نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۲۸ شماره ۴/ سال ۱۳۹۷/ صفحات ۵۷ تا ۷۲

ارزیابی ترکیبات حاوی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پوست و گوشت میوه ازگیل توسط عصاره متانولی و استونی

بشیر ایوب نژادگان جرمی*[۱] و حمید حسن پور[۲]

تاریخ دریافت: ۹۶/۲/٤ تاریخ پذیرش: ۹٦/۱۲/۱٤

[۱] دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم باغبانی، دانشگاه ارومیه
[۲] دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه
*مسئول مکاتبه: Email: bashir.urmia@gmail.com

چکیده

ازگیل به‌صورت خودرو در استان آذربایجان شرقی (ارسباران) رشد می‌نماید. اما به جز در موارد محدودی، مطالعات چندانی راجع به ازگیل در این منطقه انجام نشده است. این پژوهش در قالب آزمایش فاکتوریل بر پایه‌ی طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام گردید. در این پژوهش، ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های متانولی ۸۵٪ و استونی ۸۰٪ در دو بخش پوست و گوشت میوه ازگیل مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصله نشان داد که عصاره متانولی بیشترین مقدار فلاونوئید کل پوست و گوشت به ترتیب ٤۱۵/۰۰ و ۳۲۷/۸۳ میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم وزن تر معادل کاتچین و تانن کل پوست و گوشت به ترتیب ۱۱۳۲/٦۷ و ۱۵۷۵/۳۳ میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم وزن تر معادل کاتچین را دارا است. همچنین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پوست میوه براساس روش فرپ (FRAP) با دو عصاره متانول و استون به ترتیب ۱/۱۷ و ۱/۱۳ میلی‌گرم سولفات آهن در گرم وزن تر بود که اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ بین آن‌ها مشاهده نشد. بیشترین میزان فنل کل پوست و گوشت به ترتیب ۷٦۲/۵۱ و ۵۲٦/۱۲ میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم وزن تر معادل اسید گالیک، ترکیبات غیر فلاونوئیدی کل پوست و گوشت به ترتیب ٤۲۷/۰۱ و ۳٦۵/٤٦ میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم وزن تر معادل کاتچین، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل به دو روش دی پی پی اچ (DPPH) و شلاتینگ آهن (Fe^{2+}chelating) در پوست میوه به ترتیب ۹٤/۸۷٪ و ۵۲/۳۱٪ و شاخص ترکیبی آنتی‌اکسیدان در بخش پوست میوه ۹۸/۸٦ در عصاره استونی به‌دست آمد. به‌طور کلی نتایج نشان داد که میوه ازگیل منبع مناسبی از آنتی‌اکسیدانی‌های طبیعی در بخش پوست وگوشت میوه است و استون بهترین حلال برای استخراج ترکیبات حاوی فعالیت آنتی‌اکسیدانی در میوه ازگیل می‌باشد.

واژگان کلیدی: ارسباران، ترکیبات فنلی، حلال، شاخص ترکیبی، فلاونوئید

مقدمه

ازگیل با نام علمی *Mespilus germanica* L. از خانواده Rosaceae، درختچه‌ای خاردار به ارتفاع سه تا پنج متر با شاخه‌های قهوه‌ای رنگ محکم می‌باشد که در ایران کنس و کندس نیز نامیده می‌شود و گسترش آن عمدتاً در استرالیا، فرانسه و قفقاز شمالی بوده و مقدار عملکرد ازگیل در این مناطق از یک تا شش تن در هکتار گزارش شده است (خوشبخت و هامر ۲۰۰۵). میوه این

گیاه قهوه‌ای رنگ، گلابی و سیب شکل بوده و حاوی پنج هسته است که در ابتدای رشد و قبل از رسیدن سفت است و به میزان زیادی نیز تانن دارد. گوشت میوه زمانی قابل خوردن است که در اثر سرما نرم شده باشد. زمان گلدهی این گیاه اردیبهشت و خرداد ماه است (خاتمساز ۱۳۷۱ و قهرمان ۱۳۸٦). رویشگاه‌های اصلی آن در دنیا: ایران، جنوب و جنوب شرقی اروپا، آناتولی، قفقاز، عراق و ترکمنستان است. پراکنش جغرافیایی آن در ایران: استان‌های گلستان، مازندران، گیلان، آذربایجان شرقی (ارسباران)، اردبیل و تهران است (مظفریان ۱۳۸۳). براساس مطالعات مشخص شده است که برگ و میوه این گیاه استفاده دارویی دارد. از خواص میوه آن می‌توان به تقویت اعصاب، درمان خونریزی‌های داخلی، یبوست، التهاب روده و کاهش نفخ معده اشاره نمود (بی بالانی و موسی زاده ۲۰۱۲). ازگیل عمدتاً توسط مردمان ایران، جنوب شرق اروپا و ترکیه به‌صورت تازه‌خوری یا فرآوری شده مصرف می‌شود و میوه آن علاوه بر تانن، دارای موسیلاژ فراوان، ۷۵٪ آب، ۱۰٪ قند، ۷ تا ۱۳٪ سلولز، اسیدهای مالیک، سیتریک، تارتاریک و به مقدارجزئی اسید بوریک و ویتامین‌های E، B و C می‌باشد (زرگری ۱۳۷۵).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی به‌طور گسترده به عنوان پارامتری برای غذا و ترکیبات فعال زیست دارویی استفاده می‌شود. آنتی‌اکسیدان‌ها، ترکیبات خنثی کننده رادیکال‌های آزاد اکسیژن در بدن هستند. رادیکال‌های آزاد اکسیژن میل ترکیبی زیادی با مولکول‌های حیاتی بدن از جمله اسیدهای نوکلئیک و پروتئین دارند. بنابراین رادیکال‌های آزاد از طریق ترکیب با این مولکول‌ها باعث تخریب آن‌ها و در نتیجه موجب ایجاد بیماری‌های مختلف از جمله سرطان‌ها، بیماری‌های قلبی- عروقی، التهابی و تضعیف سیستم ایمنی بدن می‌شوند (گوهری و همکاران ۱۳۹۷).

اخیراً توجه بیشتری روی بررسی ترکیبات فنولیکی و آنتی‌اکسیدانی موجود در میان ارقام و ژنوتیپ‌های مختلف شده است که این مسئله باعث شده اصلاحگران و پرورش‌دهندگان شروع به انتخاب محصولاتی با مقادیر آنتی‌اکسیدانی بالاتر از حد معمول باشند. در سال‌های اخیر توجه بسیار زیادی بر روی میوه ازگیل به‌عنوان یکی از منابع اصلی تأمین کننده آنتی‌اکسیدان‌ها معطوف شده است (گلچین و همکاران ۲۰۱۱). در مطالعه‌ای که بر روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی میوه، پوست شاخه و برگ ازگیل وحشی در استان مازندران انجام گردید، مشخص شد که عصاره‌های حاصل از پوست شاخه (آبی و متانولی) بهترین فعالیت مهار کنندگی رادیکال آزاد دی پی پی اچ (DPPH) را به ترتیب با ۱۰/۷ و ۱۰/٤ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارند. همه عصاره‌ها توانایی ضعیفی را در کلات کردن آهن نشان دادند. عصاره متانولی میوه، بهترین فعالیت را در مهار کردن اکسید نیتریک نسبت به بقیه عصاره‌ها نشان داد (۲٤۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر). عصاره برگ‌ها و پوست شاخه‌ها قدرت احیاء کنندگی بهتری نسبت به میوه‌ها نشان دادند. همچنین مطالعه آن‌ها نشان داد که عصاره پوست شاخه و برگ، مقدار فلاونوئید و فنل کل بیشتری نسبت به میوه داشتند (نبوی و همکاران ۲۰۱۱).

