مهندسی بیوسیستم ایران، دورۀ ۴۶، شمارۀ ۱، بهار ۱۳۹۴ (ص ۷-۱)

استخراج و شناسایی ترکیبات فیتواستروژنی، الاجیک، و سیرینژیک اسید از پوست انار

رحمت‌اله زارع‌زاده مهریزی[۱]، زهرا امام‌جمعه[۲*]، کرامت‌اله رضایی[۳]، محمد شاهدی باغ‌خندان[۴]، جواد کرامت[۵]، الهه لونی[۶]

۱.کارشناس ارشد دانشگاه صنعتی اصفهان، ۲.استاد دانشگاه تهران، ۳. استاد دانشگاه تهران، ۴. استاد دانشگاه صنعتی اصفهان، ۵. دانشیار دانشگاه صنعتی اصفهان،۶. کارشناس دانشگاه تهران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۴- تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۹/۸)

چکیده

در این تحقیق از پوست تازۀ سه رقم انار معروف ایرانی توسط چهار حلال متفاوت به روش سوکسله عصاره‌گیری شد. عصاره‌ها برای تشخیص کمّی و کیفی دو نوع تانیک‌اسید و هفت نوع فیتواستروژن به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) جفت‌شده با شناساگر مرئی-فرابنفش (UV-Vis) تزریق شدند. همچنین در پژوهش انجام‌شده راندمان استخراج از پوست سه رقم انار و چهار حلال با یکدیگر مقایسه شدند. کمّیت و کیفیت ترکیبات بررسی‌شده در عصاره‌ها ازطریق مقایسۀ زمان بازداری استانداردهای متناظر ترکیبات و با روش تزریق استاندارد خارجی به دستگاه مشخص شدند. نتایج آزمایش‌ها نشان داد در میان حلال‌ها مخلوط مساوی از چهار حلال آب، اتانول، استون، و اتیل‌استات و در بین ارقام انار رقم پوست‌گلی ملس ساوه بیشترین میانگین راندمان استخراج را داشته‌اند. نتایج آزمایش‌های دستگاه کروماتوگرافی بیانگر این است که در بین هفت فیتواستروژن فقط سه فیتواستروژن استریول (تا ۷/۴۵ میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم پوست تازه)، تستسترون، و استرادیول (تا ۸/۴۳ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم پوست تازه) در مقدار قابل قبول تقریباً در تمامی نمونه‌ها شناسایی شدند. در بین دو نوع تانیک‌اسید، الاجیک‌اسید در کمیّتی بسیار بالا (تا ۱۰۳/۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم پوست تازه)، و در تمامی عصاره‌ها و سیرینژیک‌اسید نیز در اغلب نمونه‌ها شناسایی شدند.

کلیدواژگان: استریول، استون، الاجی‌تانن، سوکسله، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا.

مقدمه

میوۀ انار از قدیمی‌ترین میوه‌های خوراکی دنیا و درخت آن بومی فلات ایران بوده است که هم‌اکنون در سطح وسیعی در ایران و کشورهای دیگر مانند هند، افغانستان، چین، ژاپن، ترکیه، روسیه، آمریکا و کشورهای حوزۀ مدیترانه کشت می‌شود (Fadavi *et al*., 2006). مصرف انار به شکل تازه‌خوری و نیز فرایندشدۀ قسمت‌های خوراکی میوۀ آن همچون آب انار، کنسانتره، مربا، ژله، رب، و مانند اینها مرسوم است (Hodgson, 1971). بخش عظیمی از ضایعات کارخانه‌های فرایند میوۀ انار را پوست میوه تشکیل می‌دهد که بسته به رقم آن از۳۰ تا ۶۰درصد متغیر است (Zarezadeh, 2008). در مطالعات اخیر (Kim *et al*., 2002; Singh *et al*., 2002;Guo *et al*., 2003; Negi *et al*., 2003; Seeram. *et al*., 2005-b; Cam &Hisil, 2010) ثابت شده است که پوست انار شامل تانن‌ها و ترکیبات پلی‌فنولیکی است، فعالیت ضداکسیدانی، ضدسرطانی، و ضدجهش‌زایی بسیار قوی دارد و در فرمولاسیون مواد آرایشی و دارویی استفاده می‌شود. از این رو استفادۀ بهینه از پوست انار به‌عنوان بخش مهمی از ضایعات کارخانه بایستی مورد توجه جدی صنعت و دانشگاه قرار گیرد. در این تحقیق ثابت شد که عصارۀ پوست انار شامل برخی فیتواستروژن‌ها و مشتقات الاجی‌تانن‌هاست. ترکیبات فیتواستروژنی متابولیت‌های ثانویۀ گیاهی هستند که خصوصیاتی شبه‌استروژنی دارند و بروز سرطان‌های وابسته به هورمون استروئیدی چون سرطان سینه، پروستات، و سرطان انتهای رودۀ بزرگ (کولن) را کاهش می‌دهند (Wu *et al*.,2004).تانن‌های قابل هیدرولیز الاجی‌تانن‌ها نامیده می‌شوند که از گروه پلی‌فنول‌ها و دلیل اصلی خصوصیات ضداکسیدانی و ضدجهش‌زایی در میوۀ انار هستند (Seeram, *et al*., 2005-a). از مشتقات الاجی‌تانن‌ها می‌توان الاجیک و سیرینژیک‌اسید را نام برد. ظرفیت بالای ضداکسیدانی میوه و پوست انار در پژوهش‌های زیادی گزارش شده است.

