولی می‌باشد. در مقایسه با آنتی اکسیدان‌های سنتزی، عصاره‌های الکلی فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت به BHA داشتند. دلیل اختلاف مشاهده شده بین عصاره‌ها به دلیل استخراج ترکیبات فنولی متفاوت توسط حلال‌های مختلف می‌باشد (رومبائو و همکاران ۲۰۰۹). گائو و همکاران (۲۰۱۵) ضمن تعیین میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی میوه ازگیل، فعالیت آنتی-اکسیدانی آنها را بررسی کردند. یافته ها حاکی از آن بود میزان ترکیبات فنولی حاصل از سه حلال آب، متانول و استن از ۱/۵۹ تا ۱٤/٤۸ میلی گرم گالیک اسید در هر گرم نمونه متغیر بود که دلیل این تفاوت را در حلالیت متفاوت ترکیبات فنولی دانستند. همچنین میزان فلاونوئید این سه عصاره از ۲/۲۱ تا ۱۱/۱۹ میلی‌گرم روتین در هر گرم نمونه متغیر بود. در آزمون مهار رادیکال آزاد میزان IC_{50} برابر ۳۳٦/۱۰ – ۸٦/۳٤ میکروگرم بر میلی‌لیتر و در آزمون قدرت احیاکنندگی برابر ۲۲ تا ۸۸ میکروگرم در هر میلی‌لیتر بود که بیان-گر تاثیر حلال استخراج کننده بر میزان فعالیت آنتی-اکسیدانی بوده است.

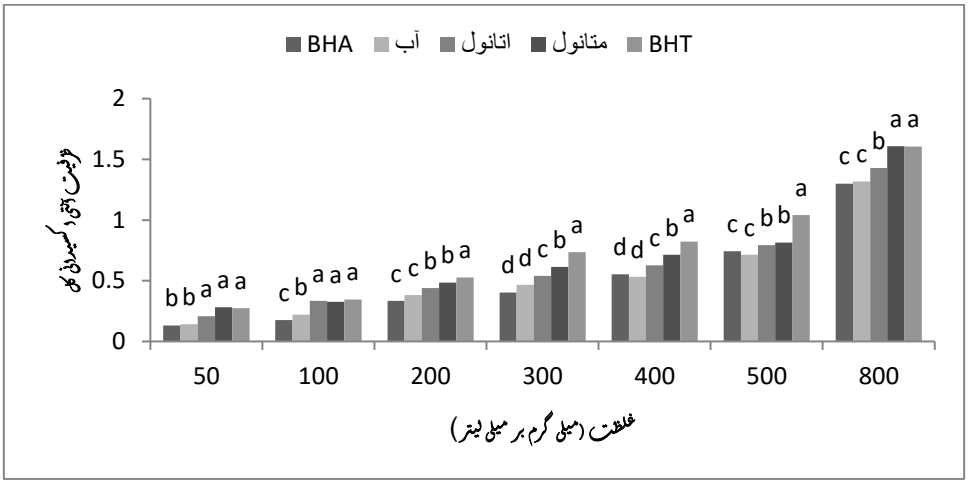


شکل ۲- مقایسه میانگین نیروی احیاکنندگی غلظت‌های مختلف عصاره نسترن وحشی

حروف مشابه از لحاظ آماری نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار با یکدیگر می‌باشد ($p>0.05$).

