ارزیابی مقدار کلروژنیک اسید، فلاونوئیدها و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ۱۳ رقم ایرانی و خارجی سیب

Evaluation of Content of Chlorogenic Acid, Flavonoids and Antioxidant Potential of 13 Native and Foreign Apple Cultivars

انسیه قربانی[۱] و داود بخشی[۲*]

چکیده

در پژوهش حاضر، برخی از ترکیبات فنلی پوست، فنل کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی پوست و گوشت ۱۳ رقم سیب بومی و وارداتی پرورش یافته در کلکسیون سیب موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر واقع در کمال آباد کرج مورد مطالعه قرار گرفت. ارقام مورد مطالعه از نظر ترکیبات اندازه‌گیری شده اختلاف معنی‌داری با هم داشتند. در میان این ارقام، پوست رقم پائیزه زرد مشهد بیشترین مقدار کلروژنیک اسید و پوست رقم جین هاردی بیشترین مقدار کاتچین، فلوریدزین و کوئرستین ۳-گالاکتوزید را دارا بودند. بیش‌ترین مقدار سیانیدین ۳-گالاکتوزید در پوست رقم آیدارد یافت شد. پوست رقم دلیشز و گوشت رقم استارکان روژ بیش‌ترین مقدار فنل کل و فعالیت آنتی اکسیدانی را نشان دادند. ارتباط مثبت و معنی‌داری بین مقدار فنل کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی پوست (**۰/۸۶) و گوشت (**۰/۹۳) مشاهده شد. تجزیه خوشه‌ای بر اساس فعالیت آنتی‌اکسیدانی پوست و گوشت، ارقام مورد مطالعه را در سه گروه کاملاً مجزا با فعالیت آنتی‌اکسیدانی زیاد، متوسط و کم دسته بندی کرد. بر اساس این دسته‌بندی دو رقم 'استارکان روژ' و 'شیشه‌ای تبریز'، با داشتن ظرفیت آنتی‌اکسیدانی زیاد در پوست و گوشت از نظر فواید سلامتی به‌عنوان ارقام بسیار ارزشمند معرفی شدند.

واژه‌های کلیدی: کوئرستین ۳-گالاکتوزید، کاتچین، کلروژنیک اسید، فنل کل، فعالیت آنتی اکسیدانی

Archive of SID

۱ و ۲. به‌ترتیب دانشجوی دکتری و استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت
*: نویسنده مسوول Email: bakhshi-d@guilan.ac.ir

www.SID.ir

مقدمه

ترکیبات فنلی، گروهی از متابولیت‌های ثانویه گیاهی هستند که طی رشد و نمو گیاه با هدایت عوامل ژنتیکی و در پاسخ به محرک‌های محیطی از جمله آلودگی، زخم و تابش فرا بنفش ساخته می‌شوند که از میان آن‌ها می توان به انواع لیگنان‌ها، لیگنین‌ها، فنل‌های ساده، اسیدهای فنلی و فلاونوئیدها اشاره کرد (*استالیکاس*[1]، 2007). این ترکیبات بخش جدانشدنی در رژیم غذایی بشر بوده و به‌خاطر ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی قوی و ضد سرطانی، بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند (*لامبرت*[2] و همکاران، 2005).

در بین گیاهان و میوه‌ها، ترکیبات فنلی به مقدار فراوان در چای، سبزی‌ها و میوه‌هایی مانند سیب یافت می‌شوند (*اسکارپا و گنزالز*[3]، 1998). در آزمایش *وینسون*[4] و همکاران (2001) که در آن ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ۲۰ میوه متفاوت اندازه‌گیری شد، سیب در جایگاه هشتم قرار گرفت. خانی‌زاده و همکاران (2008) بیان کردند که ارقام مختلف سیب منبع بسیار غنی از ترکیبات فنلی هستند و به همین سبب دارای ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بالایی هستند. طبق نتایج *لی*[5] و همکاران (2003) مواد فنلی موجود در سیب بیش از ۸۰ درصد ظرفیت آنتی‌اکسیدانی میوه سیب را باعث می‌شوند که البته این مقدار با توجه به نوع رقم و شرایط آب و هوایی منطقه پرورش آن بسیار متفاوت است.

لاچمن[6] و همکاران (2006) طی مطالعه ۱۵ رقم مختلف سیب بیان کردند که ارقام مختلف دارای تفاوت معنی‌داری از نظر میزان پلی‌فنل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی هستند. خانی‌زاده و همکاران (2008) گزارش کردند که توزیع ترکیبات فنلی در میان بافت‌های مختلف میوه سیب نیز متفاوت است، به‌طوری که بیش‌ترین مقدار فلاونوئیدهایی مانند کوئرستین ۳-گالاکتوزید، آنتوسیانین‌ها، کاتچین و فلوریدزین در پوست و بیش‌ترین مقدار کلروژنیک اسید در گوشت وجود دارد. *ابرهارت*[7] و همکاران (2000) بیان کردند که بخش عمده‌ای از فلاونوئیدها و اسیدهای فنلی میوه‌ی سیب در پوست آن انباشته شده است. آن‌ها ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پوست سیب را هم بیشتر از گوشت آن گزارش کردند. *وبریک*[8] و همکاران (2005) نیز گزارش کردند که پلی فنل‌های پوست سیب نسبت به گوشت سهم بیشتری در فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل دارند.