بررسی تحقیقات انجام‌شده در این زمینه نشان می‌دهد که تانیک‌اسیدها به‌ویژه الاجیک‌اسید به میزان فراوانی در عصارۀ پوست انار وجود دارد (Kulkarni &Aradhya., 2004) اما مرور کارهای تحقیقاتی گذشته نشان می‌دهد که فقط تحقیق حاضر و تحقیق Elswijk *et al*.,(2004) روی پوست انار، مواردی هستند

* نویسندۀ مسئول: emamj@ut.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

که وجود فیتواستروژن‌ها را در پوست انار نشان می‌دهند. البته فیتواستروژن‌ها در روغن دانه و بخش‌های دیگر انار در برخی تحقیقات گزارش شده‌اند (Dean *et al*., 1971; Moneam *et al*., 1988; Abd El Wahab *et al*., 1998; Lau *et al*., 2003). تحقیقی نیز منحصراً به بررسی امکان وجود فیتواستروژن‌ها در میوهٔ انار پرداخته و نتایج آزمایش‌های آن، امکان وجود ترکیبات فیتواستروژنی در میوهٔ انار را رد کرده است (Choi *et al*., 2006). با توجه به مطالب فوق اهداف کلی تحقیق حاضر را می‌توان در چهار بخش خلاصه کرد:

الف) استخراج عصارهٔ پوست انار با حلال‌های گوناگون با دستگاه سوکسله (Soxhelt Apparatus) و مقایسهٔ راندمان استخراج‌ها.

ب) اثبات وجود ترکیبات فیتواستروژنی در عصارهٔ پوست انار.

ج) توسعهٔ روشی مناسب برای جداسازی و شناسایی ترکیبات فیتواستروژنی و الاجی‌تانن‌های موجود در پوست انار با دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و شناساگر مرئی-فرابنفش.

د) مقایسهٔ عصاره‌های به‌دست‌آمده از حلال‌ها و ارقام متفاوت انار ازنظر مقدار ترکیبات شناسایی‌شده.

مواد و روش‌ها

در تحقیق حاضر سه رقم انار معروف ایرانی که ازنظر رنگ، ضخامت، و خصوصیات فیزیکی دیگر پوست تفاوت داشتند، انتخاب و از پوست آن‌ها توسط حلال‌های آلی ازقبیل اتانول، اتیل‌استات، استون، و مخلوط مساوی از چهار حلال آب:اتانول:استون:اتیل استات به روش سوکسله عصاره‌گیری شد. در انتخاب حلال‌ها سعی شد تا حلال‌ها، قطبیت و خواص فیزیکوشیمیایی متفاوتی متناسب با نوع ترکیبات استخراج‌شده، داشته باشند. ضمن آنکه در بین آن‌ها حلال‌هایی با درجهٔ خوراکی مثل آب نیز وجود داشت.

مواد شیمیایی

استاندارد هفت فلاونوئید فیتواستروژنی شامل کمپفرول (Kaempferol)، استریول (Estriol)، استرون (Estrone)، لوتئولین (Luteolin)، تستسترون (Testosterone)، آلفا استرادیول (α-Estradiol)، استیگما استرول (Stigmastrol)، و همچنین استانداردهای الاجیک و سیرینژیک‌اسید (ellagic and syringic acid) از شرکت سیگما آلدریچ (Sigma Aldrich) و با درجهٔ کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا تهیه شدند. حلال‌های آلی استفاده‌شده در این تحقیق ازقبیل متانول (Methanol)، اتانول (Ethanol)، اتیل‌استات (Ethel acetate)، استون (Acetone)، و آب یون‌زدوده (Deionized Water) با درجهٔ کروماتوگرافی از شرکت مرک آلمان (Merck Chemical Company) سفارش داده شدند. بقیهٔ مواد شیمیایی با درجهٔ آزمایشگاهی از شرکت مرک و گاز نیتروژن از شرکت داگا (Daga) در ایران تهیه شد.

آماده‌سازی نمونه‌های پوست انار برای استخراج با حلال

سه رقم انار معروف ایرانی که مصرف آن‌ها متداول‌تر و پوست آن‌ها ازنظر ظاهری بیشترین تفاوت را داشت از مجموعهٔ انار مرکز تحقیقات کشاورزی ساوه، انتخاب شدند (انار شیرین پوست‌سیاه و ضخیم اردستان، انار ملس پوست‌گلی ساوه، و انار پوست‌سفید راور کرمان). از هر رقم به میزان ۲۰ کیلوگرم از میوه‌های رسیده و سالم چیده شد. انارها در همان روز به آزمایشگاه منتقل و میوه‌های آفتاب‌سوخته، ترک‌خورده، و آفت‌زده به‌منظور دستیابی به یکنواختی قابل قبول، حذف شدند. پوست انار از بخش خوراکی و داخلی آن جدا و شسته و درنهایت پوست تازه توسط آسیاب برقی، سه بار و در هر بار به مدت ۱۰ ثانیه خرد شد.