در پژوهشی دیگر خصوصیات آنتی‌اکسیدانی و میزان ترکیبات فنلی کل میوه ازگیل با حلال‌های استون، متانول، اتانول ۸۰٪ و آب مورد ارزیابی قرار گرفت و مشاهده گردید که بالاترین میزان ترکیبات فنلی در حلال استون ۸۰٪ و پس از آن به ترتیب در متانول، اتانول و آب حاصل شد. مقدار ترکیبات فنلی کل در عصاره‌ی استونی و متانولی به ترتیب برابر با ۷/٤۳۷ و ٥/۰۸٦ گرم معادل اسید گالیک در ۱۰۰ گرم ماده خشک بود (ممشلو و همکاران ۱۳۹۰). همچنین نتایج پژوهش دیگری نشان داد که مقدار ترکیبات فنلی کل میوه رسیده ازگیل نسبت به فلاونوئیدهای کل آن بیشتر و در حدود ۱٦۷/۳۷ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن تر معادل اسید گالیک بود. همچنین این مقدار برای فلاونوئید کل به میزان ٤٦/۳۳ میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم وزن تر معادل

کاتچین به‌دست آمد. ترکیبات فنلی کل با حلال متانول و فلاونوئیدهای کل با اتانول بهتر استخراج شدند (قربانلی و همکاران ۱۳۸۸). مطالعه‌ی با هدف ارزیابی برخی ترکیبات ثانویه بذر و گوشت ازگیل وحشی و اهلی و مقایسه‌ی آن‌ها بین میوه‌های نارس و رسیده انجام شد که براساس نتایج به‌دست آمده، بیشترین میزان فنل کل (۲/۹۱٤ میلی گرم بر گرم وزن خشک) و فلاونوئید کل (۱۲۹/٦۱ میلی گرم بر گرم وزن خشک) در گوشت میوه نارس وحشی و بیشترین میزان آنتی‌اکسیدانی کل در بذر نسبت به گوشت میوه وجود داشت (نیک‌جو و همتی ۱۳۹۲).

طی مطالعه‌ای در ترکیه، مشخص گردید که مقدار ترکیبات فنلی در عصاره میوه ازگیل ۲۵/۰۸ میلی‌گرم بر گرم معادل اسید گالیک و مقدار فلاونوئید کل آن ۲/۳۹ میلی‌گرم بر گرم معادل کوئرستین است (گلچین و همکاران ۲۰۱۱). ترکیبات فنلی یکی از مکانیسم‌های دفاعی سلول‌ها در مقابل عوامل نامساعد هستند که با پیشرفت پیری به تدریج کاهش می‌یابند. غلظت فنل کل استخراجی با ٤ حلال استون ۸۰٪، متانول ۸۰٪، اتانول ۸۰٪ و آب در سه دوره متفاوت پس از گل‌دهی در میوه ازگیل توسط آیاز و همکاران (۲۰۰۸)، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به‌دست آمده نشان داد که محتوی فنل کل با حلال‌های استون، متانول، اتانول و آب در ۱۹۳، ۲۰۷ و ۲۱٤ روز بعد از تمام گل به ترتیب ٥٦٤/۷، ٤۳٦/٥ و ۳٥۱/۷ میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم وزن تر معادل کاتچین، ۲۳۹/٦، ۱۹۷/۳ و ٤۸/۷ میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم وزن تر معادل کاتچین، ۱٥٦/٤، ۱۲٦/۷ و ۳۸/٤ میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم وزن تر معادل کاتچین و ٤٥/۱، ۳۲/٤ و ۱٦/۲ میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم وزن تر معادل کاتچین می‌باشد. در بین حلال‌ها، استون و آب به ترتیب بیشترین و کمترین مقدار فنل کل استخراجی به میزان ۳٥۱/۷ و ۱٦/۲ میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم وزن تر معادل کاتچین را در ۲۱٤ روز بعد از تمام گل نشان دادند.

قابل ذکر است که هیچ روش مورد آزمایشی به تنهایی جهت بررسی آنتی‌اکسیدان‌ها کافی نیست و ترکیب چند روش متفاوت انتخاب خوبی جهت ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدان عصاره‌های مختلف می‌باشد. هر روش آنتی‌اکسیدانی دارای مکانیسم عمل خاصی می‌باشد. در روش FRAP از یک واکنش اکسیداسیون- احیاء استفاده می‌شود که با تغییر رنگ همراه است. اساس روش DPPH بر مبنای احیاء رادیکال آزاد DPPH به‌وسیله آنتی‌اکسیدان‌ها در غیاب سایر رادیکال‌های آزاد در محیط می‌باشد که نتیجه این عمل باعث ایجاد رنگ در محیط می‌شود. همچنین تشکیل رادیکال‌های آزاد ممکن است به‌وسیله توقیف یون‌های فلزی از طریق واکنش‌های شلاتینگ بازداشته شود. در روش شلاتینگ آهن، فروزین می‌تواند با آهن شلاته شود و یک کمپلکس قرمز رنگ را ایجاد نماید که این واکنش در حضور عوامل شلاتینگ دیگر محدود شده و منجر به کاهش رنگ قرمزی می‌گردد. به‌طور کلی، برای استخراج پلی فنل ها از گیاهان، از آب و حلال‌های آلی مانند اتانول، متانول، استون و دی اتیل اتر استفاده می گردد (هایونی و همکاران ۲۰۰۷). در این میان تفاوت‌های آشکاری بین مقادیر ترکیبات فنلی در عصاره‌های مختلف مشاهده می‌شود که ناشی از نوع آماده سازی نمونه، روش و مدت زمان استخراج و خواص فیزیکوشیمیایی حلال‌های به‌کار رفته می باشد. با توجه به اینکه ازگیل دارای کاربردهای دارویی مهمی همچون اثرات ضد میکروبی، فعالیت‌های ضد توموری، تحریک سیستم ایمنی و همچنین دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد و نظر به اینکه بخش‌های مختلف میوه دارای ترکیبات فیتوشیمیایی متفاوت می‌باشند و همچنین به خاطر اینکه حلال‌های مختلف تأثیر متفاوتی در استخراج ترکیبات فیتوشیمیایی دارند. بنابراین بررسی ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدانی در بخش‌های مختلف میوه ازگیل منطقه ارسباران ضروری به نظر می‌رسد، چرا که تاکنون چنین مطالعه‌ای روی این میوه در ارسباران انجام

نگردیده است. لذا هدف از پژوهش حاضر، ارزیابی ترکیبات حاوی فعالیت آنتی‌اکسیدانی با حلال‌های متفاوت در دو بخش پوست و گوشت میوه ازگیل می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره

میوه‌های تازه در آبان ماه ۱۳۹٤ از ژنوتیپ‌های وحشی ازگیل جنگل‌های ارسباران استان آذربایجان شرقی (شهرستان کلیبر، روستای مکیدی) با موقعیت جغرافیایی ٤٦ درجه و ٥٤ دقیقه طول جغرافیایی و ۳۸ درجه و ۵۰ دقیقه عرض جغرافیایی و ارتفاع از سطح دریای ١٤٣٦ متر به تعداد ۲۰ میوه از هر درخت سالم و جوان جمع‌آوری گردید و تعداد روز بعد از گلدهی (۱۸۰ روز بعد از تمام گل) به‌عنوان شاخص برداشت در نظر گرفته شد. ابتدا پوست میوه ازگیل با تیغ تیز جدا شده و سپس گوشت و بذر آن از هم تفکیک گردید. عصاره‌گیری از پوست و گوشت میوه بدین صورت انجام شد که ۰/۵ گرم از نمونه پودر شده پوست و گوشت به‌صورت جداگانه با پنج میلی‌لیتر از حلال متانول ۸۵٪ و استون ۸۰٪ مخلوط و به مدت یک دقیقه ورتکس شد. سپس نمونه‌ها به مدت یک ساعت در دمای اتاق نگهداری و دوباره به مدت یک دقیقه ورتکس و سپس به مدت پنج دقیقه در دور۱۰۰۰۰ در دمای ٤^{Co} سانتریفیوژ شدند. بعد از آن قسمت روشناور نمونه‌ها به آرامی برداشته شده و در لوله‌های درب‌دار و در دمای ۲۰^{Co}- نگهداری شدند و برای سنجش صفات بیوشیمیایی از قبیل فنل کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به سه روش دی پی پی اچ (DPPH)، فرپ (FRAP) و شلاتینگ آهن (Fe^{2+}chelating) مورد استفاده قرار گرفت (حسن پور و علیزاده ۲۰۱٦).