بررسی ظرفیت آنتی اکسیدانی کل عصاره ها

این روش بر مبنای کاهش مولیبدن (VI) به مولیبدن (V) توسط عصاره و در نتیجه تشکیل کمپلکس فسفات مولیبدن (V) سبز رنگ می‌باشد. با توجه به شکل ۵، نتایج آنالیز واریانس نشان داد که تاثیر نوع حلال و غلظت بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها معنی‌دار است. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت عصاره‌ها، فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل افزایش یافت. تمامی عصاره‌ها فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت به BHA داشتند و عصاره متانولی در غلظت‌های بالا اختلاف معنی‌داری با آنتی-اکسیدان سنتزی BHT نداشت. همانطور که مشاهده می‌شود همه عصاره‌ها فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت به آنتی‌اکسیدان سنتزی BHA داشتند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی به شدت وابسته به نوع حلال به‌کار برده شده می‌باشد که دلیل اهمیت نوع حلال به‌کار برده را، پتانسیل آنتی‌اکسیدانی متفاوت ترکیبات فنولی با قطبیت مختلف دانستند (سانگ و همکاران ۲۰۱۵). در بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی ۲۵ نوع مختلف نسترن در کشور ترکیه با روش مهار رادیکال آزاد DPPH و قدرت احیاکنندگی آهن ارسوی و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند که میزان IC_{50} در آزمون مهار رادیکال آزاد DPPH، از ۱/۱ تا ۲/۶۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر متغیر بود. همچنین در آزمون قدرت احیاکنندگی میزان فعالیت شلات‌کنندگی آهن بین ۵۰٪ تا ۶۱/۲۶٪ متغیر بود. میزان ترکیبات فنولی از ۲۰/۱۲ تا ۳۲/۲ میلی‌گرم معادل اسیدگالیک در هر گرم نمونه بود که بیان‌گر این مطلب است که میزان ترکیبات فنولی در نسترن وحشی بومی ایران بالاتر از نسترن رشد کرده در ترکیه می‌باشد. دلیل این تفاوت را می‌توان در ارتفاع محل رویش، مرحله رشد و نمو و آب و هوا، نوع ترکیبات فنولی، ژنوتیپ گیاه، محل کشت گیاه و همچنین تفاوت در میزان رسیدگی میوه‌ها دانست (ارسوی و همکاران ۲۰۱۵).



شکل ۳- مقایسه میانگین فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل غلظت‌های مختلف عصاره نسترن وحشی

حروف مشابه از لحاظ آماری نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار با یکدیگر می‌باشد ($p>0.05$).

جدول ۳- مقایسه میانگین مقادیر مختلف IC_{50} (میکروگرم در هر میلی لیتر) عصاره میوه نسترن وحشی در آزمون‌های مختلف

	عصاره			آنتی‌اکسیدان سنتزی	
روش آزمون	عصاره متانولی	عصاره اتانولی	عصاره آبی	BHA	BHT
مهار رادیکال DPPH	٤٨/٠٦^{d}	٥٨/53^{bc}	٦٣/10^{b}	٧١/83^{a}	٤٠/85^{d}
قدرت احیاکنندگی	٧٣/00^{d}	٩٩/51^{c}	١٥٠/92^{a}	١٢٦/17^{b}	٦١/88^{e}
ظرفیت‌آنتی‌اکسیدانی‌کل	٢١٨/72^{d}	٢٧٣/44^{c}	٣٣٦/12^{b}	٣٦١/81^{a}	188/00^{e}

حروف مشابه از لحاظ آماری نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار با یکدیگر می‌باشد ($p>0.05$).

نتیجه گیری کلی

به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت میوه نسترن کوهی سرشار از ترکیبات فنولی مانند فلاونوئیدهاست و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره آن به روش‌های مختلف ثابت شد. همچنین اثر حلال و زمان استخراج بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن موثر بود و با توجه به مضرات آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی از عصاره میوه نسترن وحشی می‌توان در صنعت غذا و دارو تحت عنوان منبع آنتی اکسیدان‌های طبیعی بهره برد. با این حال پژوهش بیشتر جهت بهره‌گیری از آن در سیستم‌های غذایی توصیه می‌گردد.

منابع مورد استفاده

مظفریان و، ۱۳۸۵، فرهنگ نامهای گیاهان ایران، جلد دوم، چاپ چهارم، فرهنگ معاصر، موسسه انتشارات امیرکبیر، تهران، ص ٤٦٢.