استخراج با دستگاه سوکسله

استخراج عصاره از ۱۰ گرم گرانول‌های ریزشدهٔ پوست تازهٔ انار در دستگاه استخراج‌کنندهٔ سوکسله با حلال‌های اتانول، استون، اتیل استات، و مخلوط مساوی از چهار حلال آب، اتانول، استون، و اتیل‌استات به مدت ۶ ساعت و سه تکرار انجام شد. به‌منظور حذف ذرات ریز عصاره‌های به‌دست‌آمده در ۴۵۰۰ دور در دقیقه به‌مدت سه دقیقه سانتریفیوژ شدند و با کاغذ صافی واتمن شمارهٔ ۴۱ (Whatman No.41) صاف و سپس در آون تحت خلأ و در دمای ۴۰ درجهٔ سانتیگراد تغلیظ شدند. سپس نیمی از این عصاره‌ها تا زمان استفاده برای استخراج و شناسایی ترکیبات مورد نظر با دستگاه کروماتوگرافی در ظروف شیشه‌ای کوچک قهوه‌ای رنگ و داخل فریزر ذخیره شدند و نیم دیگر به‌منظور تعیین راندمان استخراج درون ظرف شیشه‌ای مناسب نگه داشته شدند. راندمان استخراج‌ها در سه تکرار و ازطریق حذف حلال از عصاره در آون تحت خلأ و در دمای ۹۰ درجهٔ سانتیگراد تا دستیابی به وزن ثابت نمونه‌ها تعیین شد.

روش استخراج و آماده‌سازی نمونه‌ها برای تزریق به دستگاه کروماتوگرافی

به‌منظور استخراج حداکثر ترکیبات پلی‌فنولی از عصاره‌های به‌دست‌آمده از دستگاه سوکسله و برای آماده‌سازی آن‌ها برای تزریق به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا از روش استخراج مایع-مایع استفاده شد. در این روش نمونه‌ها در لولهٔ

Archive of SID
www.SID.ir

اپندورف (Eppendorf tube) در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۴ دقیقه سانتریفیوژ شدند و حلال آلی آن‌ها ازطریق دمیدن گاز نیتروژن به داخل ظرف به‌طور کامل حذف شد و دو میلی‌لیتر آب یون‌زدوده به نمونه‌های خشک اضافه شد. ترکیبات مورد نظر در مرحلهٔ بعد توسط نیم میلی‌لیتر اتیل‌استات از فاز آبی در دمای اتاق، به‌مدت چند دقیقه و با تکان‌دادن نمونه‌ها استخراج و به فاز آلی منتقل شدند. درنهایت فاز آبی حذف و نمونه‌های آماده‌شده برای تزریق به دستگاه HPLC با متانول به حجم اولیه خود بازگردانده شدند (Mousavinejad *et al*., 2009: Fischer *et al*., 2011).

دستگاه کروماتوگرافی و روش شناسایی کمی و کیفی

برای انجام این تحقیق از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا ساخت شرکت هولت پاکارد آمریکا مدل ۱۱۰۰(Hewlett Packard 1100 Series HPLC system) مجهز به ایزوپمپ مدل جی ۱۳۱۰ آ (a HP-1200 iso pump G1310A) ، نمونه‌بردار خودکار مدل جی ۱۳۱۳ آ (HP auto sampler G1313A) و شناساگر مرئی‌ـفرابنفش هولت پاکارد (HP UV–Vis detector)، استفاده شد.

نمونه‌ها قبل از تزریق به دستگاه از میکرو فیلتری با مش ۰/۴۵ میکرون ساخت شرکت کرومافیل آلمان (Chromafil CA-45/25 S, Duren, Germany) عبور داده شدند. تمامی نمونه‌ها در حجم ۲۰ میکرولیتر و در دمای اتاق به دستگاه تزریق شدند. برای استخراج و جداسازی هفت نوع فیتواستروژن و دو نوع تانیک‌اسید شامل الاجیک و سیرینژیک‌اسید از یکدیگر،ترکیب متنوعی از فازهای متحرک بررسی شد و درنهایت مخلوط آب و استونیتریل انتخاب شد. برای جداسازی الاجیک و سیرینژیک‌اسید و همچنین شش فیتواستروژن از یک ستون فاز معکوس سی ۱۸ ساخت شرکت واترز (Waters) آمریکا با مشخصات ۴٫۶ میلی‌متر قطر و ۲۰۰ میلی‌متر طول با قطر ذرات ۱۰ میکرون از نوع میکرو بنداپک (μBondapack™ C_{18}) و برای استیگمااسترول از ستون اچ پی زوربکس سی ۸ ساخت شرکت هولت پاکارد (HP-Zorbax C_8) و با مشخصات ۴٫۶ میلی‌متر قطر در ۲۰۰ میلی‌متر طول با قطر ذرات ۱۰ میکرونی استفاده شد. در این تحقیق از شرایط متفاوتی برای جداسازی و شناسایی ترکیبات استفاده شد به‌طوری که برای جداسازی استیگما استرول در یک تزریق به روش ایزوکراتیک (isocratic) به‌مدت ۱۵ دقیقه از فاز متحرکی متشکل از ۳درصد آب و ۹۷درصد استونیتریل همراه با بافرفسفات در یک pH معادل ۲/۵ و با شدت جریان یک میلی‌لیتر بر دقیقه و برای شناسایی آن از شناساگر مرئی‌ـفرابنفش و طول موج ۲۰۸ نانومتر استفاده شد. شرایط برای شش فیتواستروژن دیگر شامل موارد زیر بود: فاز متحرکی شامل ۵۵درصد آب و ۴۵درصد استونیتریل همراه با بافرفسفات در یک pH معادل ۲/۵ و مدت زمان آنالیز ۱۲ دقیقه، شدت جریان ۱/۲ میلی‌لیتر بر دقیقه و شناسایی در طول موج ۲۰۰ نانومتر (Abdel Wahab *et al*., 1998; Choi *et al*., 2006).