اندازه‌گیری میزان فنل کل

برای ارزیابی فنل کل از روش دو و همکاران (۲۰۰۹) با کمی تغییر استفاده شد. ابتدا ۳۰ میکرولیتر عصاره تهیه شده، به داخل ویال ریخته شد و بعد ۹۰ میکرولیتر آب مقطر، ٦۰۰ میکرولیتر فولین ۱۰٪ اضافه گردید و بعد از گذشت شش دقیقه ٤۸۰ میکرولیتر کربنات سدیم به آن اضافه شد و حجم نهایی به ۱۲۰۰ میکرولیتر رسانده شد. نمونه‌ها به مدت ۱/۵ الی دو ساعت در محل تاریکی در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۷٦۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفتومتر قرائت گردید. مقدار فنل کل با رسم منحنی استاندارد اسید گالیک و براساس میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم معادل اسید گالیک بیان گردید.

تعیین میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل

برای تعیین میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی از سه روش دی پی پی اچ[1] فرپ[2] و شلاتینگ آهن استفاده شد.

روش دی پی پی اچ (DPPH)

اندازه‌گیری توانایی عصاره‌ها در مهار رادیکال‌های آزاد دی پی پی اچ به این صورت انجام شد که ۵۰ میکرولیتر از عصاره آماده شده را با ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول دی پی پی اچ مخلوط کرده و بعد از قرار دادن نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی در دمای اتاق جذب نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۵ نانومتر قرائت و بر اساس رابطه ۱ درصد بازدارندگی محاسبه گردید (ناکاجیما و همکاران ۲۰۰٤).

[۱]

بازدارندگی DPPH (٪) = Ac-As/Ac×100

در این رابطه Ac و As به ترتیب جذب شاهد و جذب نمونه می‌باشد.

روش فرپ (FRAP)

برای اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل براساس این روش ۲/۸۵ میلی‌لیتر محلول فرپ برداشته شد و با ۱۵۰ میکرولیتر از عصاره به‌دست آمده مخلوط گردید و بعد از گذشت حدوداً ۱۰ دقیقه جذب نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۵۹۳ نانومتر قرائت شد

1 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazy (DPPH)
2 Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

(بنزیک و استراین ۱۹۹۶). ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به‌صورت میلی‌گرم سولفات آهن در گرم وزن تر عصاره بیان گردید.

روش شلاتینگ آهن (Fe^{2+}chelating)

برای اندازه‌گیری درصد شلاتینگ از روش دنیز و همکاران (۱۹۹٤) استفاده شد که ابتدا یک میلی‌لیتر از عصاره تهیه شده با ۳/۷ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر کلرید آهن دو ظرفیتی دو میلی‌مولار به آن اضافه شد. بعد از نگهداری نمونه‌ها به مدت ۷۰ دقیقه در تاریکی در دمای اتاق، ۰/۲ میلی‌لیتر فروزین[1] پنج میلی‌مولار به آن اضافه شد و نمونه‌ها در روی شیکر به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. سپس جذب نمونه‌ها با دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ٥٦٢ نانومتر قرائت گردید و درصد شلاتینگ آهن نمونه‌ها براساس رابطه ۲ محاسبه شد.

[۲]

فعالیت شلاتینگ (٪) = (1-(As/Ac))×100

در این رابطه Ac و As به ترتیب جذب شاهد و جذب نمونه می‌باشد.

تعیین میزان شاخص ترکیبی آنتی‌اکسیدان

شاخص ترکیبی آنتی‌اکسیدان براساس روش سرام و همکاران (۲۰۰۸) با استفاده از رابطه ۳ محاسبه شد.

[۳]

شاخص ترکیبی = (میانگین نمونه/ میانگین بهترین نمونه)×۱۰۰

سپس میانگین اعداد به‌دست آمده در هر سه روش تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، به عنوان شاخص ترکیبی آنتی‌اکسیدان بیان گردید.

اندازه‌گیری میزان ترکیبات فلاونوئید کل و غیر فلاونوئیدی کل

برای استخراج عصاره پوست و گوشت میوه، یک گرم از نمونه پودر شده با ۱۰ میلی‌لیتر حلال متانول ۸۵٪ و استون ۸۰٪ مخلوط و به مدت یک دقیقه ورتکس شد. بعد از نگهداری نمونه‌ها به مدت ۲٤ ساعت در دمای اتاق با سرعت ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ٤°C به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس قسمت روشناور نمونه‌ها به آرامی برداشته شد و در لوله‌های درب‌دار در دمای ۲۰°C- نگهداری شدند (حسن پور و علیزاده ۲۰۱٦). برای اندازه‌گیری فلاونوئید کل از روش شین و همکاران (۲۰۱٤) با کمی تغییر استفاده شد. ابتدا ۵۰۰ میکرولیتر عصاره تهیه شده را با ۱۵۰ میکرولیتر نیتریت سدیم ۵٪ مخلوط کرده و بعد از پنج دقیقه، ۳۰۰ میکرولیتر کلرید آلومینیوم ۱۰٪ به آن اضافه شد و بعد از طی پنج دقیقه، یک میلی‌لیتر سود یک مولار اضافه گردید و در نهایت حجم محلول به پنج میلی‌لیتر رسانده شد و جذب نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۵۱۰ نانومتر قرائت گردید. مقدار فلاونوئید کل برحسب میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم وزن تر معادل کاتچین بیان شد. همچنین ترکیبات غیر فلاونوئیدی کل نیز از اختلاف بین میزان فنل کل و فلاونوئید کل محاسبه گردید (یوزلاک و همکاران ۲۰۰۹).

اندازه‌گیری میزان تانن کل

برای استخراج عصاره پوست و گوشت، یک گرم از نمونه‌های پودر شده با ۱۰ میلی‌لیتر حلال متانول ۸۵٪ و استون ۸۰٪ مخلوط و به مدت دو دقیقه ورتکس شدند. بعد از نگهداری نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق در دور ۱۵۰۰۰ به مدت ۲۵ دقیقه در دمای ٤°C سانتریفیوژ شدند. سپس قسمت روشناور نمونه‌ها به آرامی برداشته شده و در لوله‌های درب‌دار در دمای ۲۰°C- جهت اندازه‌گیری تانن کل نگهداری شدند (ارکان و سلجوک ۲۰۱۵). برای اندازه‌گیری تانن کل از روش بردهارست و جانز (۱۹۷۸) با کمی تغییر استفاده شد. ابتدا ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره تهیه شده به سه میلی‌لیتر وانیلین ٤٪ اضافه شد و کاملاً با هم مخلوط گردید. سپس به محلول حاصله ۱/۵ میلی‌لیتر اسید هیدروکلریک اضافه گردید و به مدت دو دقیقه ورتکس

1. ((3-(2-pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-p, P-disulfonic acid)) (Ferrozine)

شد. محلول حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی در دمای اتاق نگهداری شد سپس در طول موج ۵۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفتومتر قرائت گردید. مقدار تانن کل بر حسب میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم وزن تر معادل کاتچین بیان شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها و نرم‌افزارهای مورد استفاده

این پژوهش بصورت فاکتوریل (دو فاکتور هر کدام در دو سطح) در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار (هر تکرار شامل ۲۰ میوه) انجام شد. داده‌های حاصل با استفاده از نرم افزار آماری SAS نسخه ۹/٤ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و جهت مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده گردید. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel 2010 استفاده شد.

نتایج و بحث

میزان ترکیبات فنلی کل پوست و گوشت

نتایج تجزیه واریانس جدول ۱ بیانگر تفاوت معنی‌دار اثر ساده‌ی حلال، بخش و اثر متقابل حلال و بخش بر میزان فنل کل، فلاونوئید کل، ترکیبات غیر فلاونوئیدی کل، تانن کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در سطح احتمال ۱٪ می‌باشد.

