

ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی برخی ارقام ایرانی و وارداتی سیب در منطقه کرج

انسیه قربانی^۱ - داود بخشی^{۲*} - حسن حاج نجاری^۳ - محمود قاسم نژاد^۴ - پروانه تقی دوست^۵

تاریخ دریافت: ۸۸/۸/۲۸

تاریخ پذیرش: ۸۹/۳/۵

چکیده

در این مطالعه میزان فنل کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی پوست و گوشت و ترکیبات فنلی اصلی میوه شامل کلروژنیک اسید، کاتچین، فلوریدزین، کوئرستین ۳-گالاکتوزید، سیانیدین ۳-گالاکتوزید (آنتوسیانین) و فلاونوئید کل پوست ارقام بومی 'قندک'، 'حیدرزاده' و ارقام وارداتی 'گلدن اسپور'، 'رد اسپور' و 'رد دلشز' اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که ارقام انتخاب شده از نظر تمامی فاکتورها به جز میزان سیانیدین ۳-گالاکتوزید دارای اختلاف معنی‌داری هستند. رقم قرمز 'رد اسپور' دارای بیشترین میزان کاتچین و فلوریدزین بود. رقم قرمز 'حیدرزاده' بیشترین میزان کوئرستین ۳-گالاکتوزید و سیانیدین ۳-گالاکتوزید و فلاونوئید کل را نشان داد. رابطه مثبتی بین مقدار فنل کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی برقرار بود. پوست ارقام مورد مطالعه دارای فنل کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به گوشت بودند. در میان ارقام مورد آزمایش، پوست رقم 'رد اسپور' و گوشت رقم 'حیدرزاده' بیشترین میزان فنل کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی را دارا بودند.

واژه‌های کلیدی: فنل کل، کلروژنیک اسید، آنتوسیانین، کوئرستین ۳-گالاکتوزید، کاتچین

مقدمه

توانایی‌های آنتی‌اکسیدانی آنها، ظرفیت انتقال الکترون‌ها، کاهش پراکسیداسیون هیدروژن، فعال کردن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، کاهش رادیکال‌های آلفا-توکوفرول و جلوگیری از اکسیداسیون نسبت داده می‌شوند (۲ و ۱۰). علاوه بر این، ترکیبات مذکور دارای خصوصیات ضدجوش، ضد میکروبی، ضد ویروس و ضد سرطان هستند (۲، ۱۹ و ۲۰). پلی‌فنل‌ها که مواد مؤثره بسیاری از گیاهان شفابخش از جمله سیب را تشکیل می‌دهند، فعالیت بخش وسیعی از آنزیم‌ها و گیرنده‌های سلولی را تنظیم می‌کنند (۱۷). سیب به عنوان یک میوه پرمصرف، منبع غنی از ترکیبات فنلی به ویژه فلاونوئیدهاست (۵ و ۸)، که فعالیت و غلظت این ترکیبات با توجه به رقم، مرحله بلوغ، شرایط محیطی و بخش‌های مختلف میوه متفاوت است (۷ و ۲۱) که با توجه به ساختار بیوشیمیایی در دو دسته عمده اسیدهای فنلی و فلاونوئیدها گروه بندی می‌شوند (۱۵). اسیدهای فنلی که از مشتقات هیدروکسی سینامیک اسید هستند عمدتاً شامل کلروژنیک اسید و به مقدار کمتر کافئیک اسید و سینامیک اسید است. گروه‌های اصلی فلاونوئیدها در میوه سیب فلاونول‌ها یا کوئرستین ۳-گلیکوزید، فلاوان ۳-آل‌های منومر و لیگومر مثل کاتچین، اپی‌کاتچین، پروسیانیدین‌ها و دی‌هیدروچالکون‌هایی مثل فلوریدزین هستند. در ارقام قرمز علاوه بر ترکیبات مذکور، آنتوسیانین‌ها یا سیانیدین ۳-گلوکوزیدها وجود دارند که عمدتاً در پوست تجمع می‌یابند (۳ و

رژیم غذایی با مقادیر زیاد میوه و سبزی و مقادیر کم کلسترول و چربی به طور معکوسی با ظهور بیماری قلبی - عروقی، سرطان و ظهور بیماری‌های مزمن مرتبط است و طول عمر را افزایش می‌دهد (۱۱ و ۲۲). مطالعات اپیدمیولوژیک نیز بیان کننده ارتباط حفاظتی بین مصرف غذاهای غنی از فلاونوئیدها و کاهش خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی - عروقی (CVD) و تصلب شرایین است (۲ و ۱۲). یک مکانیسم ممکن برای اثرات حفاظت میوه‌ها و سبزیجات در مورد بیماری، ترکیبات آلی فعال و آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی موجود در غذاهایی است که تنش اکسیداتیو را کاهش می‌دهند (۱۱ و ۱۸). میوه‌ها و سبزیجات دارای چندین هزار نوع مواد فیتوشیمیایی با ساختارهای متنوع‌اند، که بخش بزرگی از آنها پلی‌فنل‌ها هستند (۱۸). بیشتر اثرات حفاظتی پلی‌فنل‌ها و فلاونوئیدها در سیستم‌های بیولوژیکی به