هر دو تانیک‌اسید (الاجیک و سیرینژیک‌اسید) نیز در تزریقی به‌مدت ۱۰ دقیقه و در ۲۸۰ نانومتر به کمک فاز متحرک متشکل از ۷۷درصد آب و ۲۳درصد استونیتریل در pH برابر با ۲/۵ و شدت جریان فاز متحرک معادل با ۱/۲ میلی‌لیتر بر دقیقه جداسازی و شناسایی شدند. برای شناسایی و محاسبات تعیین مقدار هر یک از اجزای بررسی‌شده از روش استاندارد خارجی استفاده شد. در این روش جزء خالص و استاندارد در شرایطی کاملاً یکسان و جداگانه به دستگاه تزریق می‌شود و پیک به‌دست‌آمده که یک زمان بازداری و یک مساحت سطح دارد، برای شناسایی هر ترکیب زمان بازداری پیک آن با استاندارد متناظرش مقایسه می‌شود. همچنین به‌منظور تعیین کمّیت آن ابتدا منحنی کالیبراسیون رسم می‌شود، معادلهٔ خط آن به‌دست می‌آید و درنهایت با استفاده از مساحت سطح زیر پیک به‌دست‌آمده از جزء مورد نظر و معادلهٔ خط منحنی کالیبراسیون، غلظت جزء محاسبه می‌شود. در دستگاه HPLC استفاده‌شده در این تحقیق، ثبت داده‌ها، شناسایی کیفی، و تمامی محاسبات کمّی با نرم‌افزار کمستیشن (Agilent Chemstation A.10.01) انجام گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری

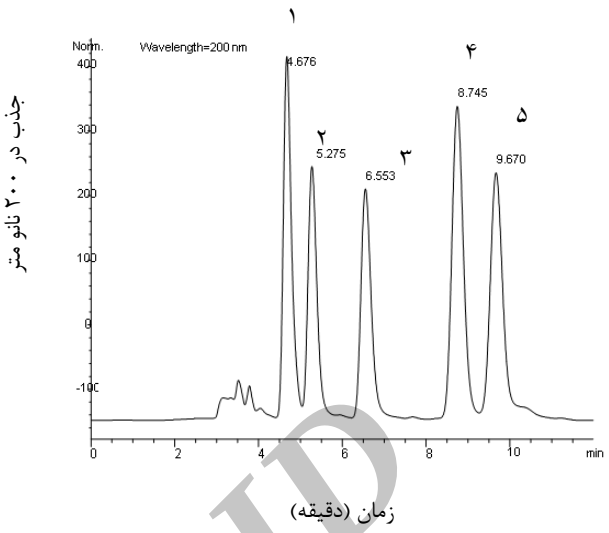
داده‌های مربوط به راندمان استخراج در این تحقیق در سه تکرار با نرم‌افزار آماری سس ۹٫۱ (SAS 9.1) با روش آنالیز واریانس (ANOVA) تجزیه و تحلیل شد و برای نشان‌دادن حداقل تفاوت معنی‌داری در سطح اطمینان بالاتر از ۹۵درصد (Pvalue≤0.05) از روش دانکن (Duncan test) استفاده شد. مقادیر در قالب میانگین با دامنهٔ خطای استاندارد نشان داده شدند.

نتایج وبحث

شکل‌های ۱ و ۲ و جدول ۱ نحوهٔ شناسایی و جداسازی پیک‌های شش نوع فیتواسترول و دو نوع تانیک‌اسید را نشان می‌دهند. در پژوهش حاضر اسیدفسفریک نقش مؤثری در وضوح و جداسازی پیک‌ها داشت. برای نمونهٔ پیک‌های به‌دست‌آمده از ترکیب استاندارد شش نوع فیتواستروژن (شکل ۱) و دو نوع تانیک‌اسید (شکل ۲) آورده شده است.