جدول ۱- تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه

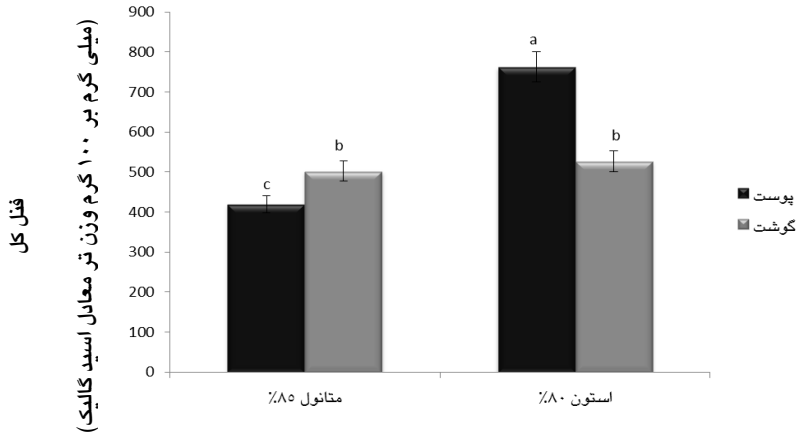
		میانگین مربعات						
						ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل		
منابع تغییر	درجه آزادی	فنل کل	فلاونوئید کل	غیر فلاونوئیدی کل	تانن کل	دی پی پی اچ	فرپ	شلاتینگ آهن
حلال	۱	۱۰۰۹۸٦/۱۷**	٤٥٦۳۳/۳۳**	۲۸۲۳۸۸/۹٥**	۲٤٤٦۲۲۷/۰۰**	٥٦۱/۷۲**	۰/۰۱٥**	۱۸٤/٥۰**
بخش	۱	۱۷۸۲٥/٥۲**	٥۱٤۸۳/۰۰**	۸۷۲۱/۰۲**	۱۲۷۷۲۰/۳۳**	۹٦۹/٥۲**	۰/۰۷۳**	۲۸۹۲/٦۱**
حلال × بخش	۱	٦٤۹۸۲/۱٦**	۳٤۲۹۳/٤۷**	۱۱۰۳۷۰/٤۹**	۹۱۳۸۳٥/۸۹**	۷۳۲/۸۰**	۰/۰۳۱**	۱۲۱۷/٤۹**
خطا	۸	۱٤۷۸/٤۱	۳٥۹/۹۸	۱۳۰۳/۹۱	٤۸۸۷/٦۷	۰/۳۱	۰/۰۰۱	۳۱/۹۱
ضریب تغییرات	-	٦/۹٦	٦/۱۲	۱٤/۸۷	۷/۷٥	۰/٦٥	۳/۳۳	۱٦/۷۲

** معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪

فنل کل

شکل ۱ مقایسه میانگین اثر متقابل حلال و بخش‌های مختلف میوه را بر میزان فنل کل حاصل از عصاره‌های متانولی و استونی در دو بخش پوست و گوشت میوه نشان می‌دهد. بیشترین میزان فنل کل در عصاره‌های استونی پوست به میزان ۷٦۲/٥۱ میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم وزن تر معادل اسید گالیک مشاهده گردید. در حالی‌که پایین‌ترین مقدار فنل کل در عصاره حاصل از پوست میوه با حلال متانول به‌دست آمد. در بررسی انجام شده توسط ممشلو و همکاران (۱۳۹۰) مقدار ترکیبات فنلی کل در دو عصاره‌ی استونی و متانولی ۸۰٪ به ترتیب برابر با ۷/٤۳۷ و ٥/۰۸٦ گرم در ۱۰۰ گرم ماده خشک معادل اسید گالیک بود. همچنین در طی مطالعه‌ی دیگری روی میوه ازگیل رقم استانبول محتوی فنل کل عصاره استخراجی با حلال استون ۸۰٪ به میزان ۹۸٥/۰۳ میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم وزن تر معادل اسید گالیک به‌دست آمد (ارکان و سلجوک ۲۰۱٥). در مطالعه انجام شده توسط آیاز و همکاران (۲۰۰۸) نیز غلظت فنل کل استخراجی با چهار حلال استون، متانول و اتانول ۸۰٪ و آب در سه دوره متفاوت پس از گل‌دهی مورد بررسی قرار گرفت. در بین حلال‌ها، استون بیشترین مقدار غلظت فنل کل عصاره استخراجی به میزان ۳٥۱/۷

میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم وزن تر معادل کاتچین را در ۲۱٤ روز بعد از تمام گل نشان داد. محتوی ترکیبات فنلی در ارقام مختلف متفاوت است و میزان ترکیبات فنلی کل به ژنوتیپ، شرایط محیطی و شرایط پس از برداشت بستگی دارد (کادیر و همکاران ۲۰۰۹). در مقایسه با مطالعات قبلی، در پژوهش حاضر میزان ترکیبات فنلی میوه ازگیل بالاتر بود. این نشان می‌دهد که ازگیل‌های موجود در جنگل‌های ارسباران، از ارزش آنتی‌اکسیدانی بالایی برخوردار هستند. بطور کلی نتایج نشان داد که پوست میوه ازگیل نسبت به گوشت آن از فنل کل بیشتری برخوردار بوده و حلال استون برای استخراج این ترکیب مناسب‌تر می‌باشد.



شکل ۱- مقایسه میانگین اثر متقابل حلال و بخش بر مقدار فنل کل میوه ازگیل

حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪

ترکیبات فلاونوئیدی کل و غیر فلاونوئیدی کل

شکل ۲ مقایسه میانگین اثر متقابل حلال و بخش‌های مختلف میوه را بر محتوی فلاونوئید کل حاصل از عصاره‌های متانولی و استونی در دو بخش پوست و گوشت نشان می‌دهد. بالاترین میزان فلاونوئید کل در عصاره متانولی پوست، به میزان ٤۱۵/۰۰ میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم وزن تر معادل کاتچین به‌دست آمد و عصاره حاصل از گوشت میوه با استفاده از حلال استون محتوی فلاونوئیدی پایین‌تری را نشان داد. نتایج یک مطالعه نشان داد که مقدار فلاونوئیدهای کل میوه رسیده ازگیل نسبت به ترکیبات فنلی کل آن کمتر و در حدود ٤٦/۳۳ میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم وزن تر کاتچین می‌باشد. در این مطالعه ترکیبات فنلی کل با حلال متانول و فلاونوئیدهای کل با اتانول بهتر استخراج شدند (قربانلی و همکاران ۱۳۸۸). در مطالعه‌ی که روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی میوه، پوست شاخه و برگ ازگیل وحشی در استان مازندران انجام گردید، مشخص شد که عصاره پوست شاخه و برگ، مقدار فلاونوئید و فنل کل بیشتری نسبت به میوه داشتند که مقدار فلاونوئید و فنل به‌دست آمده از میوه ازگیل به ترتیب ۱٤/۸۸ و ۲۹/۳۵ میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم وزن تر بود (نبوی و همکاران ۲۰۱۱). در مطالعه‌ای دیگر انجام شده در ترکیه، مشخص گردید که مقدار فلاونوئید کل میوه ازگیل ۲/۳۹ میلی‌گرم بر گرم معادل کوئرستین است (گلچین و همکاران ۲۰۱۱). همچنین در مطالعه دیگری بر روی میوه ازگیل رقم استانبول، محتوای فلاونوئید کل عصاره استونی ۱۰۸۵/٦۵ میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم وزن تر معادل کاتچین به‌دست آمد (ارکان و سلجوک ۲۰۱۵). فلاونوئیدها از طریق مهار عناصر کاتالیز شده از اکسیداسیون جلوگیری می‌کنند. از دیگر خواص این ترکیبات می‌توان به خاصیت جاروب کنندگی[1] آن‌ها

1. Scavenging

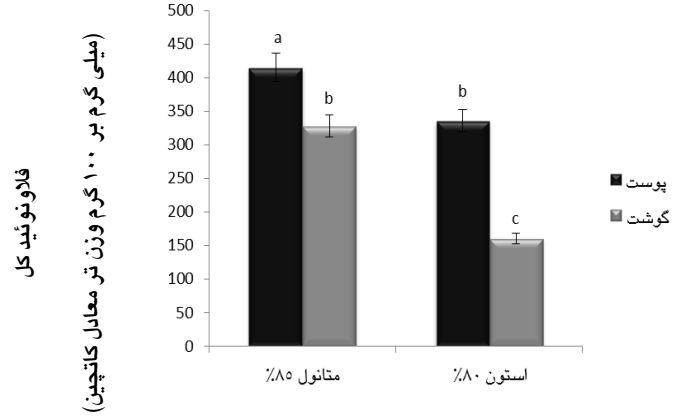
اشاره نمود (دو و همکاران ۲۰۰۹). با توجه به نتایج حاصل از پژوهش حاضر مشخص گردید که پوست میوه ازگیل نسبت به گوشت آن از فلاوئید کل بیشتری برخوردار بوده و حلال متانول برای استخراج این ترکیب مناسب‌تر می‌باشد.