ترکیبات فنلی موجود در ارقام مختلف سیب علاوه بر ویژگی آنتی‌اکسیدانی، به خاطر تاثیر در کیفیت حسی میوه تازه و محصولات فرآوری شده از قبیل رنگ، گسی و تلخی آب میوه مورد توجه هستند (*ون‌در اسلویس*[9] و همکاران، 2002). هم‌چنین برخی ترکیبات فنلی، مانند هیدروکسی سینامیک اسیدها، پیش‌ماده ترکیبات فرار و معطر آب میوه هستند و برخی دیگر از این ترکیبات فنلی از جمله کلروژنیک اسید نقش مهمی در قهوه‌ای شدن و تغییر رنگ فرآورده‌های سیب دارند (خانی‌زاده و همکاران، 2008).

با توجه به موارد یادشده و نیز اهمیت ترکیبات فنلی موجود در گیاهان، به‌ویژه میوه ارزشمندی مانند سیب در تامین سلامتی مصرف کننده‌ها، لزوم مطالعه ترکیبات فنلی ارقام مختلف و تهیه اطلاعات دقیق بر اساس شرایط جغرافیایی ضروری به‌نظر می‌رسد. از آن‌جایی که از دیرباز ارقام محلی بسیار ارزشمند سیب در قسمت‌های مختلف ایران پرورش می‌یافته‌اند که متاسفانه به دلیل ورود ارقام خارجی به کشور، ارقام بومی و محلی مورد غفلت واقع شده‌اند، در این مطالعه مقدار و نوع ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی چندین رقم سیب بومی ایران به‌صورت مقایسه با چند رقم وارداتی در منطقه کرج مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

این پژوهش در سال ۱۳۸۷ روی شش رقم سیب بومی ایران شامل پائیزه زرد مشهد، اردبیل، بشقابی بلخی، مربائی، شیشه‌ای تبریز، آزایش و هفت رقم وارداتی شامل گراونشتاین، استارکان روژ، امپایر آل رد، آیدارد، جین‌هاردی، دلیشز و اورلئان از کلکسیون ارقام تجاری سیب واقع در کمال آباد کرج (زیر نظر بخش تحقیقات باغبانی موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه تهال و بذر) انجام شد. تمام ارقام مورد مطالعه روی پایه‌های بذری پیوند شده‌اند و سن درختان در زمان انجام این تحقیق ۱۶ سال بود.

1. Stalikas
2. Lambert *et al.*
3. Escarpa and Gonzalez
4. Vinson *et al.*
5. Lee *et al.*
6. Lachman *et al.*
7. Eberhardt *et al.*
8. Veberic *et al.*
9. Van der Sluis *et al.*

Archive of SID
www.SID.ir

مواد شیمیایی

در این پژوهش از استانداردهای (+)- کاتچین، کوئرستین ۳-گالاکتوزید، سیانیدین کلراید (Extrasynthese، فرانسه)، فلوریدزین (Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) و کلروژنیک اسید (Cayman Chemical Co. (Japan))، رادیکال آزاد DPPH (Sigma-Aldrich) و هم-چنین فولین (Merck) استفاده شد. حلال‌های مورد استفاده برای استخراج، کروماتوگرافی و اسپکتروفتومتری دارای درجه HPLC و تولید شرکت Merck بودند.

استخراج ترکیبات فنلی

تعداد ۱۰ میوه از هر رقم بر اساس تعداد روز بعد از تمام گل برداشت و به آزمایشگاه منتقل شدند. پس از شستشوی میوه‌ها، پوست و گوشت آن‌ها جدا شد. برای استخراج ترکیبات فنلی از روش *بخشی و آراکاوا*[1] (2006) استفاده شد. مقدار دو گرم از پوست و گوشت به‌طور جداگانه با استفاده از نیتروژن مایع پودر و سپس دو میلی‌لیتر حلال استخراج، متشکل از ۸۵٪ متانول و ۱۵٪ استیک اسید، به آن اضافه شد. به‌منظور انجام عمل استخراج، نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در یخچال با دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس با دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (MERMLE: Z233M-2) شدند. بعد از سانتریفیوژ، حدود ۲۰۰ میکرولیتر از بخش روشناور نمونه‌ها از فیلتر سرسرنگی یکبار مصرف با قطر منافذ ۰/۴۵ میکرومتر عبور داده شد.

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

تعیین اجزای تشکیل دهنده مواد فنلی نمونه‌ها با استفاده از سیستم HPLC، Waters و Breeze system MA (USA)، مجهز به یک پمپ دوتایی (binary) مدل Waters و شناساگر UV-Visible (Waters Dual λ Absorbance2487) ساخت امریکا صورت گرفت. جداسازی ترکیبات فنلی در یک ستون Symentery C18 (۱۵۰×۴/۶ میلی‌متر با قطر منافذ ۵ میکرومتر، (Waters, Dublin Ireland)) با استفاده از دو حلال A (۹۵ درصد آب: ۵ درصد متانول (HPLC grade) و B (۵ درصد آب: ۹۵ درصد متانول) به‌عنوان فاز حامل، با pH حدود سه انجام شد. سرعت جریان فاز متحرک داخل ستون یک میلی‌لیتر در دقیقه بود که نسبت حلال‌های A و B در زمان شروع به‌ترتیب ۹۰٪ و ۱۰٪ بود که تا دقیقه ۲۰ به ۵۵٪ و ۴۵٪ و تا دقیقه ۳۰ به ۴۵٪ و ۵۵٪ رسید. حجم تزریق ۵۰ میکرولیتر بود. ترکیبات فنلی اندازه‌گیری شده در این پژوهش شامل کلروژنیک اسید، کاتچین، فلوریدزین، کوئرستین ۳-گالاکتوزید، سیانیدین ۳-گالاکتوزید بودند. برای اندازه‌گیری ترکیبات فوق شناساگر به‌ترتیب در طول-موج‌های ۳۲۰، ۲۸۰، ۲۸۰، ۳۵۰ و ۵۳۰ نانومتر تنظیم شد. به‌منظور آنالیز کمی و کیفی، کروماتوگرام‌های حاصل از تزریق هر نمونه (شکل ۲) در هر تیمار با کروماتوگرام‌های به دست آمده از تزریق استانداردهای مربوطه (شکل ۱) مقایسه و در نهایت غلظت این ترکیبات برحسب میکروگرم در یک گرم بافت تازه محاسبه شد (*بخشی و آراکاوا*، 2006).