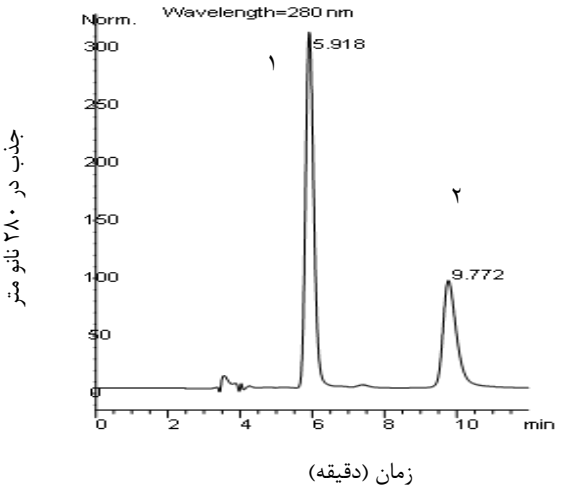
Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱. کروماتوگرام استاندارد شش فیتواستروژن (به‌ترتیب از چپ به راست: استریول (۱)، لوتئولین (۲)، کمپفرول (۳)، تستسترون (۴)، استرادیول و استرون (۵).

در توضیح شکل ۱ باید گفت که پیک استاندارد دو فیتواستروژن آلفااسترادیول و تستسترون کاملاً بر یکدیگر همپوشانی داشتند و امکان مجزاکردن پیک‌ها نبود. درنتیجه در شناسایی این دو ترکیب دو احتمال موجود است. در جدول ۱ زمان بازداری پیک ترکیبات، معادلهٔ خط منحنی کالیبراسیون آن‌ها، محدودهٔ خطی هریک، و فاکتور همبستگی (r) نشان داده شده است.



شکل ۲. کروماتوگرام استاندارد سیرینژیک (۱) و الاجیک‌اسید (۲)

جدول ۱. معادلات کالیبراسیون و برخی فاکتورهای کروماتوگرام استاندارد ترکیبات

ترکیبات	زمان بازداری (min)	محدوده خطی (mg/L)	معادلهٔ خط	ضریب همبستگی (r)	حد تشخیص (mg/L)	انحراف معیار نسبی (درصد)
استریول	۴/۶۷۶	۱/۰-۲۵/۰	۷۰/۰۱C–۱/۱۲	۰/۹۹۹	۰/۰۴	۸/۸
آلفا استرادیول	۹/۶۷۰	۰/۷-۰/۲	۱/۳۰۸C +۰/۷	۰/۹۹۹	۰/۰۰۸	۲/۸
تستسترون	۸/۷۴۵	۱/۰-۰/۱	۴۸/۹۶C +۱/۸۰	۰/۹۹۹	۰/۰۱	۱۲/۴
سیرینژیک‌اسید	۵/۹۱۸	۰/۵-۵/۰	۱۹/۵۲ C +۰/۵۲	۰/۹۹۶	۰/۰۵	۱۱/۵
الاجیک‌اسید	۹/۷۷۲	۱۰/۰-۳۰۰/۰	۱۰/۸۶ C +۰/۵۳	۰/۹۹۴	۰/۰۹	۱۰/۹

* حرف لاتین C در معادلهٔ خط معادل غلظت برحسب میلی‌گرم در لیتر است.

راندمان استخراج

استخراج عصاره‌ها از پوست سه رقم انار با چهار حلال در سه تکرار انجام شد و درپایان بعد از مراحل صاف‌کردن و سانتریفیوژ با حذف حلال از عصاره‌ها در آون تحت خلأ در دمای ۹۰ درجهٔ سانتیگراد و رسیدن به وزن ثابت، راندمان استخراج‌ها محاسبه شد. نتایج راندمان استخراج از پوست سه رقم انار (جدول ۲) و چهار حلال (جدول ۳) همراه با تفاوت‌های معنی‌داری میانگین‌ها در سطح اطمینان بالاتر از ۹۵درصد برای مقایسه آورده شده است. نتایج نشان می‌دهد بین ارقام انار در میزان استخراج عصاره تفاوت زیادی وجود ندارد و برخلاف انتظار از رقم پوست ضخیم اردستان عصارهٔ کمتری استحصال شده است، حال آنکه در بین حلال‌ها تفاوت فوق‌العاده زیادی مخصوصاً بین مخلوط حلال‌ها (۰/۹۵۷ ±۲۰/۳۳۳) و اتیل‌استات (۰/۰۳۳ ±۰/۷۸۸) دیده می‌شود.

جدول ۲. میانگین راندمان استخراج عصاره از پوست سه رقم انار ایرانی

رقم	تعداد داده	میانگین راندمان استخراج (درصد)*
ملس پوست‌گلی ساوه	۱۲	۱۲/۹± ۰/۲ [a]
ترش پوست‌سفید راور	۱۲	۱۲/۴± ۰/۲ [a]
شیرین پوست‌سیاه اردستان	۱۲	۱۱/۲± ۰/۲ [b]

*مقادیر ذکرشده، میانگین‌ها با دامنهٔ خطای استاندارد (means ± standard error) حاصل از ۱۲ آنالیز هستند.

تفاوت‌های معنی‌دار در سطح اطمینان بالاتر از ۹۵درصد در هر ستون از جدول با حروف لاتین متفاوت (a, b) نشان داده شده‌اند.

