Archive of SID

مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال هشتم، شماره 1، بهار 1392، صفحات 185-177

ارزیابی فعالیت ضد رادیکالی، آنتی‌اکسیدانی و تعیین ترکیبات فلاونوئیدی میوه‌ی ولیک (*Crataegus elbursensis*)

شهلا سلمانیان[1]، علیرضا صادقی ماهونک[2]، مهران اعلمی[3]، محمد قربانی[4]

1- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
2- نویسنده مسئول: دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، پست الکترونیکی: sadeghiaz@yahoo.com
3- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
4- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: 91/9/22 تاریخ پذیرش: 91/12/5

چکیده

سابقه و هدف: میوه‌ی ولیک اثرات مفیدی بر عملکرد برخی دستگاه‌های بدن مانند قلبی عروقی دارد. از آنجا که این اثرات با حضور ترکیبات آنتی‌اکسیدان به ویژه فلاونوئیدها مرتبط است، هدف از این پژوهش، ارزیابی ترکیبات زیست فعال، میزان ترکیبات فلاونوئیدی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی متانولی این میوه بود.

مواد و روش‌ها: ترکیبات پلی‌فنلی میوه‌ی ولیک به روش غرقابی استخراج شد. میزان کل ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها به روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی متانولی میوه با سه آزمون قدرت احیاءکنندگی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل و مهار رادیکال‌های آزادِ DPPH ارزیابی و با آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT مقایسه شد. اندازه‌گیری فلاونوئیدهای عصاره‌ی میوه با دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا انجام شد.

یافته‌ها: میزان فنل و فلاونوئید کل عصاره‌ی میوه ولیک به ترتیب 1/9± 51/74 میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره و 0/03± 1/56 میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره به دست آمد. در آزمون مهار رادیکال‌های آزاد DPPH، عصاره‌ی متانولی با محدوده‌ی بازدارندگی 17/33 تا 93/41 درصد نسبت به آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT با درصد بازدارندگی در محدوده 67/95 تا 91/04 درصد، عملکرد بهتری نشان داد. در سایر آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی، فعالیت BHT بالاتر از عصاره‌ی میوه‌ی مذکور بود. ارزیابی کیفی و کمی ترکیبات فلاونوئیدی موجود در میوه‌ی ولیک با مقایسه‌ی استانداردهای روتین، کوئرستین و کامپفرول، حاکی از حضور مقدار قابل ملاحظه‌ای روتین (269/17 میکروگرم در گرم بافت خشک) بود.

نتیجه‌گیری: می‌توان میوه‌ی ولیک را به عنوان یک منبع بالقوه از ترکیبات زیست فعال طبیعی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا معرفی کرد.

واژگان کلیدی: میوه‌ی ولیک، عصاره‌ی گیاهی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ترکیبات فنلی

• مقدمه

واکنش‌های اکسیداسیون به دلیل تولید رادیکال‌های آزاد سلامت انسان را به مخاطره می‌اندازند. این رادیکال‌ها آغازگر واکنش‌های اکسیداسیون است که به آسیب یا مرگ سلول‌ها منجر می‌شود (1). یافته‌های علمی حاکی از آن است که میوه‌ها و سبزی‌ها حاوی انواع مختلفی مواد مغذی و غیرمغذی هستند که به آن‌ها ترکیبات فیتوشیمیایی می‌گویند. این ترکیبات از نظر بیوزیستی فعالیت‌های متنوعی دارند که به واسطه آن‌ها اثرات مفیدی بر سلامتی انسان دارند و از ابتلا به برخی بیماری‌های مزمن نظیر انواع سرطان، بیماری‌های قلبی- عروقی و دیابت جلوگیری می‌کنند. یکی از مهم‌ترین عملکردهای این ترکیبات مهار رادیکال‌های آزاد، جلوگیری از اکسیداسیون LDL و شکستن DNA، تقویت دستگاه ایمنی بدن، اثرات ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی آن‌هاست (4-2). آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند استرس اکسیداتیو را در سلول‌ها کاهش دهند. از این رو، تجویز آن‌ها برای درمان بسیاری از

www.SID.ir

Archive of SID

بیماری‌ها مفید و مؤثر است. بسیاری از گونه‌های گیاهی توان آنتی‌اکسیدانی مشابهی با آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی، بدون اثرات جانبی دارند و به عنوان یک جایگزین در صنعت غذا و دارو مورد استفاده قرار می‌گیرند (5).