۲، ۴- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار و استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گلستان

(*- نویسنده مسئول: (Email: bakhshi-d@guilan.ac.ir)

۳- استادیار، مؤسسه تحقیقات تهیه و اصلاح نهال و بذر کرج

۵- کارشناس آزمایشگاه علوم باغبانی، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گلستان

گالاکتوزید، سیانیدین کلراید (Extrasynthese، فرانسه)، فلوریدزین (Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)) و کلروژنیک اسید (Cayman Chemical Co. (Japan)) و همچنین رادیکال آزاد DPPH (Sigma-Aldrich) استفاده شد. حلال های مورد استفاده برای استخراج، کروماتوگرافی و اسپکتروفتومتری دارای درجه HPLC و تولید شرکت Merck بودند. فولین مورد استفاده برای اندازه گیری فنل کل نیز محصول شرکت Merck بود.

استخراج ترکیبات فنلی

به منظور استخراج ترکیبات فنلی، نمونه ها پس از انتقال به آزمایشگاه شستشو شدند و سپس پوست و گوشت آنها جدا گردید. برای استخراج ترکیبات فنلی از روش لیستر و همکاران (۱۵) با اندکی تغییر استفاده شد. بدین صورت که مقدار ۲ گرم از پوست و گوشت به طور جداگانه با استفاده از نیتروژن مایع در هاون چینی آسیاب گردید. سپس به آنها مقدار ۲ سی سی از حلال استخراج متشکل از متانول (۸۵ درصد) و استیک اسید (۱۵ درصد) اضافه شد. پس از مخلوط کردن، نمونه ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. پس از این مرحله نمونه ها داخل میکروتیوپ ریخته شدند و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس حدود ۲۰۰ میکرولیتر از قسمت روشنایی با دقت برداشته شد و از فیلتر یکبار مصرف سرسرنگی با قطر منافذ ۰/۴۵ میکرومتر گذرانده شد.

تعیین میزان ترکیبات فنلی با دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی عملی بالا (HPLC)

آنالیز ترکیبات فنلی پوست نمونه ها با دستگاه Breeze HPLC (system, Waters, Ma, USA)، مجهز به شناساگر UV-Visible (Waters Dual λ Absorbance 2487) و ستون Symentery C18 (۴/۶×۱۵۰ میلی متر با قطر منافذ ۵ میکرومتر، Waters, Dublin Ireland) انجام شد. جداسازی ترکیبات فنلی با استفاده از دو حلال A (۹۵ درصد آب: ۵ درصد متانول) و B (۵ درصد آب: ۹۵ درصد متانول) و pH حدود ۳ و سرعت یک میلی لیتر در دقیقه انجام شد. برنامه زمانی و تغییرات نسبت حلال های A و B در زمان کروماتوگرافی به ترتیب بدین صورت بود: از شروع تا دقیقه بیست ۹۰، ۱۰؛ از دقیقه بیست تا دقیقه سی ۵۵، ۴۵ و از دقیقه سی ۴۵، ۵۵. در این پژوهش ترکیبات فنلی اندازه گیری شده شامل کلروژنیک اسید، کاتچین، فلوریدزین، کوئرستین ۳-گالاکتوزید، سیانیدین ۳-گالاکتوزید بودند. برای اندازه گیری ترکیبات فوق شناساگر به ترتیب در طول موج های ۳۲۰، ۲۸۰، ۲۸۰، ۳۵۰، ۳۵۰ و ۵۳۰ نانومتر تنظیم شد. برای جداسازی و اندازه گیری مقدار این ترکیبات در عصاره تهیه شده از

۱۶. پلی فنل های پوست سیب نسبت به گوشت سیب سهم بیشتری در فعالیت آنتی اکسیدانی کل دارند. بنابراین، مصرف سیب با پوست به منظور به حداکثر رساندن فعالیت آنتی اکسیدانی سیب مطلوب است (۲۳). اسکارپا و گنزالز (۱۹۹۸) با آنالیز کمی ترکیبات فنلی پوست و گوشت ۴ رقم 'گلدن دلشیز'، 'رد دلشیز'، 'گرانی اسمیت' و 'گرین رینتا' دریافتند که در هر ۴ رقم مورد مطالعه، میزان مواد فنلی در پوست بیشتر از گوشت می باشد. بخشی و آراکاو (۶) با بررسی میزان فنل کل و فعالیت آنتی اکسیدانی سیب رقم جاناتان بیان کردند که ارتباط مثبتی بین میزان فنل کل و فعالیت آنتی اکسیدانی وجود دارد.

مطالعات متعدد بر روی ارقام مختلف سیب در دنیا نشان داده است که رقم به عنوان یک عامل ژنتیکی نقش عمده ای در تجمع مواد فنلی دارد (۱ و ۸). لیستر و همکاران (۱۵) با مطالعه میزان ترکیبات فنلی در دو رقم 'اسپلندور' و 'گرانی اسمیت' بیان کردند که میزان کوئرستین گلیکوزیدها و پروآنتوسیانیدین ها در پوست سیب های رقم 'اسپلندور' بیش از 'گرانی اسمیت' بود. مارکوسکی و پلوچارسکی (۱۶) نیز با بررسی ترکیبات فنلی در میوه های ۴ رقم سیب 'جاناگلد'، 'سمیون'، 'آیدارد' و 'توپاز' بیان کردند که تفاوت های باارزی بین ارقام مختلف از نظر میزان گروه های فنلی وجود دارد. در مطالعه آنها 'آیدارد' بیشترین مقدار اسیدهای فنلی و 'جاناگلد' و 'توپاز' بیشترین مقدار کوئرستین گلیکوزیدها را داشتند.