شکل ۳ مقایسه میانگین اثر متقابل حلال و بخش‌های مختلف میوه را بر محتوی ترکیبات غیر فلاونوئیدی کل حاصل از عصاره‌های متانولی و استونی نشان می‌دهد. بالاترین میزان ترکیبات غیر فلاونوئیدی کل در عصاره استونی پوست، به میزان ٤٢٧/٠١ میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم وزن تر معادل کاتچین به‌دست آمد و عصاره حاصل از پوست میوه با استفاده از حلال متانول محتوی ترکیبات غیر فلاونوئیدی کل پایین‌تری (٤/٧٤ میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم وزن تر معادل کاتچین) را نشان داد. در تمامی عصاره‌ها محتوی فنل کل در مقایسه با ترکیبات غیر فلاونوئیدی کل غالب‌تر بود. ترکیبات غیر فلاونوئیدی در حلال استون نسبت به حلال متانول در در هر دو بخش پوست و گوشت در غلظت‌های بالاتری به‌دست آمدند. ترکیبات غیر فلاونوئیدی از قبیل اسید کلروژنیک، اسید کافئیک و غیره دارای خواص ضد سرطانی، ضد التهابی و ضد توموری می‌باشند و همچنین گزارش شده است که این ترکیبات دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی بوده و به عنوان یک آنتی‌اکسیدان غیرآنزیمی نقش مهمی در سمیت‌زدایی گونه‌های فعال اکسیژن دارند. علاوه بر این ترکیبات غیر فلاونوئیدی از اکسیداسیون LDL هم جلوگیری می‌کنند (باسی‌یلو و زاوالوس ۲۰۰۹). میزان ترکیبات غیر فلاونوئیدی کل در چهار میوه پرتقال، سیب، زردآلو و توت‌فرنگی به ترتیب ٥١٩، ١٧٨، ٢٤٦ و ١٦٠ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن تر معادل اسید گالیک توسط یوزلاک و همکاران (۲۰۰۹) گزارش شده است.

تانن کل

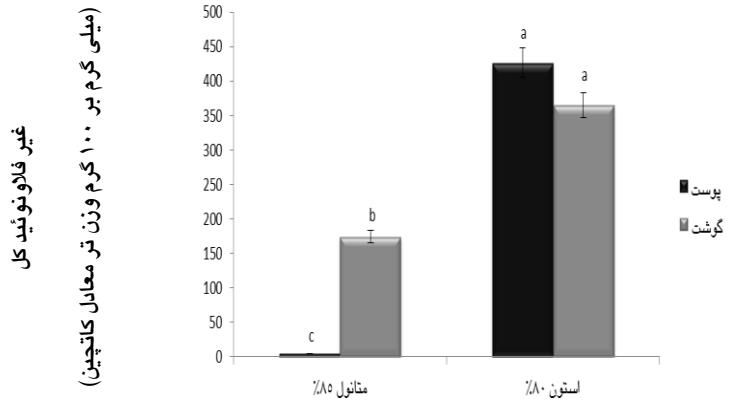
تانن‌ها پلی‌فنل‌های گیاهی دارای وزن مولکولی بالا می‌باشند که از لحاظ بیولوژیکی و شیمیایی به دو گروه تانن‌های متراکم یا پروآنتوسیانیدین‌ها و تانن‌های قابل هیدرولیز یا الاژی تانن‌ها تقسیم می‌شوند. تانن‌ها از رشد سلول‌های سرطانی در شرایط درون شیشه‌ای و برون شیشه‌ای جلوگیری می‌کنند (سرام و همکاران ۲۰۰۵).

استونی حاصل از هر دو بخش میوه کمترین میزان تانن کل را داشتند. ارکان و سلجوک (۲۰۱۵) میزان تانن کل عصاره استونی میوه ازگیل رقم استانبول را ۱۳۸۵/۸۷ میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم وزن تر معادل کاتچین گزارش کرده‌اند. میزان تانن کل به عوامل مختلفی از جمله شرایط آب و هوایی، شرایط تغذیه‌ای، گونه، رقم و روش استخراج بستگی دارد. شواهد نشان می‌دهد تانن‌ها و پلی‌فنل‌ها دارای اثرات ضد دیابتی، ضد موتاژنی و آنتی‌اکسیدانی نیز هستند (کینگ و همکاران ۱۹۹۸). به‌طور کلی گوشت میوه ازگیل نسبت به پوست آن از تانن کل بیشتری برخوردار بوده و حلال متانول برای استخراج این ترکیب مناسب‌تر می‌باشد.



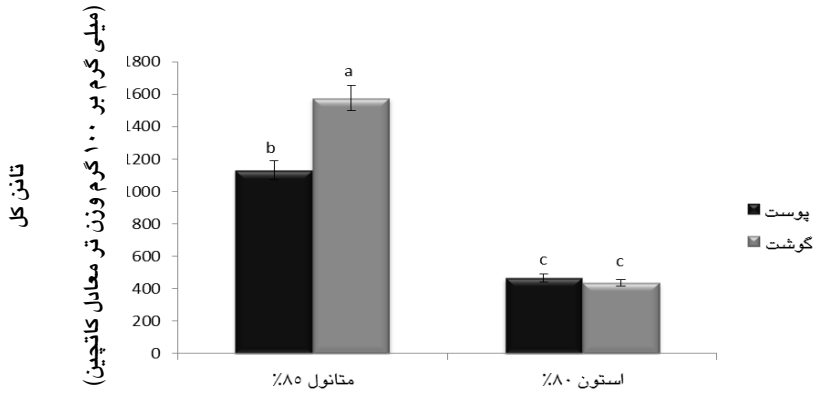
شکل ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل حلال و بخش بر مقدار فلاونوئید کل میوه ازگیل

حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل حلال و بخش بر مقدار غیر فلاونوئید کل میوه ازگیل

حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪



شکل ۴- مقایسه میانگین اثر متقابل حلال و بخش بر مقدار تانن کل میوه ازگیل

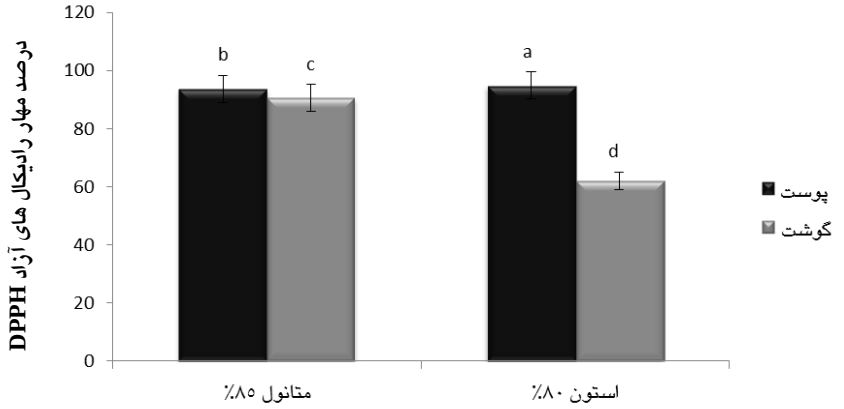
حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪

شکل ٤ مقایسه میانگین اثر متقابل حلال و بخش‌های مختلف میوه را بر میزان تانن کل حاصل از عصاره‌های متانولی و استونی در دو بخش پوست و گوشت نشان می‌دهد. نتایج حاصله نشان داد که عصاره متانولی گوشت میوه بیشترین میزان تانن کل ۱۵۷۵/۳۳ میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم وزن تر معادل کاتچین و عصاره‌های استونی حاصل از هر دو بخش میوه کمترین میزان تانن کل را داشتند. ارکان و سلجوک (۲۰۱۵) میزان تانن کل عصاره استونی میوه ازگیل رقم استانبول را ۱۳۸۵/۸۷ میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم وزن تر معادل کاتچین گزارش کرده‌اند. میزان تانن کل به عوامل مختلفی از جمله شرایط آب و هوایی، شرایط تغذیه‌ای، گونه، رقم و روش استخراج بستگی دارد. شواهد نشان می‌دهد تانن‌ها و پلی‌فنل‌ها دارای اثرات ضد دیابتی، ضد موتاژنی و آنتی‌اکسیدانی نیز هستند (کینگ و همکاران ۱۹۹۸). به‌طور کلی گوشت میوه ازگیل نسبت به پوست آن از تانن کل بیشتری برخوردار بوده و حلال متانول برای استخراج این ترکیب مناسب‌تر می‌باشد.