اندازه‌گیری مقدار فنل کل

میزان فنل کل در عصاره‌های پوست و گوشت با شناساگر Folin-Ciocalteu و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (JENWAY–6405 UV/Vis) اندازه‌گیری شد (*دی آنجلو*[2] و همکاران، 2007). به‌علت بالا بودن غلظت ترکیبات فنلی در عصاره‌های پوست و گوشت نمونه‌های سیب، ابتدا نمونه‌ها ۲۰ بار رقیق شدند. سپس به ۱۲۵ میکرولیتر از هر یک از این نمونه‌ها ۳۷۵ میکرولیتر آب، ۲/۵ میلی‌لیتر فولین ۱۰ درصد اضافه شد و پس از ۶ دقیقه، ۲ میلی‌لیتر کربنات‌سدیم ۷/۵ درصد اضافه شد. محلول به دست آمده به‌مدت ۱/۵ ساعت در تاریکی و در دمای اتاق نگهداری و پس از آن میزان جذب در طول موج ۷۶۰ نانومتر اندازه-گیری شد. میزان فنل کل از روی میزان جذب نمونه و مقایسه آن با استاندارد، بر حسب میکروگرم گالیک اسید در یک گرم بافت تازه بیان شد.

تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها، از طریق خنثی-کنندگی رادیکال آزاد DPPH (۲و۲ دی‌فنیل۱- پیکریل هیدرازیل) تعیین شد (*دی آنجلو* و همکاران، 2007). برای این منظور به ۵۰ میکرولیتر از عصاره‌های رقیق شده نمونه-های پوست و گوشت (به‌طور جداگانه) ۹۵۰ میکرولیتر محلول DPPH ۰/۱ نرمال اضافه شد. محلول حاصل به سرعت به هم زده شد و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در یک محفظه تاریک در دمای اتاق نگهداری شد. سپس میزان جذب استاندارد و نمونه با استفاده از دستگاه ا سپکتروفتومتر (JENWAY–6105 UV/Vis) در طول موج ۵۱۷ نانومتر

1. Bakhshi and Arakawa

2. D' Angelo

www.SID.ir

تعیین شد. این آزمایش برای نمونه‌های پوست و گوشت هر رقم به‌طور جداگانه در ۳ تکرار انجام شد. ظرفیت آنتی-اکسیدانی عصاره‌ها به‌صورت درصد خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد DPPH با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد:

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

که در آن، $\%DPPH_{sc}$ نشان دهنده‌ی درصد بازدارندگی، A_{cont} نشان دهنده‌ی میزان جذب DPPH خالص و A_{samp} بیان‌گر میزان جذب نمونه است.

آنالیز آماری

تجزیه واریانس ویژگی‌های مورد مطالعه و مقایسه میانگین آن‌ها به روش دانکن به وسیله نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ انجام شد. به‌منظور انجام تجزیه کلاستر، از روش «حداقل واریانس درون گروهی وارد» استفاده شد.

نتایج و بحث

مقدار و نوع ترکیبات فنلی

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که ارقام مورد مطالعه از نظر تمام ترکیبات فنلی اندازه‌گیری شده دارای تفاوت معنی‌داری هستند. در بین ارقام مورد مطالعه رقم پائیزه زرد مشهد دارای بیش‌ترین و رقم اورلئان دارای کم‌ترین مقدار کلروژنیک اسید بود (جدول ۱). فنیل آلانین پیش ماده سنتز ترکیبات فنلی (اسیدهای فنلی و فلاونوئیدها) است. سنتز ترکیبات فنلی شامل دو مسیر فنیل پروپانوئید (سنتز اسیدهای فنلی) و مسیر سنتز فلاونوئیدهاست (بخشی و همکاران، ۱۳۹۰). با توجه به وجود این دو مسیر، احتمالا فنیل آلانین حاصل از مسیر شیکیمات در رقم پائیزه زرد مشهد نسبت به رقم اورلئان بیشتر وارد مسیر سنتز کلروژنیک اسید شده است که اثبات این امر نیازمند مطالعات بیشتر روی ارقام مختلف در مناطق آب و هوایی متفاوت است.