نظر به اهمیت ارقام ایرانی که با تنوع ژنتیکی بسیار گسترده شامل انواع خوش طعم و بازاریسند هستند، نیاز به مطالعه وسیع و دقیق احساس می شود. مقایسه بین ارقام محلی ایران و ارقام واردتی اطلاعات مفیدی را برای ارزش گذاری ارقام و معرفی انواع غنی از ترکیبات فنلی در اختیار محققین قرار خواهد داد که در پژوهش حاضر مورد توجه قرار گرفته است.

مواد و روش ها

مواد گیاهی

این پژوهش بر روی ۵ رقم سیب شامل 'قندک'، 'حیدرزاده'، 'رد اسپور'، 'گلدن اسپور' و 'رد دلشیز' که در کلکسیون ارقام تجارته سیب واقع در کمال آباد کرج (زیر نظر بخش تحقیقات باغبانی موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر) پرورش می یابند، انجام شد. میوه های هر رقم در زمان رسیدگی فیزیولوژیکی برداشت شدند. تمام ارقام روی پایه های بذر پیوند شده بودند و فرم تربیت آنها به صورت جامی بود. سن ارقام در زمان برداشت ۱۶ سال بود.

مواد شیمیایی

در این تحقیق از استانداردهای (+)-کاتچین، کوئرستین ۳-

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها، از طریق خنثی‌کنندگی رادیکال آزاد DPPH (۲ و ۱ دی‌فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل) تعیین گردید. برای این منظور ۵۰ میکرولیتر از عصاره‌های رقیق شده نمونه‌های پوست داخل لوله‌های آزمایش کوچک ریخته شد و ۹۵۰ میکرولیتر محلول DPPH ۰/۱ نرمال به آنها اضافه گردید. محلول حاصل ورتکس شد و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در یک محفظه تاریک در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس میزان جذب شاهد (۱ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ نرمال DPPH) و نمونه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (JENWAY – 6105 UV/Vis, Belgium) در طول موج ۵۱۷ نانومتر تعیین گردید. این آزمایش بر روی پوست و گوشت هر رقم به طور جداگانه و با ۳ تکرار انجام شد. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها به صورت درصد بازدارندگی DPPH و با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

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

$\%DPPH_{sc}$ = درصد بازدارندگی

A_{cont} = میزان جذب DPPH

A_{samp} = میزان جذب (نمونه + DPPH)

آنالیز آماری

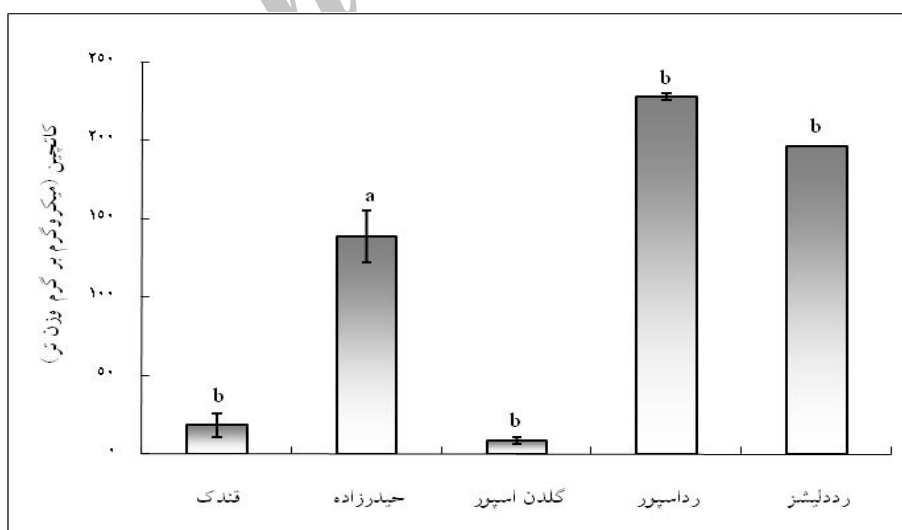
این مطالعه در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. تجزیه واریانس نتایج حاصل بوسیله نرم افزار SAS، مقایسه میانگین‌ها بوسیله آزمون دانکن و رسم نمودارها نیز با نرم‌افزار Excel صورت گرفت.

پوست میوه‌ها، مقدار ۵۰ میکرولیتر از نمونه‌های تهیه شده در هر یک از طول موج‌ها به دستگاه تزریق شدند. این آزمایش برای نمونه‌های پوست هر رقم در ۲ تکرار انجام شد. به منظور آنالیز کمی، کروماتوگرام‌های حاصل از تزریق هر نمونه در هر تیمار با کروماتوگرام‌های به دست آمده از تزریق استانداردهای مربوطه مقایسه و در نهایت غلظت این ترکیبات برحسب میکروگرم در یک گرم بافت تر محاسبه شد.