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج پژوهش‌ها روشن می‌کند که در سطح اطمینان بالاتر از ۹۵درصد بین مخلوط چهار حلال با سه حلال دیگر تفاوت معنی‌داری وجود دارد در صورتی‌که دو حلال اتانول و استون راندمان استخراج تقریباً برابری با هم داشتند و اتیل‌استات با اختلاف زیادی کمترین راندمان استخراج را در بین حلال‌ها داشته است (جدول ۳). مقایسهٔ نتایج نشان می‌دهد ترکیب و قطبیت حلال‌ها اهمیت زیادی در راندمان استخراج دارد. برای مثال وجود آب به‌عنوان قطبی‌ترین حلال در مخلوط چهار حلال به نوعی سبب بالاترین راندمان استخراج شده است و بعد از آن به‌ترتیب اتانول، استون، و درنهایت اتیل‌استات با کمترین قطبیت قرار گرفته‌اند. مقایسهٔ راندمان استخراج توسط حلال‌های گوناگون از پوست انار در تحقیق دیگری (Kulkarni *et al.*, 2004) نیز بررسی و نتایج آن نشان داده است که در بین متانول، اتیل‌استات، کلروفرم، و هگزان، حلال قطبی‌تر (متانول) استخراج فوق‌العاده بیشتری (۲۴۸ گرم عصاره در ۵۰۰ گرم پوست خشک انار معادل ۴۹/۶درصد) از پوست انار داشته است. همچنین نباید فراموش کرد که در تحقیق حاضر استخراج‌ها روی پوست تازهٔ انار صورت گرفته است، حال آنکه بدیهی است درصد بالایی از محتوای پوست تازه را آب تشکیل می‌دهد بنابراین رسوخ بیشتر حلال‌های قطبی به داخل سلول‌های سالم و تخریب‌شدهٔ پوست تازه و مملو از رطوبت انار می‌تواند به‌دلیل تناسب چنین حلال‌هایی با حلال ترکیبات سلول‌ها و بافت‌های گیاهی (آب) یکی از دلایل قانع‌کننده برای این نتایج باشد. از طرف دیگر به‌کارگیری آب خالص در استخراج مواد آنتی‌اکسیدانی به‌دلیل بالابودن نقطهٔ جوش آن باعث کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات می‌شود. درضمن در این تحقیق هدف استخراج توأم ترکیبات فیتواستروژنی و تانیک‌اسیدها بود و باتوجه به اینکه ترکیبات فیتواسترولی در حلال‌های آلی بهتر حل می‌شوند و اسیدهای تانیک در حلال‌های آبی، مخلوط حلال‌ها به‌جای آب خالص به‌کار رفت (Dunford *et al.*, 2009).

جدول ۳. میانگین راندمان استخراج عصاره توسط چهار حلال آلی از پوست انار

حلال آلی	تعداد داده	میانگین راندمان استخراج (درصد)
مخلوط مساوی از چهار حلال	۹	۲۰/۳± ۱/۰ [a]
اتانول	۹	۱۴/۰± ۰/۴ [b]
استون	۹	۱۳/۴± ۰/۴ [b]
اتیل استات	۹	۰/۸± ۰/۰ [c]

ترکیبات فیتواستروژنی و تانیک‌اسیدها

از بین هفت نوع فیتواستروژن و دو نوع تانیک‌اسید که امکان وجود آنها در پوست انار در با دستگاه HPLC بررسی شد، ترکیبات شناسایی شد و مقدار آن‌ها (برحسب میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم پوست تازه) برای مقایسه آورده شده است (جدول ۴). برطبق نتایج با اینکه بیشترین راندمان استخراج متعلق به رقم پوست‌سیاه اردستان نبود ولی بالاترین میزان فیتواستروژن‌های شناسایی‌شده مانند استریول (۷/۴۵)، تستسترون، و یا آلفااسترادیول (۹/۰۹) و تانیک‌اسیدها یعنی الاجیک‌اسید (۱۰۳) و سیرینژیک‌اسید (۲/۴۶) در عصاره‌های استخراج‌شده از پوست این رقم انار به‌دست آمد. با نگاهی دقیق‌تر می‌توان دریافت که ترکیبی از سه حلال به همراه آب به‌عنوان قطبی‌ترین حلال سبب بیشترین استخراج الاجیک و سیرینژیک‌اسید از پوست انار رقم‌های پوست‌سیاه و پوست‌گلی شده است ولی در پوست‌سفید استون حلال بهتری است. با توجه به نتایج به نظر می‌رسد ترکیب و قطبیت حلال عامل مهمی در استخراج مشتقات الاجی‌تانن‌ها از پوست انار باشد (جدول ۴). این داده‌ها با نتایج حاصل از تحقیقات دیگر انجام‌شده در این زمینه نیز هم‌خوانی دارد. به‌عنوان مثال Kulkarni *et al.*, 2004 بیشترین میزان پونیکالاجین (پلی‌فنولیک سنگین مولکول) از پوست انار را در بین حلال‌ها ازطریق متانول یعنی حلال قطبی‌تر (نسبت به هگزان و کلروفرم) استخراج کرد. Li *et al.*, (2006) برای استخراج ترکیبات پلی‌فنولیکی از پوست انار و بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها از متانول، اتانول، استون، و ترکیبی از سه حلال استفاده کردند. نتایج آزمایش‌های آن‌ها نشان داد عصارهٔ به‌دست‌آمده از ترکیب سه حلال بیشترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را داشت این در صورتی بود که درمیان حلال‌های دیگر نیز ترتیب فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها ارتباط مستقیمی با قطبیت حلال آن‌ها داشت. بررسی منابع نشان می‌دهد درخصوص استخراج و شناسایی فیتواستروژن‌ها از پوست انار تحقیقات کمی انجام شده است و فقط در پژوهشی (Elswijk *et al.*, 2004) سه فیتواستروژن لوتئولین، کمپفرول، و کورستین (Quercetin) در عصارهٔ هیدرولیزشده توسط اسید (از پوست انار) و ازطریق کروماتوگرافی جفت‌شده با طیف‌سنج جرمی شناسایی و اندازه‌گیری شدند. در تحقیق حاضر روش تعیین کمیّت فیتواستروژن‌ها دقیق‌تر بود، ضمن اینکه لوتئولین و کمپفرول شناسایی نشدند. البته همانطور که درمقدمه ذکر شد این ترکیبات از روغن هسته و دیگر بخش‌های انار در چندین تحقیق استخراج و شناسایی شده‌اند. در مورد فلاونوئیدهای فیتواستروژنی نمی‌توان نتیجهٔ منطقی گرفت. در