جدول ۱: مقدار ترکیبات فنلی اندازه‌گیری شده در ۱۳ رقم سیب بومی و وارداتی ایران

Table 1: Phenolic compound content of 13 native and imported apple cultivars in Iran

Phenolic compounds (µg g^{-1}FW) ترکیبات فنلی (میکرو گرم در گرم وزن تر)					Cultivars ارقام
Cyanidin 3-galactoside	Quercetin 3-galactoside	Phloridzin	Catechin	Chlorogenic acid	
ND	323.47^{bcd}	183.90^{bcd}	26.13^{d}	186.36^{a}	Paeez-e Zard-e Mashhad
31.56	167.12^{d}	251.39^{a-d}	141.72^{a-d}	20.18^{cd}	Gravnesteine
28.32	221.62^{cd}	399.45^{ab}	148.88^{a-d}	47.34^{abc}	Ardebil-e 2
12.64	97.37^{d}	55.23^{d}	119.16^{a-d}	153.89^{a}	Starkan Roj
53.88	567.96^{a}	324.16^{abc}	222.63^{ab}	17.61^{cd}	Empar All Red
ND	262.72^{bcd}	80.13^{d}	85.03^{dc}	51.92^{a}	Boshghabi-e Balkhi
ND	414.95^{abc}	173.21^{cd}	102.9^{bcd}	153.89^{a}	Morabaee
ND	266.05^{bcd}	111.23^{cd}	54.09^{cd}	92.17^{ab}	Shishee-e Tabriz
106.29^{a}	170.71^{d}	91.17^{d}	16.67^{d}	24.36^{bcd}	Idared
ND	465.61^{ab}	253.88^{a-d}	28.24^{d}	8.85^{d}	Azaiesh
41.57^{bc}	614.48^{a}	429.93^{a}	240.59^{a}	7.79^{d}	Jeanne Hardy
10.70^{c}	107.20^{d}	138.65^{cd}	185.92^{abc}	23.16^{bcd}	Delicious
12.82^{c}	229.48^{cd}	262.95^{a-d}	135.37^{a-d}	1.20^{e}	Orlean

در هر ستون، اعداد دارای حروف مشابه از نظر آماری در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی داری ندارند.

Within each column means followed by the same letters are not significantly different at 5%.

ND: (Not detectable)

Archive of SID

www.SID.ir

عواد[1] و همکاران (2000) گزارش کردند که میزان کلروژنیک اسید و فلاونوئیدها در ارقام مختلف تفاوت معنی‌داری نشان می‌دهند. در تحقیق حاضر نیز، ژنوتیپ‌های مورد بررسی تفاوت مشهودی در میزان کلروژنیک اسید نشان دادند که این یافته گزارش‌های سایر پژوهش‌گران را مبنی بر تاثیر ژنوتیپ بر سنتز و انباشت کلروژنیک اسید را تایید می‌کند.

رقم جین هاردی و رقم آیدارد به‌ترتیب دارای بیش‌ترین و کم‌ترین مقدار کاتچین بودند. این امر نشان دهنده نقش مهم ژنوتیپ در سنتز این ترکیبات است. به‌علاوه، *سولوچنکو*[2] و همکاران (2001) گزارش کردند که کاتچین نقش مهمی در جذب اشعه آسیب رسان UV دارد. به‌طور کلی می‌توان این‌طور بیان کرد که مقدار کاتچین علاوه بر ژنوتیپ تحت تاثیر عوامل محیطی نیز قرار دارد و این تفاوت در مقدار کاتچین ارقام مختلف می‌تواند بیان کننده این نکته باشد که آستانه تحریک بیان ژن‌های مربوطه در ارقام و ژنوتیپ‌های مختلف متفاوت است و ارقام مختلف به‌طور متفاوت به عوامل محیطی پاسخ می‌دهند. هر چند گزارش‌هایی مبنی بر عدم تاثیر فاکتورهای اقلیمی به‌ویژه نور بر کاتچین در سیب وجود دارد. از جمله می‌توان به گزارش *عواد* و همکاران (2000) مبنی بر عدم تفاوت معنی‌دار کاتچین در میوه‌های رشد یافته در بخش‌های درونی و بیرونی تاج درخت اشاره کرد.

در میان ارقام مورد آزمایش، رقم جین هاردی بیش‌ترین و رقم استارکان روژ کم‌ترین مقدار فلوریدزین را داشتند (جدول ۱). گزارش *عواد* و همکاران (2000) مبنی بر این که تفاوت معنی‌داری در مقدار فلوریدزین میوه‌های داخل و بخش بیرونی تاج وجود ندارد و نیز این نکته که مقدار فلوریدزین در میوه‌ها از پوست به سمت بذر افزایش می‌یابد، نشانه آن است که بیان ژن‌های کنترل‌کننده سنتز فلوریدزین وابسته به نور نیست و بیشتر تحت تاثیر ژنوتیپ است. به‌علاوه، از آن‌جا که فلوریدزین بیش از ۹۰ درصد ترکیبات فنلی محلول برگ‌های سیب را تشکیل می‌دهد، تفاوت در مقدار این ترکیبات در میوه‌های ارقام مختلف بیان کننده متفاوت بودن میزان انتقال از برگ به میوه یا بیوسنتز آن‌ها در میوه ارقام مختلف است.