تعیین میزان فنل کل با روش اسپکتروفتومتری

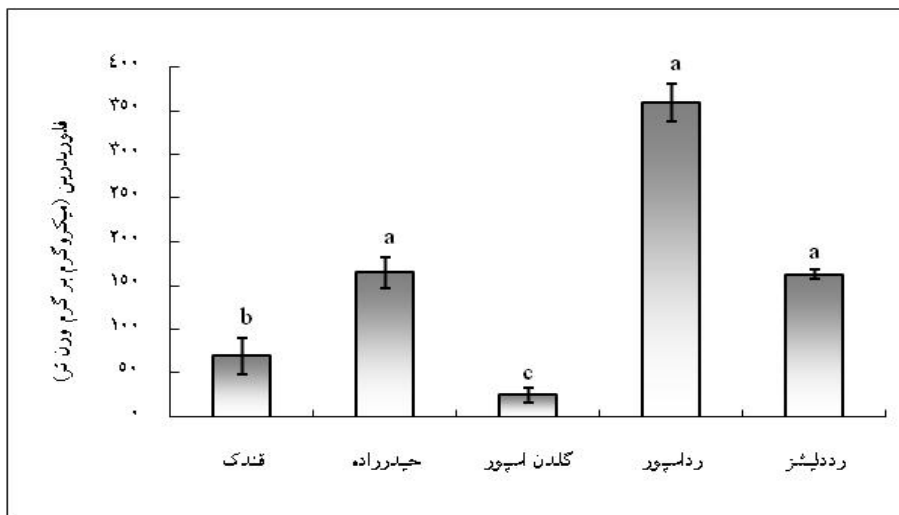
میزان فنل کل در عصاره‌های پوست و گوشت با روش Folin-Ciocalteu اندازه‌گیری شد (۸ و ۹). بعلت بالا بودن مقدار ترکیبات فنلی، ابتدا عصاره‌های پوست و گوشت ۲۰ بار رقیق شدند. به منظور اندازه‌گیری مقدار فنل کل به ۱۲۵ میکرولیتر از عصاره‌ها، ۳۷۵ میکرولیتر آب، ۲/۵ میلی‌لیتر فولین ۱۰ درصد اضافه شد و بعد از ۶ دقیقه ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷/۵ درصد نیز به آنها اضافه گردید. سپس نمونه‌ها به مدت ۱/۵ ساعت در تاریکی و در دمای اتاق نگهداری شدند و بعد از آن میزان جذب با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (JENWAY – 6405 UV/Vis, Belgium) و در طول موج ۷۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. این آزمایش برای نمونه‌های پوست و گوشت هر رقم به طور جداگانه در ۳ تکرار انجام شد. میزان فنل کل بر حسب میکروگرم اسیدگالیک در یک گرم بافت تر بیان شد.

تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی



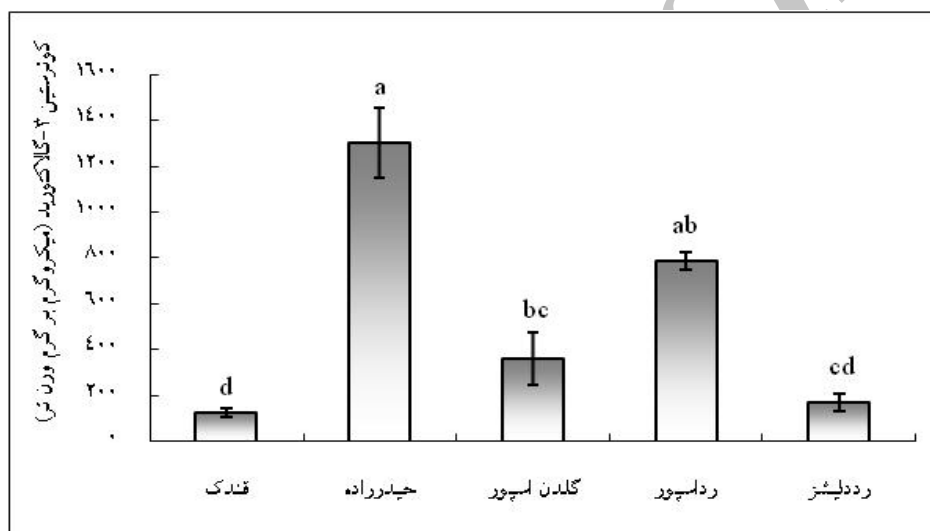
شکل ۱- مقدار کاتچین در پوست ارقام مختلف

حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است. خط عمودی نشان دهنده خطای استاندارد از میانگین (\pm SE) است.



شکل ۲- مقدار کلروفیل در پوست ارقام مختلف

حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است. خط عمودی نشان دهنده خطای استاندارد از میانگین ($\pm SE$) است.



شکل ۳- مقدار کلروفیل a در پوست ارقام مختلف

حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است. خط عمودی نشان دهنده خطای استاندارد از میانگین ($\pm SE$) است.

کلروفیل و کاتچین بود (شکل ۱ و ۲).