Archive of SID

www.SID.ir

صورتی‌که هزینهٔ تحقیق اجازه می‌داد آنالیز عصاره‌ها با دستگاه کروماتوگرافی در سه تکرار انجام شود، امکان آنالیز آماری دقیق‌تری برای دستیابی به مقایسه و نتیجه‌گیری بهتر مهیا می‌شد. هرچند هدف کلی از این تحقیق در گام نخست اثبات وجود فیتواستروژن‌ها در پوست انار بوده است که در این پژوهش به این مهم دست یافته‌ایم.

جدول ۴. ترکیبات شناسایی‌شده و مقدار آن‌ها (برحسب میلی‌گرم در هر ۱۰۰ گرم پوست تازه) در عصاره‌های پوست تازه سه رقم انار ایرانی استخراج‌شده توسط چهار حلال آلی

رقم	شیرین پوست‌سیاه اردستان				ملس‌پوست گلی ساوه				ترش‌پوست سفید راور			
حلال*	الف	ب	ج	د	الف	ب	ج	د	الف	ب	ج	د
سیرینژیک‌اسید	–	۱/۲۰	۰/۴۲	۲/۴۶	–	۲/۴۶	۰/۲۸	۰/۶۲	۲/۱۶	–	۰/۱۰	–
الاجیک‌اسید	۵۱/۷	۲۱/۴	۴/۲	۱۰۳	۶۸/۳	۴۹/۶	۲/۳	۶۲/۲	۴۶/۳	۵۹/۳	۴/۵	۲۸/۶
استریول	۴/۹۵	۷/۴۵	–	۶/۱۶	۱/۲۸	۰/۴۴	۱/۱۸	۱/۳۵	۳/۶۲	۱/۹۵	۴/۵۲	۱/۴۲
تستسترون و آلفا استرادیول	۵/۷۴	۰/۵۹	–	۹/۰۹	۳/۶۱	۲/۵۱	۱/۲۰	۲/۲۸	۸/۴۳	۴/۶۹	۰/۳۴	۴/۸۲

* حلال الف معادل استون، ب= اتانول، ج=اتیل استات، و د= مخلوط مساوی از چهار حلال آب، اتانول، استون، و اتیل‌استات است.

** نتایج میانگین دو تزریق هستند (انحراف معیار متوسط=۰/۶۳ میلی گرم در هر ۱۰۰ گرم پوست تازه).

نتیجه‌گیری کلی

در مطالعهٔ حاضر توسط دستگاه سوکسله و چهار نوع حلال از پوست سه رقم انار معروف ایرانی عصاره‌گیری شد و نمونه‌ها ازنظر راندمان استخراج و همچنین کمّیت و کیفیت هفت نوع فیتواستروژن و دو نوع تانیک‌اسید با دستگاه HPLC بررسی شدند. در گزینش حلال‌ها سعی برآن شد تا چهار حلال متناسب با نوع ترکیبات استخراج‌شده (پلی‌فنول‌ها) و متفاوت ازنظر قطبیت انتخاب شوند. نتایج به‌دست‌آمده از دستگاه HPLC وجود استریول و یکی یا هر دو فیتواستروژن آلفااسترادیول و تستسترون را در پوست انار اثبات کرد. همچنین این تحقیق با شناسایی الاجیک و سیرینژیک‌اسید در پوست انار به نوعی مکمل تحقیقات گذشته در این زمینه بود.

نتایج نشان داد مخلوط مساوی از چهار حلال که شامل اتانول، استون، اتیل‌استات، و حلال بسیار قطبی آب بود، بیشترین راندمان استخراج (۰/۹۵۷ ±۲۰/۳۳۳درصد) را دارد و نیز ازنظر نوع ترکیبات، بیشترین الاجیک‌اسید (۱۰۳ میلی‌گرم در صد گرم پوست تازهٔ انار) و سیرینژیک‌اسید (۲/۴۶ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم پوست تازهٔ انار) را از پوست انار استخراج کرده است. این نتایج اهمیت ترکیب و قطبیت حلال آلی را در استخراج ترکیبات پلی‌فنولیکی از پوست انار نشان می‌دهد. در بین ارقام انار برخلاف انتظار رقم پوست‌سیاه و ضخیم اردستان بیشترین راندمان استخراج را نداشت ولی چنان‌که انتظار می‌رفت بیشترین میزان تانیک‌اسیدها از پوست این رقم انار استخراج شد.