بیش‌ترین مقدار کوئرستین ۳- گالاکتوزید در رقم جین هاردی و کم‌ترین مقدار آن در رقم استارکان روژ یافت شد. نتایج حاصل از این آزمایش و مطالعات دیگر، نقش مهم اقلیم و عوامل محیطی از قبیل نور و دما و همچنین تاثیر شرایط جغرافیایی متفاوت بر سنتز ترکیبات کوئرستینی را پررنگ‌تر می‌کند. بر اساس گزارش *عواد*[3] و همکاران (2001) میوه‌های سیب بخش بیرونی تاج درخت دارای کوئرستین ۳- گالاکتوزیدهای بیشتری نسبت به میوه‌های بخش‌های درونی تاج درخت هستند، که بیان کننده نقش نور در سنتز ترکیبات کوئرستینی است. از طرف دیگر در مطالعه *سولوچنکو و شمیتز- ایبرگر*[4] (2003) به نقش ترکیبات کوئرستینی در جذب اشعه UV اشاره شده است. در نتیجه تفاوت بین ارقام مختلف در مقدار این ترکیبات بیان کننده متفاوت بودن آستانه تحریک بیان ژن‌های مربوطه است. می‌توان این‌طور بیان کرد که ارقام دارای ترکیبات کوئرستینی بالاتر احتمالاً دارای مقاومت بیشتری نسبت به تنش UV هستند.

در میان ارقام قرمز مورد مطالعه رقم آیدارد و دلیشز به‌ترتیب دارای بیش‌ترین و کم‌ترین مقدار سیانیدین ۳- گالاکتوزید بودند (جدول ۱). تولید آنتوسیانین در دو مرحله از نمو میوه سیب افزایش می‌یابد: ۱) اوایل نمو، طی فاز تقسیم سلولی شدید و ۲) اواخر نمو، حدود زمان رسیدن میوه (*کوندو*[5] و همکاران، 2002). مرحله اول افزایش مقدار آنتوسیانین در همه ارقام سیب شامل سیب‌های زرد، سبز و قرمز رخ می‌دهد، اما مقدار آن‌ها در مرحله بلوغ ارقام غیر قرمز قابل تشخیص نیستند، اگر چه در مراحل ابتدایی رشد میوه ظاهر می‌شوند. بنابراین به‌نظر می‌رسد در سیب‌های زرد و سبز با بزرگ شدن اندازه میوه در طی رشد میوه، مقدار آنتوسیانین خیلی رقیق می‌شود و در نتیجه قابل شناسایی نیست. به‌همین دلیل در این مطالعه فقط مقدار آنتوسیانین ارقام قرمز اندازه‌گیری شدند. این امر و متفاوت بودن مقدار این ترکیب در ارقام مختلف بیان کننده نقش ژنوتیپ و رقم در سنتز این ترکیبات است. از طرف دیگر متفاوت بودن مقدار آنتوسیانین سیب‌های بخش بیرونی و درونی تاج در مطالعه *عواد* و همکاران (2001)، نقش نور در سنتز این ترکیب را اثبات می‌کند. در نتیجه سنتز آنتوسیانین وابسته به عوامل متعددی از جمله، ژنوتیپ، عوامل فیزیولوژیکی و عوامل محیطی به‌ویژه دما و نور است.

به‌طور کلی، با توجه به نتایج پژوهش حاضر، مبنی بر متفاوت بودن مقدار این ترکیبات در ارقام مختلف و این

1. Awad *et al.*
2. Solovchenko *et al.*
3. Awad *et al.*
4. Solovchenko and Schmitz-Eiberger
5. Kondo *et al.*

Archive of SID
www.SID.ir

موضوع که مواد فنلی از جمله فلاونوئیدها، گیاهان را در برابر نور شدید، اشعه‌ی فرابنفش، پاتوژن‌ها و جانوران علف‌خوار حفظ می‌کنند، می‌توان نتیجه گرفت که پاسخ ارقام مختلف به تنش‌های محیطی متفاوت است. در واقع این امر بیان کننده سطح متفاوت مقاومت ارقام نسبت به تنش‌های محیطی است که این خود زمینه‌ای دیگر از مطالعه این ترکیبات است.

مقدار فنل کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی پوست و گوشت

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها بیان‌گر وجود تفاوت معنی‌دار بین ارقام مورد مطالعه از نظر مقدار فنل کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی پوست و گوشت بود. در این مطالعه پوست رقم دلیشز بیش‌ترین مقدار فنل کل و پوست رقم پائیزه زرد مشهد کم‌ترین مقدار فنل کل را دارا بودند. گوشت رقم استارکان روژ و آزایش نیز به‌ترتیب دارای بیش‌ترین و کم‌ترین مقدار فنل کل بودند (جدول ۲).

در میان ارقام مورد مطالعه پوست رقم دلیشز و گوشت رقم استارکان روژ بیش‌ترین درصد فعالیت آنتی-اکسیدانی را نشان دادند. کم‌ترین درصد فعالیت آنتی-اکسیداتی در پوست رقم پائیزه زرد مشهد و گوشت رقم گراونشتاین یافت شد (جدول ۲). وجود این تفاوت‌ها بین پوست و گوشت ارقام از نظر فنل کل و درصد فعالیت آنتی اکسیدانی به‌طور جداگانه نیز نشان دهنده تاثیر ژنتیک در سنتز این ترکیبات است. همان‌طور که مشخص است مقدار فنل کل پوست ارقام بیشتر از گوشت است. همان‌طور که قربانی و همکاران (۱۳۹۰) بیان کردند تفاوت بین مقدار مواد فنلی پوست و گوشت در واقع بیان کننده این نکته است که سنتز و تجمع این ترکیبات در بافت‌های مختلف متفاوت است. مواد فنلی محافظت کننده گیاه در برابر اشعه ماوراء بنفش و نور شدید خورشید هستند و پوست سیب به دلیل این که به‌طور مستقیم در برابر این عوامل قرار دارد، دارای مواد فنلی بیشتری نسبت به گوشت است. به‌علاوه، پوست سیب دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت به گوشت است. این مطلب را می‌توان به بالاتر بودن مقدار فنل کل پوست در مقایسه با گوشت نسبت داد، زیرا همان‌طور که ضرایب همبستگی بین مقدار فنل کل و فعالیت آنتی-اکسیدانی بین پوست (**۰/۸۶) و گوشت (**۰/۹۳) نیز نشان می‌دهد ارتباط مستقیمی بین درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی و مقدار فنل کل وجود دارد.