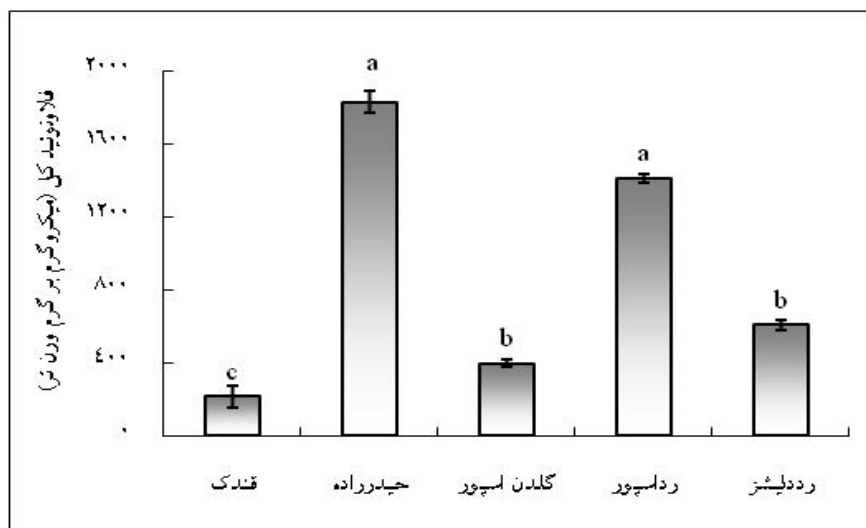
همان‌طور که در شکل ۳ و ۴ مشخص است پوست قرمز رقم 'حیدرزاده' و پوست زرد رقم 'قندک' به ترتیب بیشترین و کمترین مقدار کوئرستین ۳-گالاکتوزید و فلاونوئید کل (مجموع کوئرستین ۳-گالاکتوزید، سیانیدین ۳-گالاکتوزید، کاتچین و کلروفیل) را دارا می‌باشند.

رقم 'قندک' بیشترین مقدار کلروژنیک اسید را نشان داد و بعد از آن به ترتیب ارقام 'گلدن اسپور'، 'حیدرزاده'، 'رد اسپور' و 'رد دلشز' قرار داشتند (شکل ۵).

نتایج و بحث

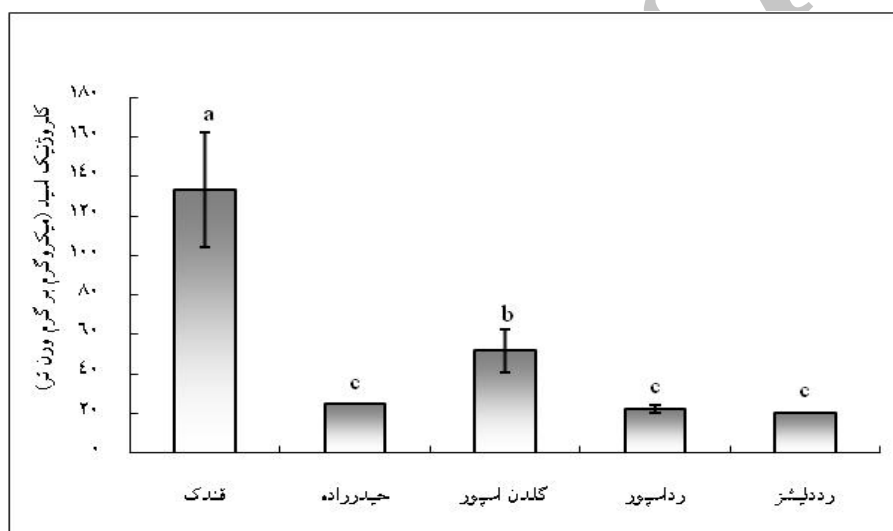
نتایج حاصل از این آزمایش بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین ارقام موجود از نظر همه ترکیبات اندازه‌گیری شده توسط HPLC به جز مقدار سیانیدین ۳-گالاکتوزید بود. وجود تفاوت در ترکیبات فنلی پوست ارقام مختلف تأیید کننده نقش ژنتیک در سنتز ترکیبات فنلی است که این با نتایج به دست آمده توسط لاتا و همکاران (۱۴) مطابقت داشت.

نتایج نشان داد که رقم 'رد اسپور' دارای بیشترین میزان کلروفیل و کاتچین است. رقم 'گلدن اسپور' دارای کمترین مقدار



شکل ۴- مقدار فلاونوئید کل در پوست ارقام مختلف

حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است. خط عمودی نشان دهنده خطای استاندارد از میانگین (\pm SE) است.



شکل ۵- مقدار کلروژنیک اسید در پوست ارقام مختلف

حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است. خط عمودی نشان دهنده خطای استاندارد از میانگین (\pm SE) است.

و پوست دارای فنل کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت به گوشت است که این با نتایج به دست آمده توسط خانیزاده و همکاران (۱۳) و دی‌آبروسکا و همکاران (۸) مطابقت دارد. در مطالعه ما پوست رقم 'رد اسپور' و گوشت رقم 'حیدرزاده' بیشترین مقدار فنل کل و درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی را دارا بودند.