سیاه ولیک (*Crataegus elbursensis*) درختچه‌ای از خانواده‌ی *گل سرخ* و از جنس *کراتگوس* است که فراوان‌ترین گونه‌ی ولیک بومی ایران است و به وفور در جنگل‌های نواحی شمال کشور یافت می‌شود. درختچه‌ها یا درختان کوچک ولیک به ارتفاع 4 تا 7 متر که گاهی به 10 متر نیز می‌رسد، با برگ‌هایی کوچک و خزان‌کننده به طول 20 تا 30 میلی‌متر هستند و میوه‌هایی کروی به رنگ سیاه یا آبی تیره و به طول تقریبی 8 تا 10 میلی‌متر دارند (6). ولیک منبع غنی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به ویژه فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها است. این ترکیبات زیست فعال اثرات مختلف و مفید دارویی و سلامتی‌بخش دارند؛ شامل: حفاظت قلبی عروقی (اتساع عروق، بهبود خون‌رسانی به ماهیچه‌ی قلب، افزایش جریان خون کرونری)، کاهش فشار خون و کلسترول کل پلاسما، اثرات آنتی‌اکسیدانی و مهار رادیکال‌های آزاد، اثرات ضدویروسی، ضدالتهابی، درمان آنژین، جلوگیری از اکسیداسیون آلفا- توکوفرول و LDL و رفع ناراحتی‌های گوارشی در انسان (8، 7). با وجود پوشش انبوه جنگل‌های شمال کشور از سیاه ولیک، تاکنون هیچ گزارشی مبنی بر سنجش ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی از میوه‌ی آن و ارزیابی فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضدرادیکالی در منابع علمی به دست نیامده است. هدف این پژوهش، بررسی خواص آنتی-اکسیدانی، ضدرادیکالی و تعیین ترکیبات فلاونوئیدی عصاره‌ی متانولی میوه‌ی ولیک ایرانی بود.

• مواد و روش‌ها

آماده سازی عصاره: میوه‌های سیاه ولیک پس از جمع‌آوری از جنگل *شصت کلاته‌ی گرگان* در آذر 1390 در آون 40°C خشک شد. جهت آزمون، میوه‌ها با آسیاب به ذرات ریز تبدیل و از الک با مش 40 گذرانده شدند. سپس عصاره‌ی فنلی با روش خیساندن در حلال متانول 80% تهیه شد. به این ترتیب که 100 میلی‌لیتر حلال به 10 گرم پودر میوه افزوده و مخلوط حاصل به مدت 18 ساعت در دمای 50°C در انکوباتور شیکردار هم زده شد. بعد از این مرحله، بخش جامد به وسیله‌ی کاغذ صافی معمولی جدا شد. عصاره به وسیله‌ی تبخیر کننده‌ی چرخان تحت خلأ در دمای 40°C تغلیظ و در نهایت توسط خشک‌کن انجمادی به پودر تبدیل شد. پودر تا زمان استفاده در ظروف غیر قابل نفوذ به هوا در فریزر 18°C- قرار گرفت. میزان بازده استخراج عصاره 13/1% تعیین شد (9).