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل

روش دی پی پی اچ (DPPH)

افزایش توجه به غذا درمانی و غذاهای با خواص درمانی و دارویی منجر به شروع اصلاح گیاهان برای انتخاب و استفاده از حلال‌های استخراج جهت تولید محصولات با میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی بیشتر شده است (کاوالوس و همکاران ۲۰۰٦). مقایسه میانگین اثر متقابل حلال و بخش‌های مختلف میوه بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی حاصل از عصاره‌های متانولی و استونی در دو بخش پوست و گوشت به روش دی پی پی اچ (DPPH) در شکل ٥ نشان داده شده است. بر اساس نتایج حاصله، میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در عصاره‌های استونی پوست، متانولی پوست، متانولی گوشت و استونی گوشت به ترتیب به میزان ۹٤/۸۷٪، ۹۳٪/٦٤، ۹۰٪/۵۸ و ٦۱/۹۸٪ به‌دست آمد. در مطالعه‌ی فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش دی پی پی اچ در ژنوتیپ‌های وحشی ازگیل مورد بررسی قرار گرفت، نتایج نشان داد که محدوده ظرفیت آنتی‌اکسیدانی میوه ازگیل بین ۲۲/۳ تا ۵۷/۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر وزن تر متغیر بود (ارسیس لی و همکاران ۲۰۱۲). همچنین در مطالعه‌ی دیگر روی میوه ازگیل مشخص شد که میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به روش دی پی پی اچ، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد (راپ و همکاران ۲۰۱۱). در پژوهشی دیگر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره استونی میوه ازگیل به روش دی پی پی اچ براساس مقدار EC_{50}، ٤/۳۳ میلی‌گرم عصاره در میلی‌گرم وزن تر مشاهده شد (ارکان و سلجوک ۲۰۱۵). وجود این تفاوت‌ها بین پوست و گوشت از نظر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نشان دهنده تأثیر ژنتیک و محیط در سنتز این ترکیبات می‌باشد و در واقع می‌توان گفت که سنتز و تجمع این ترکیبات در بافت‌های مختلف میوه متفاوت است. دلیل مغایر بودن برخی از نتایج ظرفیت آنتی‌اکسیدانی میوه ازگیل در پژوهش حاضر با مطالعات ذکر شده، می‌تواند نمونه متفاوت و شرایط محیطی متفاوت منطقه مورد مطالعه باشد. مطالعه‌ای دیگری روی خصوصیات آنتی‌اکسیدانی و میزان ترکیبات فنلی کل میوه ازگیل انجام گردید، نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد که ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل تعیین شده به روش DPPH (در عصاره‌های متانولی، استونی و اتانولی ۸۰٪) میوه ازگیل براساس مقادیر EC_{50}، به ترتیب ۲۰۵/۹٦۵، ۱٤٦/٤۳۹ و ۳٤۷/٤۳۷ میکروگرم عصاره در میلی‌لیتر می‌باشد (ممشلو و همکاران، ۱۳۹۰). هر چقدر عدد به‌دست آمده براساس مقادیر EC_{50} کوچک‌تر باشد یعنی آن عصاره فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری دارد. به‌طور کلی در پژوهش حاضر، میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به روش دی پی پی اچ (DPPH) در بخش پوست میوه نسبت به گوشت آن بیشتر بوده و حلال استون برای برآورد ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به‌وسیله این روش مناسب‌تر می‌باشد.

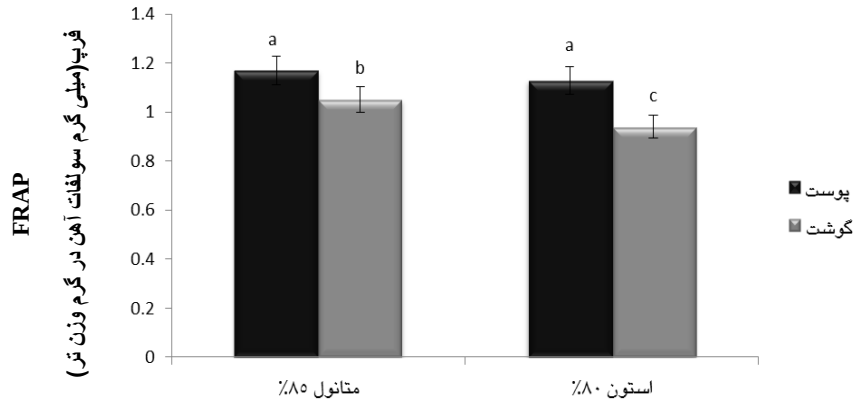


شکل ۵- مقایسه میانگین اثر متقابل حلال و بخش به روش DPPH در میوه ازگیل

حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪

روش فرپ (FRAP)

شکل ٦ مقایسه میانگین اثر متقابل حلال و بخش‌های مختلف میوه را بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی حاصل از عصاره‌های متانولی و استونی در دو بخش پوست و گوشت به روش فرپ (FRAP) نشان می‌دهد. بالاترین میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل به روش فرپ در عصاره متانولی پوست به میزان ۱/۱۷ میلی‌گرم سولفات آهن در گرم وزن تر مشاهده گردید. بخش پوست نسبت به گوشت میوه از میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری بر اساس روش فرپ برخوردار بود ولی اختلاف معنی‌داری بین دوحلال متانول و استون در سطح احتمال ۵٪ در پوست میوه مشاهده نشد. تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به دو روش فرپ و شلاتینگ آهن در پنج بخش ریشه، ساقه، برگ، گل و غلاف میوه گیاه *Adenocarpus complicatus* نشان داد که عصاره متانولی غلاف میوه بالاترین مقدار ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به ترتیب به میزان ۸۷۱/۲۵ میکروگرم سولفات آهن در میلی‌لیتر و ۸۳/٦۰٪ را دارا می‌باشد (بربر و همکاران ۲۰۱٤). همچنین جووانا و همکاران (۲۰۱۳) میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را به روش فرپ در عصاره متانولی چای سبز، چای سیاه، برگ و میوه چای به ترتیب ۱/۸۲۵، ۰/۷۸۸، ۱/۷۲۵ و ۱/۱۲۱ مول بر کیلوگرم گزارش کرده‌اند. محدوده ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به روش فرپ بین ۵/۲۹ تا ۱۰/۸۰ میلی‌مولار آسکوربیک اسید در عصاره متانولی میوه انگور توسط آنیس و همکاران (۲۰۰۲) نیز گزارش شده است.

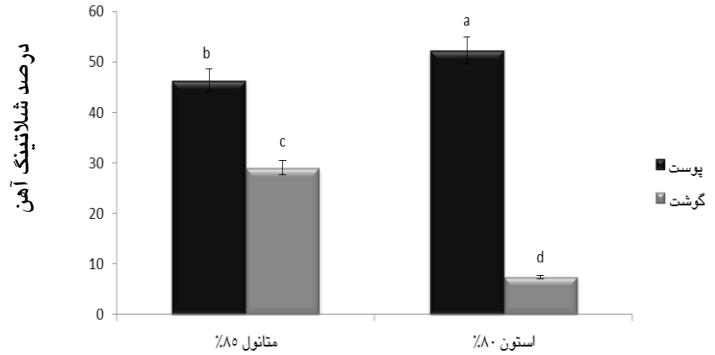


شکل ۶- مقایسه میانگین اثر متقابل حلال و بخش به روش FRAP در میوه ازگیل

حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪

روش شلاتینگ آهن (Fe^{2+}chelating)