در مورد توزیع ترکیبات فنلی درون میوه سیب و متفاوت بودن میزان فنل‌ها در پوست و گوشت می‌توان گفت که سنتز و تجمع ترکیبات فنلی در بافت‌های مختلف متفاوت است (۴). به طور کلی، ترکیبات فنلی به خاطر نقش بالقوه‌شان در حفاظت در برابر اشعه ماورای بنفش، فعالیت‌شان بعنوان جلب‌کننده و بعنوان عوامل دفاعی

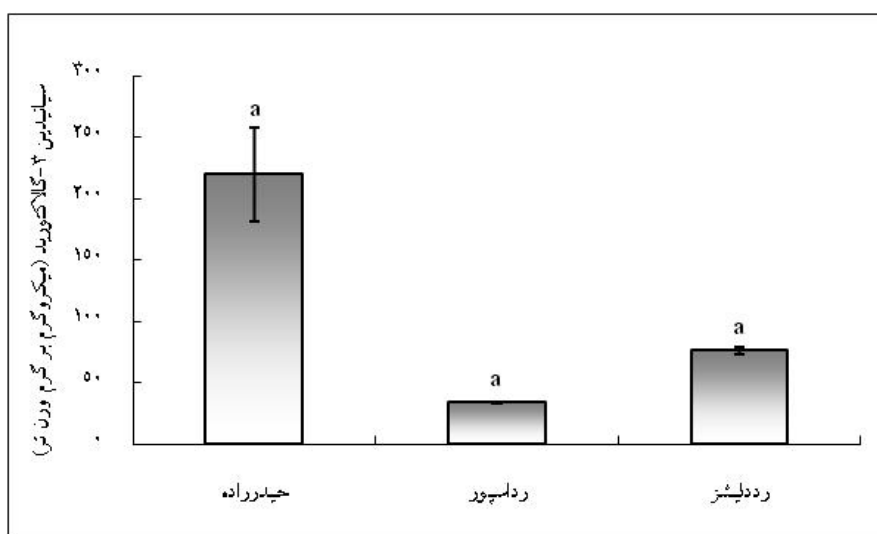
مقدار سیانیدین ۳-گالاکتوزید در پوست ارقام قرمز 'حیدرزاده'، 'رد اسپور' و 'رد دلشیز' نیز اندازه‌گیری شد. تفاوت بین ارقام از این نظر معنی‌دار نبود. بیشترین مقدار آنتوسیانین متعلق به پوست رقم 'حیدرزاده' بود و بعد از آن به ترتیب ارقام 'رد دلشیز' و 'رد اسپور' قرار داشتند (شکل ۶).

میزان فنل کل و درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی پوست و گوشت ارقام مورد مطالعه از نظر مقدار فنل کل و درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز دارای اختلاف معنی‌داری بودند.

همان طور که شکل ۷ و ۸ نشان می‌دهد میزان ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی موجود در پوست و گوشت هر رقم متفاوت است

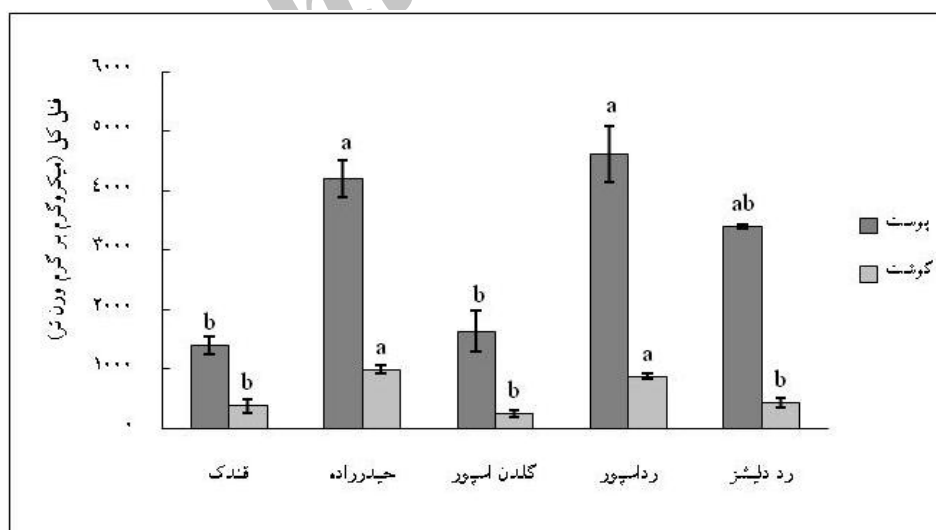
همان طور که شکل ۷ و ۸ نشان می‌دهد ارقام دارای فنل کل بیشتر فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری هم دارند و از طرف دیگر بیان کردیم که پوست دارای فنل کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت به گوشت است، بعبارت دیگر نتایج بیان کننده وجود ارتباط مستقیم بین میزان فنل کل و درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی هستند. نتایج حاصل از تجزیه رگرسیونی داده‌های مربوط به فنل کل (X) و فعالیت آنتی‌اکسیدانی (Y) پوست و گوشت نیز وجود این ارتباط مثبت را تأیید کرد (شکل ۹ و ۱۰).