Arabshahi-Delouee S and Urooj A, 2007. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. Food Chemistry 102: 1233-1240.

Ariana B, Konstantina K, Georgios P, Vasiliki L, Aliannis N, Magdalini K and Kostis M, 2015. Evaluation of total antioxidant potential of *Pistacia lentiscus* var. *chia* leaves extracts using UHPLC-HRMS. Journal of Food Engineering 167: 25-31.

Asghari B, Salehi P, Farimani MM and Nejad Ebrahimi S, 2015. α-Glucosidase Inhibitors from Fruits of *Rosa canina* L. Records of Natural Products 9:276-283.

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: 178-82.

Chekroun E, Benariba N, Adida H, Bechiri A, Azzi R and Djaziri R, 2015. Antioxidant activity and phytochemical screening of two Cucurbitaceae: *Citrullus colocynthis* fruits and *Bryonia dioica* roots. Asian Pacific Journalof Tropical Disease 5:632-637.

Chirinos R, Rogez H, Campos D, Pedreschi R and Larondelle Y, 2007. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (Tropaeolum tuberosum Ruiz and Pavon) tubers. Separation and Purification Technology 55: 217-225**.**

Demir F and Ozcan M, 2001. Chemical and technological properties of rose (Rosa canina L.) fruits grown wild in Turkey. Journal of Food Engineering 47: 333 – 336.

Ersoy E, Bagci Y, Zenginbal H, Ozen SM and Elidemir AY, 2015. Antioxidant properties of Rosehip fruit types (*Rosa canina* sp.) selected from Bolu-Turkey. International Journal of Science and Knowledge 4: 51-59.

Gao H, Cheng N, Zhou J, Wang B, Deng J and Cao W, 2014. Antioxidant activities and phenolic compounds of date plum persimmon (Diospyros lotus L.) fruits. Journal of food science and technology 51: 950-956.

Li J, Zu YG, Fu YJ, Yang YC, Li SM, Li ZN and Wink M, 2010. Optimization of microwave-assisted extraction of triterpene saponins from defatted residue of yellow horn (Xanthoceras sorbifolia Bunge.) kernel and evaluation of its antioxidant activity. Innovative Food Science & Emerging Technologies 11: 637-643.

Li JW, Ding SD and Ding XL, 2005. Comparison of antioxidant capacities of extracts from five cultivars of Chinese jujube. Process Biochemistry 40: 3607-3613**.**

Mohsen S.M and Ammar ASM, 2009. Total phenolic contents and antioxidant activity of corn tassel extracts. Food Chemistry 112: 595–598**.**

Morais DR, Rotta EM, Sargi SC, Schmidt EM, Bonafe EG, Eberlin MN, Sawaya AC and Visentainer JV, 2015. Antioxidant activity, phenolics and UPLC–ESI–MS of extracts from different tropical fruits parts and processed peels. Food Research International 77: 392-399.

Nadpal JD, Lesjak MM, Šibul FS, Anacˇkov GT, Cˇ etojevic´-Simin DD, Mimica-Dukic´NM and Beara IN, 2016. Comparative study of biological activities and phytochemical composition of two rose hips and their preserves: Rosa canina L. and Rosa arvensis Huds 192: 907-914.

Naidu MM, Sulochannamma G, Sampathu SR and Srinivas P, 2008. Studies on extraction and antioxidant potential of green coffee. Food Chemistry 107: 377-384.

Prieto P, Pineda M and Aguilar M, 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. Analytical Biochemistry 269: 337-341.

Roman I, Stănilă A and Stănilă S, 2013. Bioactive compounds and antioxidant activity of Rosa canina L. biotypes from spontaneous flora of Transylvania. Chemistry Central Journal 7:73.

Rumbaoa RGO, Cornago DF and Geronimo IM, 2009. Phenolic content and antioxidant capacity of Philippine potato (Solanum tuberosum) tubers. Journal of Food Composition and Analysis 22: 546-550.

Sanchez-Moreno C, Larrauri JA and Saura-Calixto F, 1999. Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. Food Research International 32:407–412.