براساس نتایج مقایسه میانگین در شکل ۷ بالاترین میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل بر اساس روش شلاتینگ آهن مربوط به عصاره استونی پوست ۵۲٪/۳۱ و پایین‌ترین مقدار آن مربوط به عصاره استونی گوشت میوه ۷/٤۱٪ می‌باشد. محتوی پلی‌فنل و خواص آنتی‌اکسیدانی میوه ازگیل با سه روش دی پی پی اچ، فرپ و شلاتینگ آهن توسط گلچین و همکاران (۲۰۱۱) با حلال اتانول ۵۰٪ مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج آن‌ها در این سه روش به ترتیب برابر با ۰/٦۲، ۰/۳٦ و ۲/۷٦ میکرومول در گرم وزن تر معادل ترولوکس به‌دست آمد. تعیین میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به روش شلاتینگ آهن در میوه آواکادو، انبه، پاپایا و کیوی‌فروت در سه بخش پوست، گوشت و بذر با حلال اتانول ۵۰٪ مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در بخش پوست همه میوه‌ها درصد شلاتینگ آهن نسبت به بخش گوشت و بذر بالاتر بود. بالاترین میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به روش شلاتینگ آهن در پوست میوه پاپایا به میزان ٤۸٪ به‌دست آمد (ماتسوساکا و کاواباتا ۲۰۱۰). با توجه به نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر به نظر می‌رسد که روش‌های دی پی پی اچ و شلاتینگ آهن جهت برآورد ظرفیت و توانایی آنتی‌اکسیدانی در بخش پوست میوه ازگیل روش‌های مناسب‌تری باشند. همچنین بر اساس این مطالعه حلال استون، حلال مناسبی برای استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی می‌باشد.



شکل ۷- مقایسه میانگین اثر متقابل حلال و بخش به روش Chelating در میوه ازگیل
حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪

شاخص ترکیبی آنتی‌اکسیدان

شاخص ترکیبی آنتی‌اکسیدان همراه با نتایج حاصل از آنالیز ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل به سه روش در جدول ۲ آورده شده است. بالاترین میزان شاخص ترکیبی آنتی‌اکسیدان به ترتیب در عصاره استونی پوست ۹۸/۸٦ و متانولی پوست ۹۵/۷٤ مشاهده شد که مطابق با محتویات بالای فنل کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل به روش دی پی پی اچ (DPPH) و شلاتینگ آهن (Fe^{2+}chelating) در عصاره استونی پوست می‌باشد. آنتی‌اکسیدان به ترکیباتی اطلاق می شود که قادر به حفظ سیستم‌های بیولوژیکی در برابر اثرات مضر گونه های فعال اکسیژن و نیتروژن هستند. در واقع آنتی‌اکسیدان‌ها نقش مهمی درمهار گونه های فعال اکسیژن و نیتروژن و جلوگیری از تشکیل آن‌ها ایفا می‌کنند. اهمیت زیاد آنتی‌اکسیدان‌ها در علوم مختلف بیولوژی، پزشکی، تغذیه و کشاورزی نیاز به وجود یک روش ساده، آسان و معتبر برای اندازه گیری شاخص ترکیبی آنتی‌اکسیدانی را ایجاد کرده است. مزیت بزرگ شاخص ترکیبی، برآورد ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تمامی آنتی‌اکسیدان های موجود در یک نمونه بیولوژیکی

می‌باشد. جووانا و همکاران (۲۰۱۳) ظرفیت آنتی‌اکسیدانی با پنج روش DPPH، ABTS، FRAP، RP و Q_{600} در چای سبز، چای سیاه، برگ و میوه چای رشد یافته در صربستان را مورد بررسی قرار دادند. نتایج آن‌ها نشان داد بالاترین میزان شاخص ترکیبی آنتی‌اکسیدان حاصل از پنج روش فوق ذکر در میوه چای و به میزان ۹۲/۰۰ به‌دست آمد. همچنین شاخص ترکیبی آنتی‌اکسیدان حاصل از دو روش DPPH و ABTS در میوه‌های خشک آلو، زردآلو، انجیر و انگور به ترتیب به میزان ۱۸/۳۸، ۱۰/۴۹، ۳/۷۰ و ۱۱/۱۷ گزارش شده است (میل تیک و همکاران ۲۰۱۴). شاخص ترکیبی آنتی‌اکسیدان به‌دست آمده با دو حلال متانول و استون در پژوهش حاضر نسبت به مطالعات صورت گرفته بیشتر می‌باشد. بنابراین می‌توان گفت که ژنوتیپ‌های ازگیل موجود در جنگل‌های ارسباران به‌عنوان منبع غنی از ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدانی به شمارمی‌روند.

جدول ۲- شاخص ترکیبی حاصل از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل به سه روش

نوع عصاره	دی پی پی اچ (٪)	فرپ (میلی‌گرم سولفات آهن درگرم وزن تر)	شلاتینگ آهن (٪)	شاخص ترکیبی آنتی‌اکسیدان
متانولی پوست	۹۸/۷۰	۱۰۰	۸۸/۵۱	۹۵/۷۴
متانولی گوشت	۹۵/۴۸	۸۹/۷۴	۵۵/۶۳	۸۰/۲۸
استونی پوست	۱۰۰	۹۶/۵۸	۱۰۰	۹۸/۸۶
استونی گوشت	۶۵/۳۳	۸۰/۳۴	۱۴/۱۶	۵۳/۲۸

نتیجه‌گیری

نتایج به‌دست آمده در این پژوهش نشان داد که میوه ازگیل به واسطه‌ی داشتن مقادیر زیادی از ترکیبات فنلی دارای پتانسیل آنتی‌اکسیدانی بالایی می‌باشد که میزان این ترکیبات بسته به نوع بخش میوه و حلال مورد استفاده متفاوت می‌باشد. در رابطه با بخش‌های مورد مطالعه میوه در حلال‌های متفاوت، عصاره حاصل از پوست میوه با حلال استون ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری را دارا می‌باشد و به‌طور کلی مقدار ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در بخش پوست نسبت به گوشت میوه بیشتر بود. گیاهان حاوی ترکیبات متعددی هستند که ساختارهای متفاوتی دارند. استخراج این ترکیبات به عوامل متعددی بستگی دارد که مهم‌ترین آن‌ها حلال و روش استخراج می‌باشند. انتخاب حلال و روش استخراج بستگی به قسمت های مختلف یک گیاه و نیز مواد متشکله آن دارد. در این پژوهش، فنل کل با حلال استون، فلاونوئید کل و تانن کل نیز با حلال متانول بهتر استخراج شدند که اختلاف بین دوحلال متانول و استون در استخراج ترکیبات صورت گرفته می‌تواند متأثر از موارد ذکر شده باشد.

منابع مورد استفاده

خاتمساز م، ۱۳۷۱. فلور ایران، تیره گل سرخ. موسسه تحقیقات جنگل ها و مراتع کشور، ۳۵۲ صفحه.

زرگری ع، ۱۳۷۵. گیاهان دارویی. موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران، ۹۷۶ صفحه.

قربانلی م، لیوانی ف و ساطعی ا، ۱۳۸۸، فعالیت آنتی اکسیدانی و ترکیبات فنلی میوه رسیده ازگیل، فصلنامه شناخت و کاربرد گیاهان دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، سال دوم، ۲، ۳۱-۴۳.

قهرمان ا، ۱۳۸٦. گیاه شناسی پایه، تشریح و ریخت شناسی. مؤسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران، ٤۹۲ صفحه.

گوهری غ، صفایی ف، رسولی ف، اعظمی م و داوتی کاظم نیا ح، ۱۳۹۷. ارزیابی اثرات محلول پاشی اسید سالسیلیک بر فعالیت برخی ترکیبات آنتی اکسیدانی انگور رقم شاهان (*Vitis Vinifera* L. cv Shahani)، پژوهش‌های صنایع غذایی (دانش کشاورزی)، ۲۸ (۲)، ۱٤۹-۱۵۹.

مظفریان و، ۱۳۸۳. درختان و درختچه‌های ایران. فرهنگ معاصر تهران، ۱۰۰۳ صفحه.

ممشلو س، صادقی ماهونک ع، قربانی م، اعلمی م و خمیری م، ۱۳۹۰، بررسی ویژگی‌های آنتی اکسیدانی عصاره‌های فنلی حاصل از میوه ازگیل، مجموعه مقالات اولین کنگره ملی علوم و فناوریهای نوین کشاورزی، دانشگاه زنجان، ٥٤-٥۹.

نیک‌جو ن و همتی خ، ۱۳۹۲، مقایسه برخی ترکیبات ثانویه میوه نارس، رسیده و بذر ازگیل، مجموعه مقالات اولین همایش منطقه‌ای گیاهان دارویی شمال کشور، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ۵۵-٦۰.