در برابر پاتوژن‌ها و شکارگرها بیشتر در بافت‌های پوستی اندام‌های گیاهی تجمع می‌یابند (۸). یافته‌های حاصل از اشعه‌دهی به گوشت نشان داده است که عوامل محیطی تأثیر بسیار شدیدی بر سنتز این ترکیبات دارند، به طوری که چنانچه گوشت نیز در معرض نور قرار گیرد گروه‌های مختلف ترکیبات فنلی را سنتز خواهد کرد (۶). در واقع می‌توان چنین بیان کرد که نور سبب تحریک و افزایش سنتز فلاونوئیدها می‌شود و پوست سیب به دلیل اینکه در معرض تابش مستقیم نور خورشید قرار دارد دارای ترکیبات فنلی بیشتری نسبت به گوشت است.



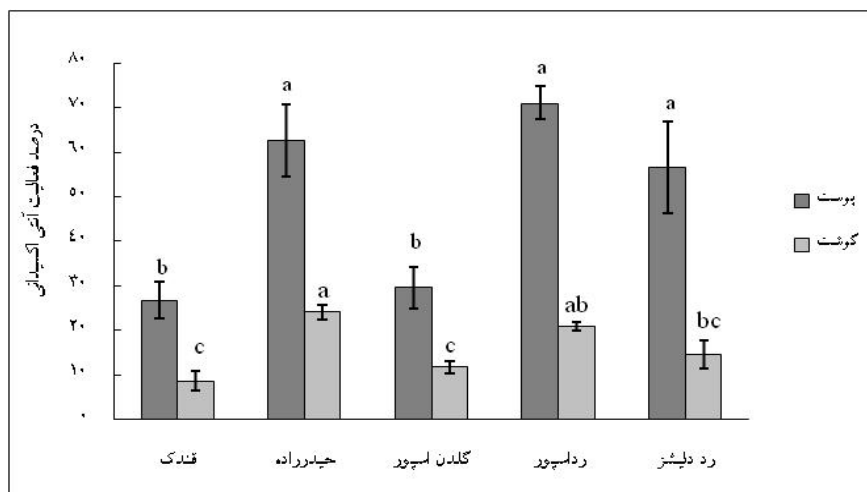
شکل ۶- مقدار سیانیدین ۳-گالاکتوزید در پوست ارقام مختلف

حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است. خط عمودی نشان دهنده خطای استاندارد از میانگین (\pm SE) است.



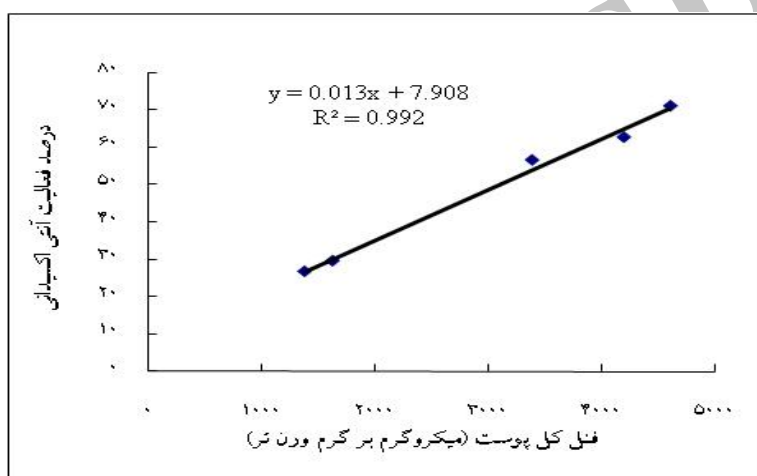
شکل ۷- مقدار فنل کل موجود در پوست و گوشت ارقام مختلف

حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است. خط عمودی نشان دهنده خطای استاندارد از میانگین (\pm SE) است.

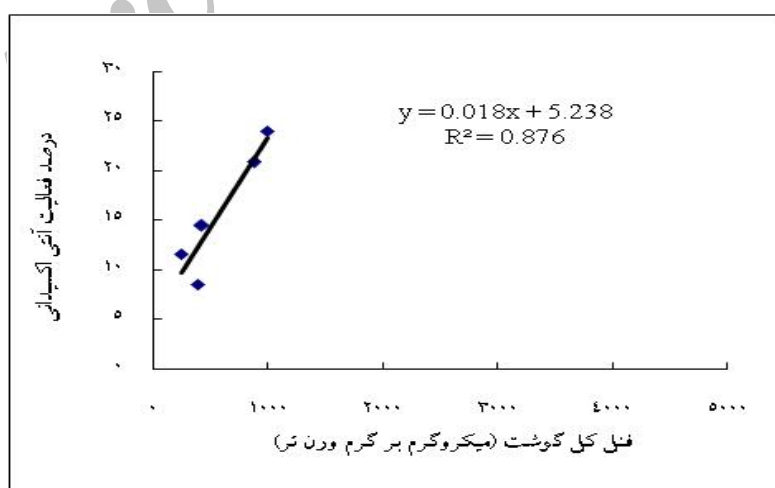


شکل ۸- مقدار فعالیت آنتی‌اکسیدانی موجود در پوست و گوشت ارقام مختلف

حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است. خط عمودی نشان دهنده خطای استاندارد از میانگین (± SE) است.