سپاسگزاری

از مدیریت محترم مرکز تحقیقات انار جهاد کشاورزی ساوه برای تأمین انار لازم این تحقیق تقدیر وتشکر می‌گردد.

REFERENCES

Abd El Wahab, S. M., El Fiki, N. M. &Mostafa, F. (1998). Characterization of certain steroid hormones in *Punicagranatum* L. seeds. *Bull. Fac. Pharm*. 36, 11-15.

Cam, M. &Hisil, Y. (2010). Pressurised water extraction of polyphenols from pomegranate peels. *Food chemistry*. 123, 878- 885.

Choi, D. W., Kim, J. Y., Choi, S. H. & Jung, H. S. (2006). Identification of stroid hormones in pomegranate (*Punicagranatum*) using HPLC and GC-mass spectrometry. *Food Chemistry*, 96, 562-571.

Dean, P. D. G., Exlby, D. & Goodwin, T. M. (1971). Steroid oestrogens in plants: pre-estimation of oestrone in pomegranate seeds. *Phytochemistry*, 10, 2215-2216.

Dunford NT, Irmak S, Jonnala R. (2009) Effect of the solvent type and temperature on phytosterol contents and compositions of wheat straw, bran, and germ extracts, Journal of Agricultural Food Chemistry, 57(22):10608-11.

Elswijk, D. A. V., Schobel, U. P., Lansky, E. P &Greef, J. V. D. (2004). Rapid determination of estrogenic compounds in pomegranate using on-line biochemical detection coupled to mass spectrometry. *Phytochemistry*,65, 233-241.

Fadavi, A., Barzegar, M. &Azizi, M. H. (2006). Determination of fatty acids and total lipid content in oilseed of 25 omegranate varieties grown in Iran. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 676-680.

Fisher, U. A., Carle, R. &Kammerer, D. A. (2011).

Archive of SID

www.SID.ir

Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punicagranatum L.*) peel, mesocarp, aril and differently produced juiced by HPLC-DAD-ESI/MS. *Food Chemistry*, 127, 807-821.

Fischer, U.A.; Carle, R.; Kammerer, D. R. (2011) Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punicagranatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD–ESI/MS*n*., Food chemistry, 127, 807-821

Guo, C., Yang, J., Wie, J. & Jiang, Y. (2003). Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. *Nutrition Research*, 23, 1719-1726.

Hodgson, R.W. (1971). *The pomegranate*. California Agricultural Export Statistics Bulletin. 276, 163-192.

Kim, N. D., Mehta, R., Liveny, I., Liveny, T., Amichay, A., Poirie, D., Nicholla, P. & Kirby, A. (2002). Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential pomegranate (*Punicagranatum L.*) for human breast cancer. *Breast Cancer Research And Treatment*, 71, 203-217.

Kulkarni, A. P.; Aradhya, S. M.; Divakar, S. (2004). Isolation and identification of a radical scavenging antioxidant punicalagin from pith and capillary membrane of pomegranate fruit. *Food Chemistry*, 87, 551-557.

Lau, A. J., Holmes, M. J. & Woo, S. O. (2003). Analysis of adulterants in a traditional herbal medicinal product using liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 31, 401-406.

Li, Y., Guo, C., Yang, J., Wei, J., Xu, J. & Cheng, S. (2006). Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chemistry*, 96, 254-260.

Moneam, N. M., Elsharaky, A. S. &Badreldin, M. M. (1988). Oestrogen content of pomegranate seeds. *Journal of Chromatography*, 438, 438-442.

Mousavinejad, G; Emam-Djomeh, Z.; Rezaei, Z.; Haddad Khodaparast, M.H. (2009) Identification and quantification of phenolic compounds and their effects on antioxidant activity in pomegranate juices of eight Iranian cultivars, Food chemistry, 115, 1274-1278.

Negi, P. S., Jayaprakasha, G. K. &Jena, B. S. (2003). Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. *Food Chemistry*, 80, 393-397.

Seeram, N. P., Adams, L. S., Henning, S. M., Niu, Y., Nair, M. G. & Heber, D. (2005-a). In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *J. Nutr. Biochem*, 16, 360-367.

Seeram. N. P., Lee, R., Hardy, M. & Heber, D. (2005-b). Rapid large scale purification of ellagitannin from pomegranate husk by-product of the commercial juice industry. *Separation and Purification Technology*, 41, 49-55.

Singh, R. P., Murthy, K. N. C. &Jayakrapasha, G. H. (2002). Studies on the antioxidant activity of pomegranate *(Punicagranatum*) peel and seed extraction using in vitro model. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 81-86.

Wu, Q., Wang, M. & Simon, J. E. (2004). Analytical methods to determine phytoestrogenic compounds. *Journal of Chromatography B*, 812, 325-355.

Zarezadeh, M, R. (2008). Extraction and identification of nutritional and pharmaceutical compounds from pomegranate peel of three dominant Iranian varieties. MSc. dissertation, Isfahan University of Technology, Isfahan

Archive of SID

www.SID.ir