جدول ۲: مقدار فنل کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پوست و گوشت ۱۳ رقم سیب بومی و وارداتی ایران

Table 2 :Total phenolic content and antioxidant potential of 13 native and imported apple cultivars in Iran

Antioxidant activity (%) فعالیت آنتی اکسیدانی (درصد)		Total phenolic content (µg g-1FW) مقدار فنل کل (میکروگرم در گرم وزن تر)		Cultivars ارقام
Pulp گوشت	Peel پوست	Pulp گوشت	Peel پوست	
17.92^{bcd}	37.01^{d}	626.1^{cde}	1676.9^{e}	Paeez-e Zard-e Mashhad
13.28^{d}	38.17^{cd}	591.5^{cde}	1988.0^{ed}	Gravnesteine
14.82^{d}	41.47^{bc}	506.3^{de}	2580.3^{cde}	Ardebil-e 2
39.44^{a}	57.35^{abcd}	1859.0^{a}	3177.1^{b-e}	Starkan Roj
16.75^{bcd}	62.14^{ab}	425.6^{e}	3688.7^{bc}	Empar All Red
15.46^{cd}	58.84^{abc}	501.7^{de}	3317.7^{bcd}	Boshghabi-e Balkhi
22.32^{bc}	66.52^{a}	1036.3^{b}	4274/0^{b}	Morabaee
37.61^{a}	40.50^{cd}	1570.9^{a}	2112.5^{de}	Shishee-e Tabriz
17.95^{bcd}	44.13^{bcd}	476.3^{de}	2372.9^{cde}	Idared
18.05^{bcd}	42.94^{bcd}	400.3^{e}	3799.3^{bc}	Azaiesh
18.39^{bcd}	37.90^{cd}	847.3^{bcd}	2398.2^{cde}	Jeanne Hardy
19.17^{bcd}	71.39^{a}	960.2^{bc}	5746.5^{a}	Delicious
22.74^{b}	57.17^{abcd}	1029.4^{b}	3822.0^{bc}	Orlean

در هر ستون، اعداد دارای حروف مشابه از نظر آماری در سطح احتمال ۵ درصدتفاوت معنی داری ندارند.

Within each column means followed by the same letters are not significantly different at 5%.

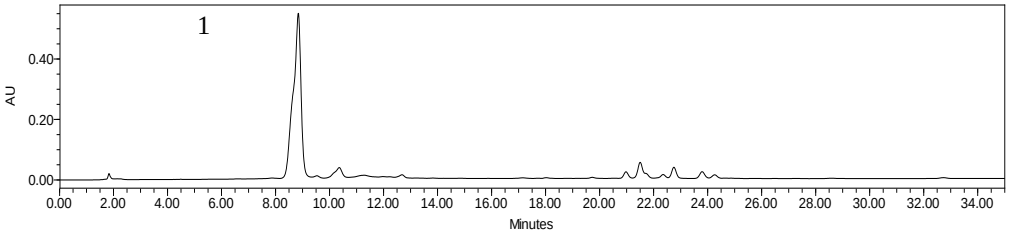
Archive of SID

www.SID.ir

گروه‌بندی ارقام بر اساس فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره پوست و گوشت میوه‌ها

پس از انجام تجزیه کلاستر و برش دندروگرام حاصل از ناحیه ۰/۰۵< X<۰/۱، ارقام در سه کلاستر مجزا قرار گرفتند (شکل ۳). کلاستر اول که بزرگ‌ترین کلاستر بود شامل شش رقم، پائیزه زرد مشهد، گراونشتاین، اردبیل، آیدارد، آزایش و جین هاردی بود. پوست و گوشت ارقام موجود در این کلاستر دارای کم‌ترین درصد فعالیت آنتی-اکسیدانی بودند. کلاستر دوم، کوچک‌ترین کلاستر، شامل دو رقم استارکان روژ و شیشه‌ای تبریز دارای بیش‌ترین مقدار فعالیت آنتی‌اکسیدانی در پوست و گوشت بودند. پوست و گوشت ارقام موجود در کلاستر سوم شامل پنج رقم امپایر آل رد، بشقابی بلخی، مربائی، دلیشز و اورلئان دارای مقدار متوسط فعالیت آنتی‌اکسیدانی بودند.