شکل ۹- ارتباط رگرسیونی بین فنل کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی پوست



شکل ۱۰- ارتباط رگرسیونی بین فنل کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گوشت

منابع

- 1- Alonso-Salces R.M., Korta E., Barranco A., Berrueta L.A., Gallo B. and Vicente F. 2001. Pressurized liquid extraction for the determination of polyphenol in apple. *Journal of Chromatography A*. 933: 37-43.
- 2- Amzad Hossain M., Salehuddin S.M., Kabir M.J., Rahman S.M.M. and Vasatha Rupasinghe H.P. 2009. Sinensetin, rutin 3-hydroxyl- 5, 6, 7, 4-tetramethoxy flavone and rosmarinic acid content and antioxidative effect of the skin of apple fruit. *Journal of Food Chemistry*. 113: 185- 190.
- 3- Awad M.A. and de Jager A. 2002. Relationship between fruit nutrients and concentrations of flavonoids and chlorogenic acid in 'Elstar' apple skin. *Scientia Horticulturae*. 92: 265-276.
- 4- Awad M.A., de Jager A. and van Westing L.M. 2000. Flavonoid and chlorogenic acid levels in apple fruit: characterization of variation. *Scientia Horticulturae*. 83: 249-263.
- 5- Boyer J. and Liu R.H. 2004. Apple phytochemicals and their health benefits. *Journal of Nutrition* 3: 5.
- 6- Bakhshi D. and Arakawa O. 2006. Effects of UV-B irradiation on phenolic compound accumulation and antioxidant activity in 'Jonathan' apple influenced by bagging, temperature and maturation. *Journal of Food, Agriculture & Environment*. 4 (1):75-79.
- 7- Chinici F., Bendini A., Gaiani A. and Riponi C. 2004. Radical scavenging activities of peels and pulps from cv. Golden Delicious apples as related to their phenolic composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52: 4684-4689.
- 8- D Abrosca B., Pacifico S., Cefarelli G., Mastellone C. and Fiorentino A. 2007. Limoncella apple, an Italian apple cultivar: phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity. *Journal of Food Chemistry*. 104: 1333-1337.
- 9- Drogoudi P.D., Michailidis Z. and Pantelidis G. 2008. Peel and flesh antioxidant content and harvest quality characteristics of seven apple cultivars. *Scientia Horticulturae*. 115: 149-153
- 10- Du A., Li M., Ma F. and Liang D. 2009. Antioxidant capacity and the relationship with polyphenol and Vitamin C in Actinidia fruits. *Journal of Food Chemistry*. 113: 557-562.
- 11- Einbod L.S., Reynertson K.A., Luo X.D., Basile M.J. and Kennelly E.J. 2004. Anthocyanin antioxidant from edible fruits. *Journal of Food Chemistry*. 84: 23-28.
- 12- Erdman J.W., Balentine D., Arab L., Beecher G., Dwyer J.T., Folts J., Harnly J., Hollman P., Keen C.L., Mazza G., Messina M., Scalbert A., Vita J., Williamson G. and Burrowes J. 2007. Flavonoids and heart health: Proceedings of the ILSI North America flavonoids workshop. *Journal of Nutrition*. 137: 718S-737S.
- 13- Khanizadeh Sh., Tsao R., Rekika D., Yang R., Charles M.T. and Rupasinghe H.P.V. 2008. Polyphenol composition and total antioxidant capacity of selected apple genotypes for processing. *Journal of Food Composition and analysis*. 21: 396-401.
- 14- Lata B., Trampczynska A. and Paczesna J. 2009. Cultivar variation in apple peel and whole fruit phenolic composition. *Journal of Scientia Horticulturae*. 121: 171-186.
- 15- Lister C.E., Lancaster J.E. and Sutton K.H. 1994. Developmental changes in the concentration and composition of flavonoids in skin of a red and a green apple cultivar. *Journal of Science of Food and Agriculture*. 64: 155-161.
- 16- Markowski J. and Plochanski W. 2006. Determination of phenolic compounds in apples and processed apple products. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*. 14: (Suppl. 2).
- 17- Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C. and Jimenez L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal Clinical Nutrition*. 79: 727-747.
- 18- Moskaug J., Carlsen H., Myhrstad M.C. and Blomhoff R. 2005. Polyphenols and glutathione synthesis regulation. *Journal of Clinical Nutrition*. 81: 277-283.
- 19- Podsedek A., Wilska-Jeszka J. and Anders B. 2000. Compositional characterization of some apple varieties. *Eur Food Res Technol*. 210: 268-272.
- 20- Tabart J., Kevers C., Pincemail J., Ddefraigne J.O. and Dommes J. 2008. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Journal of Food Chemistry*. 113: 1226-1233.
- 21- Van der Sluis A., Dekker M., de Jager A. and Jongen W. 2001. Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: effect of cultivar, harvest year and storage conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49: 3606-3613.
- 22- Vasco C., Ruales J. and Kamal-Eldin A. 2008. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Journal of Food Chemistry*. 111: 816-823.
- 23- Veberic R., Trobec M., Herbingger K., Hofer M., Grill D. and Stampar F. 2005. Phenolic compounds in some apple (*Malus domestica* Borkh) cultivars of organic and integrated production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 85: 1687-1694.