Sharma k, PasrichaY, Satpathy G and Gupta RK, 2015. Evaluation of phytochemical and antioxidant activity of raw *Pyrus communis* (l), an underexploited fruit. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 3: 46-50.

Sing R and Kumari N, 2015. Comparative determination of phytochemicals and antioxidant activity from leaf and fruit of Sapindus mukorrossi Gaertn. – Avaluable medicinal tree. Industrial Crops and Products 73: 1–8.

Spigno G, Tramelli L and De Faveri DM, 2007. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. Journal of Food Engineering 81: 200-208.

Srikanth M, Swamy TR, Rao TM and Rao G, 2013. Abortifacient and antioxidant activities of different extracts of Musa rosacea. Asian Pacific Journal of Reproduction 2: 174-177.

Suzuki M, Watanabe T, Miura A, Harashima E, Nakagawa Y and Tsuji K, 2002. An extraction solvent optimum for analyzing polyphenol contents by Folin-Denis assay. Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi 49: 507-511.

Tlili N, Mejri H, Anouer F, Saadaoui E, Khaldi K and Nasri N, 2015. Phenolic profile and antioxidant activity of Capparis spinosa seedsharvested from different wild habitatsNizar. Industrial Crops and Products 76: 930–935.

Tlili N, Mejri H, Yahia YM, Anouer F, Saadaoui E, Rejeb S and Khaldi A, 2014. Phytochemicals and antioxidant activities of Rhus tripartitum (Ucria) fruits depending on locality and different stages of maturity. Food Chemistry 160: 98–103.

Wang J, Sun B and Cao Y, 2007. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. Food Chemistry 106:804–810.

Ye F, Liang Q, Li H and Zhao G, 2015. Solvent effects on phenolic content, composition, and antioxidantactivity of extracts from florets of sunflower (Helianthus annuus L.). Industrial Crops and Products 76: 574–581.

Evaluation of phenolic, flavonoid contents and antioxidant activity of queous and alcoholic extract of *Rosa Canina* L. fruits north of Iran

S Rezai Erami[1*] and Z Raftani Amiri[2]

Received: June 01, 2016 Accepted: December 10, 2016

[1]PhD student. Department of Food Science and Technology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
[2]Associate Professor. Department of Food Sciences and Technology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
[*]Corresponding author; Email: zamiri@gmail.com

Abstract

Nowadays due to undesirable effects of synthesis antioxidant, food industry has paid more attention to the natural antioxidants. In this study, Phenolic compounds of *Rosa canina* L. as a natural source of antioxidant was extracted with methanol 80%, ethanol 50% and water in three times (6, 12 and 24 hours) and then Total Phenolic contents were determined by Folin Ciocaltue assay and flavonoid contents were measured. Also the antioxidant activity of extracts was assessed through DPPH (2, 2-diphenyl-1- picrylhydrazyl) radical-scavenging activity, reducing power assay and total antioxidant activity in different concentration and compared to synthetic antioxidants, BHA and BHT. The results of this study showed that solvent was effective on extraction of phenolic compounds significantly and Methanol 80% was optimum solvent in extraction of phenolic and flavonolid compound from *Rosa canina* L. methanolic extract of *Rosa canina* fruit had highest total phenol (235.29 ± 7.80 mg gallic acid per g dry extract) and flavonoid (14/00 ± 0.21 mg quercetin per g dry extract) contents. Methanol extract had lowest IC_{50} in DPPH radical-scavenging activity (48.06 mg/ ml), reducing power (73.00 mg/ml) and total antioxidant capacity (218.72). In most cases antioxidant activity of extract was higher as compared to BHA. Extracts showed antioxidant activity in a concentration-dependent way. Result of this study showed that *Rosa canina* fruit is a potential source of natural antioxidants but more investigation was suggested to use of them as a preservative in food products.

Keywords: Phenolic compound, Flavonoid compound, Extract, Antioxidant activity, *Rosa canina* L**.**