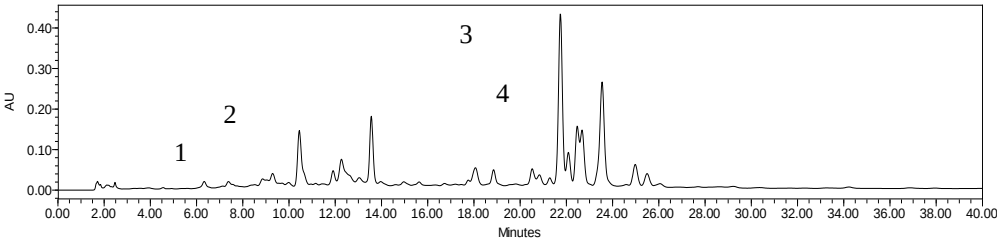
مقدار متوسط فعالیت آنتی‌اکسیدانی در پوست و گوشت کلاستر اول به‌ترتیب ۴۰/۲۷ و ۱۶/۷۳ درصد، در کلاستر دوم ۴۸/۹۲ و ۳۸/۵۲ درصد و در کلاستر سوم ۶۳/۲۱ و ۱۹/۲۹ درصد بود. با توجه به این نتایج می‌توان ارقام موجود در کلاستر دوم شامل استارکان روژ و شیشه‌ای تبریز را به‌عنوان ارقام غنی از نظر فعالیت آنتی‌اکسیدانی معرفی و توصیه کرد.



1: Catechin

شکل ۱: کروماتوگرام استاندارد کاتچین

Figure 1: Chromatogram of Catechin standard

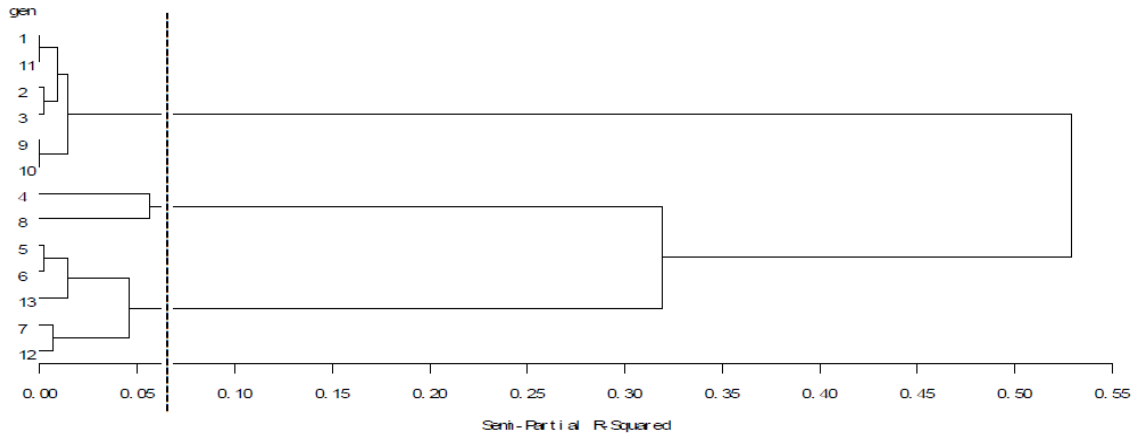


1: Catechin 2: Chlorogenic acid 3: Quercetin 3-galactoside 4: Phloridzin

شکل ۲: کروماتوگرام عصاره پوست سیب رقم 'آزایش'

Figure 2: Chromatogram of 'Azaiesh' apple peel extract

www.SID.ir



1: Paeez-e Zard-e Mashhad 2: Gravnesteine 3: Ardebil-e 2 4: Starkan Roj 5: Empar All Red 6: Boshghabi-e Balkhi 7: Morabaee 8: Shishee-e Tabriz 9: Idared 10: Azaiesh 11: Jeanne Hardy 12: Delicious 13: Orlean

شکل ۳: دندروگرام گروه‌بندی ۱۳ رقم سیب بومی و وارداتی ایران بر اساس ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (٪) پوست و گوشت میوه

Figure 3: Dendrogram of 13 native and imported apple cultivars in Iran based on antioxidant potential (%) in fruit peel and pulp

همان‌طور که پرینس[1] و همکاران (2009) و پودسدک[2] و همکاران (2000) بیان کرده‌اند، به‌دلیل توجه روزافزون تولیدکننده‌ها، مصرف‌کننده‌ها و پژوهشگرها به ترکیبات فنلی به خاطر ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، فراوانی‌شان در رژیم غذایی و نقش احتمالی‌شان در پیش‌گیری از بیماری‌های مختلف و از طرف دیگر کارایی زیاد ترکیبات فنلی موجود در سیب در طبقه‌بندی ارقام برای استفاده‌های مختلف (آب میوه و مصرف تازه خوری) و تاثیر رقم بر مقدار این ترکیبات و در نتیجه فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ارقام مورد مطالعه از نظر دو فاکتور مهم فعالیت آنتی‌اکسیدانی پوست و گوشت گروه‌بندی شدند.

با توجه به نتایج حاصل از پژوهش حاضر، ارقام بومی ایران ذخایر ژنتیکی با ارزشی از لحاظ قابلیت تولید و انباشت مواد فنلی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی هستند. بنابراین، می‌توان از آن‌ها برای انجام تلاقی با ارقام تجاری موجود و ایجاد واریته‌های غنی از ترکیبات فنلی استفاده کرد. هم‌چنین حفاظت، تکثیر و گسترش این ارقام ارزشمند نیز ضروری است.

1. Pernice *et al.*
2. Podsedek *et al.*

Archive of SID
www.SID.ir

منابع

بخشی، د.، حاتم زاده، ع. و قربانی، ا. ۱۳۹۰. بیوشیمی ترکیبات فنلی. انتشارات دانشگاه گیلان، ۳۲۵ صفحه.