Anis A, Dimitris P, Makris B and Panagiotis K, 2002. Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. Journal of Food Composition and Analysis 15: 655-665.

Ayaz FA, Demir O, Torum H, Kolcuglu Y and Colak A, 2008. Characterization of polyphenoloxidase (PPO) and total phenolic contents in medlar (*Mespilus germanica* L.) fruit during ripening and over ripening. Food Chemistry 106: 291-298.

Basilio HJ and Cisneros Zavallos L, 2009. The effects of exogenous ethylene and methyl jasmonate on the accumulation of phenolic antioxidants in selected whole and wounded fresh produce. Food Chemistry 115(4): 489-495.

Benzic FF and Strain JJ, 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power, the FRAP assay. Analytical Biochemistry 239: 70-76.

Berber N, Zengin G, Aktumsek A, Sanda M and Uysal T, 2013. Antioxidant capacity and fatty acid composition of different parts of *Adenocarpus complicatus* (Fabaceae) from Turkey. International Journal of Tropical Biology 62(1): 337-346.

Bibalani GH and Mosazadeh F, 2012. Medicinal benefits and usage of medlar (*Mespilus germanica* L.) in Gilan Province (Roudsar District), Iran. Journal of Medicinal Plants Reaserch 6(7): 1155-1159.

Broadhurst RB and Jones WT, 1978. Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. Journal of the Science of Food and Agriculture 29: 788-794.

Cavallos Casals BA, Byrne D, Okie WR and Cisneros Zevallos L, 2006. Selecting new peach and plum genotypes rich phenolic compounds and enhanced functional properties. Food Chemistry 96: 273-280.

Dinis TCP, Madeira VMC and Almeida LM, 1994. Action of phenolic derivatives as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers. Archives of Biochemistry and Biophysics 315: 161-169.

Du G, Li M, Ma F and Liang D, 2009. Antioxidant capacity and the relationship with polyphenol and vitamin C in *Actinidia* fruits. Food Chemistry 113: 557-562.

Ercisli S, Sengul M, Yildiz H, Sener D, Duralija B, Voca S and Dujmovic Purgar D, 2012. Phytochemical and antioxidant characteristics of medlar fruits (*Mespilus germanica* L.). Journal of Applied Botany and Food Quality 85: 86-90.

Erkan M and Selcuk N, 2015. The effects of 1-MCP treatment on fruit quality of medlar fruit (*Mespilus germanica* L. cv. Istanbul) during long term storage in the palliflex storage system. Postharvest Biology and Technology 100: 81–90.

Gruz J, Ayaz FA, Torun H and Strand M, 2011. Phenolic acid content and radical scavenging activity of extracts from medlar (*Mespilus germanica* L.) fruit at different stages of ripening. Food Chemistry 124: 271-277.

Gulcin I, Topal F, Sarikaya SB, Bursal E, Bilsel G and Goren AC, 2011. Polyphenol contents and antioxidant properties of medlar (*Mespilus germanica* L.). Records of Natural Products 5(3): 158-175.

Hassanpour H and Alizadeh S, 2016. Evaluation of phenolic compound, antioxidant activities and antioxidant enzymes of barberry genotypes in Iran. Scientia Horticulturae 200: 125–130.

Hayouni A, Abedrabba M, Bouix M and Hamdi M, 2007. The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercuscoccifera* L. and *Juniperusphoenicea* L. fruit extracts. Food Chemistry 105:1126–1134.

Jovana N, Aleksandra N, Snezana S, Gordana S, Biljana M, Dalibor M, Milan B and Jelena M, 2013. Evaluation of individual phenolic compounds and antioxidant properties of black, green, herbal and fruit tea infusions consumed in Serbia: spectrophotometrical and electrochemical approaches. Journal of Food and Nutrition Research 52(1): 12-24.

Kadir UY, Sezai E, Yasar Z, Memnune S and Ebru YK, 2009. Preliminary characterisation of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) genotypes for their physicochemical properties. Food Chemistry 114: 408-412.

Khoshbakht K and Hammer K, 2005. Notes on neglected and underutilized crops. Genetic Resources and Crop Evolution 52: 249–265.

King TCh, Tit YW, Cheng IW, Yao WH and Yuan Lin, 1998. Tannins and human health. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 38(6): 421-464.

Matsusaka Y and Kawabata J, 2010. Evaluation of antioxidant capacity of non-edible parts of some selected tropical fruits. Food Science Technology Reaserch 16(5): 467-472.

Miletic N, Branko P, Olga M, Miodrag K and Aleksandra L, 2014. Phenolic compounds and antioxidant capacity of dried and candied fruits commonly consumed in Serbia. Journal Food Science 32(4): 360-368.

Nabavi SF, Nabavi SM, Ebrahimzadeh MA and Asgarirad H, 2011. The antioxidant activity of wild medlar (*Mespilus germanica* L.) fruit, stem bark and leaf. African Journal of Biotechnology 10(2): 283-289.

Nakajima JI, Tanaka I, Seo S, Yamazaki M and Saito K, 2004. LC/PDA/ESI- MS profiling and radical scavenging activity of anthocyanins in various berries. Journal Biomedicine and Biotechnology 5: 241–247.

Rop O, Sochor J, Jurikova T, Zitka O, Skutkova H, Mlcek J, Salas P, Krska B, Babula P, Adam V, Kramarova D, Boklova M, Provaznik I and Kizek R, 2011. Effect of five different stages of ripening on chemical compounds in medlar (*Mespilus germanica* L.). Molecules 16:74-91.

Seeram NP, Adams LS, Henning SM, Niu Y, Zhang Y, Nair MG and Heber D, 2005. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. The Journal of Nutrition Biochemical 16: 360-367.

Seeram NP, Aviram M, Zhang Y, Henning S M, Feng L, Dreher M and Heber D, 2008. Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States. Journal of Agricultural and Food Chemistry 56: 1415–1422.

Shin SW, Ghimeray AK and Park CH, 2014. Investigation of total phenolic, total flavonoid, antioxidant and allyl isothiocyanate content in the different organs of *wasabi japonica* grown in an organic system. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines 3(11): 38-45.

Uzelac V, Kovacevic D, Levaj B, Pedisic S, Mezak M and Tomljenovic A, 2009. Polyphenols and antioxidant capacity in fruits and vegetables common in the Croatian Diet. Agriculturae Conspectus Scientificus 74(3): 175-179.

Evaluation of compounds containing antioxidant activity in peel and pulp of medlar fruit by methanol and acetone extracts

B Ayobnezhadghan Jermi[1*] and H Hassanpour[2]

Received: April 24, 2017 Accepted: March 5, 2018
[1]MSc Graduated, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
[2]Associate Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
[*]Corresponding author: Email: bashir.urmia@gmail.com

Abstract

Medlar **(***Mespilus germanica* L**)** grows wildly in East Azerbaijan province (Arasbaran). Unfortunately, a few studies have been done on medlar in this area, except in limited cases. This research was conducted based on factorial experiment in completely randomized design with three replications. In this research, the phenolic compounds and antioxidant activity of the peel and pulp of medlar fruit were measured. Also, the extraction solvents were methanol (85%) and acetone (80%). The results showed that the methanolic extracts had the highest total flavonoid (415.00 and 327.83 mg CE.100g FW) and total tannin (1132.67 and 1575.33 mg CE.100g FW) in the both of peel and pulp, respectively. Also, the peel antioxidant activity using FRAP method in methanol and acetone solvents was 1.17 and 1.13 mg $Fe_2(SO_4)$g FW, respectively, which showed no significant difference at 5% probability level. The highest total phenol (762.51 and 526.12 mg GAE.100g FW) total non-flavonoid (427.01 and 365.46 mg CE.100g FW) in the both of peel and pulp and antioxidant activity based on DPPH and Fe^{2+}chelating methods (94.87% and 52.31%) and antioxidant composite index in the peel of fruit (98.86) was obtained in acetonic extracts. In general, the results indicated that medlar fruit are a potential source of natural antioxidants in the part of peel and pulp, and acetone is the best solvent for the extraction of compounds containing antioxidant activity.

Key words: Arasbaran, Composite index, Flavonoid, Phenolic compounds, Solvent