قربانی، ا.، بخشی، د.، حاج نجاری، ح.، قاسم نژاد، م. و تقی دوست، پ. ۱۳۸۹. ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی اکسیدانی برخی ارقام ایرانی و وارداتی سیب در منطقه کرج. نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی). جلد ۲۴، شماره ۱، ص ۹۰-۸۳.

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.

Awad, M. A., Wagenmakers, P. S. and De Jager, A. 2001. Effects of light on flavonoid and chlorogenic acid levels in the skin of Jonagold apples. Scientia Horticulturae 88: 289-298.

Bakhshi, D. and Arakawa, O. 2006. Effect of UV-B irradiation on phenolic compounds accumulation and their antioxidant activity in 'Jonathan' apple. Journal of Food, Agriculture and Environment 4(1): 75-79.

D' Angelo, S., Amelia, C., Raimo, M., Salvatore, A., Zappia, V. and Galletti, P. 2007. Effect of Reddening–Ripening on the Antioxidant Activity of Polyphenol Extracts from Cv. 'Annurca' Apple Fruits. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55(24): 9977-9985.

Eberhardt, M. V., Lee, C. Y. and Liu, R. H. 2000. Antioxidant activity of fresh apples. Nature 405(6789): 903–904.

Escaepa, A. and Gonzalez, M. C. 1998. High-performance liquid chromatography with diode-array detection for the determination of phenolic compounds in peel and pulp from different apple varieties. Journal of Chromatography A 823: 331-337.

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.

Kondo, S., Maeda, M., Kobayashi, S. and Honda, C. 2002. Expression of anthocyanin biosynthetic genes in *Malus sylvestris* L. Musta non-red apples. Journal of Horticultural Science & Biotechnology 77: 6.718-723.

Lachman, J., Sulc, M., Sus, J. and Pavlikova, O. 2006. Polyphenol content and antiradical activity in different apple varieties. Journal of Horticaltural Science (Prague) 33: 95-102.

Lambert, J. D., Hong, J., Yang, G. Y., Liao, J. and Yang, C. S. 2005. Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. The American Journal of Clinical Nutrition 81: 284S–291S.

Lee, K. W., Kim, Y. J., Kim, D. O., Lee, H. J. and Lee, C. Y. 2003. Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51(22): 6516–6520.

Pernice, R., Borriello, G., Ferracane, R., Borreli, R. C., Cennamo, F. and Ritieni, A. 2009. Bergamot: A source of natural antioxidants for functionalized fruit juices. Journal of Food Chemistry 112: 545-550.

Podsedek, A., Wilska-Jeszka, J. and Anders, B. 2000. Compositional characterization of some apple varieties. European Food Research and Technology 210: 268-272.

Solovchenko, A. and Schmitz-Eiberger, M. 2003. Significance of skin flavonoids for UV-B-protection in apple fruits. Journal of Experimental Botany 54: 1977-1984.

Solovchenko, A. E., Chivkunova, O. B., Merzlyak, M. N. and Reshetnikova, I. V. 2001. A spectrophotometric analysis of pigment in apples. Russian Journal of Plant Physiology 48: 693-700.

Stalikas, C. D. 2007. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. Journal of Separation Science 30: 3268–3295.

Van Der Sluis, A. A., Dekker, M., Skrede, G. and Jongen, W. M. F. 2002. Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple juice. 1. Effect of existing production methods. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50:7211–7219.

Veberic, R., Trobec, M., Herbinger, 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.

Vinson, J. A., Su, X., Zubik, L. and Bose, P. 2001. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49(11): 5315–5321.

Archive of SID

www.SID.ir

Evaluation of Content of Chlorogenic Acid, Flavonoids and Antioxidant Potential of 13 Native and Foreign Apple Cultivars

Ghorbani[1], E. and Bakhshi[2*], D.

Abstract

In the present study, some phenolic compounds of peel, total phenolics and antioxidant activity of peel and pulp of 13 native and imported apple cultivars growing in apple collection of Seed and Plant Improvement Research Institute (SPII) located in Kamal-Abad, Karaj, were studied. Different cultivars had significant variations regarding all measured compounds. Among the studied cultivars the peel of 'Paeez-e Zard Mashhad' had the highest content of chlorogenic acid and the peel of 'Jeanne Hardy' had the highest content of catechin, phloridzin and quercetin 3-galactoside. The highest content of cyanidin 3-galactoside found in the peel of 'Idared'. The peel of 'Delicious' and the pulp of 'Starkan Roj' showed the highest content of total phenolics and antioxidant activity. The positive and significant relation was observed between total phenolics and antioxidant activity in peel (0.86^{**}) and pulp (0.93^{**}). Cluster analysis based on the antioxidant activity of the peel and pulp, classified the studied cultivars into 3 completely separate groups, with high, medium and low antioxidant activity. Interestingly, based on this grouping, 2 cultivars 'Starkan Roj' and 'Shisheie-e Tabriz', with having high content of antioxidant capacity were considered as very valuable cultivars regarding health benefits.

Keywords: Quercetin 3-galactoside, Catechin, Chlorogenic acid, Total phenolics, Antioxidant activity

Archive of SID

1 and 2. Ph.D Student and Assistant Professor respectively, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, University of Guilan, Rasht

*: Coresponding author Email: bakhshi-d@guilan.ac.ir

www.SID.ir