اندازه‌گیری میزان کل ترکیبات فنلی: میزان کل ترکیبات فنلی با روش فولین سیوکالتو اندازه‌گیری شد و نتایج بر حسب میلی‌گرم اسید گالیک در گرم عصاره بیان شد. به طور خلاصه 20 میکرولیتر از محلول عصاره (عصاره‌ی فنلی میوه قبل از تغلیظ و خشک شدن) با 1/160 میلی‌لیترآب مقطر و 100 میکرولیتر معرف فولین سیوکالتو مخلوط شد. بعد از گذشت 1 تا 8 دقیقه 300 میکرولیتر محلول کربنات سدیم 20% به آن‌ها افزوده شد. لوله‌های آزمایش بعد از تکان دادن، درون حمام آب با دمای 40°C قرارگرفت و پس از گذشت 30 دقیقه جذب آن‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتردر طول موج 760 نانومتر خوانده شد (10).

اندازه‌گیری میزان کل ترکیبات فلاونوئیدی: میزان کل فلاونوئیدها به روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلرید اندازه‌گیری شد. در این روش 0/5 میلی‌لیتر از محلول عصاره (عصاره‌ی میوه قبل از تغلیظ و خشک شدن) با 1/5 میلی‌لیتر اتانول 95%، 0/1 میلی‌لیتر آلومینیوم کلرید 10%، 0/1 میلی‌لیتر استات پتاسیم یک مولار و 2/8 میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد. بعد از نگهداری نمونه‌ها در دمای اتاق به مدت 30 دقیقه، جذب مخلوط در طول موج 415 نانومتر خوانده شد. به منظور رسم منحنی استاندارد از کوئرستین استفاده شد. نتایج بر حسب میلی‌گرم کوئرستین در هر گرم عصاره بیان شد (11).

ارزیابی فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH : محلول‌هایی با غلظت‌های مختلف (50 تا 500 میکروگرم در میلی‌لیتر) از پودر فنلی و آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT در حلال متانول تهیه شد. یک میلی‌لیتر از محلول متانولیDPPH (با غلظت یک میلی‌مولار) به 3 میلی‌لیتر عصاره افزوده و مخلوط حاصل به شدت هم زده شد. لوله‌های آزمایش به مدت 30 دقیقه در محل تاریک قرارگرفت. بعد از این مدت، میزان جذب در طول موج 517 نانومتر خوانده شد. لازم به ذکر است که در نمونه‌ی کنترل، عصاره با 3 میلی‌لیتر متانول جایگزین شد. در نهایت، درصد مهار رادیکال‌های DPPH توسط عصاره با این فرمول محاسبه شد.

درصد مهار رادیکال آزاد = $(A_c-A_s)/A_c\times100$

www.SID.ir

Archive of SID

در این فرمول A_c و A_s به ترتیب جذب کنترل و جذب نمونه می‌باشند (12).

ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (Total antioxidant capacity): محلول‌هایی با غلظت‌های مختلف (50 تا 500 میکروگرم در میلی‌لیتر) از پودر فنلی، عصاره و آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT تهیه شد. 0/1 میلی‌لیتر از محلول عصاره و 1 میلی‌لیتر از معرف (اسید سولفوریک 0/6 مولار، فسفات سدیم 28 میلی‌مولار و آمونیوم مولیبدات 4 میلی‌مولار) در لوله‌ی اپندورف ریخته شد و پس از دربندی به مدت 1/5 ساعت در حمام آب با دمای 95°C قرار گرفت. پس از سرد کردن، جذب نمونه‌ها در طول موج 695 نانومتر خوانده شد (13).

ارزیابی قدرت احیاءکنندگی: محلول‌هایی با غلظت‌های مختلف (200 تا 800 میکروگرم در میلی‌لیتر) از عصاره و آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT تهیه شد. 1 میلی‌لیتر از محلول عصاره یا آنتی‌اکسیدان سنتزی با 2/5 میلی‌لیتر بافر فسفات (pH=6/6 و M= 0/2) و 2/5 میلی‌لیتر پتاسیم فری‌سیانید (10 گرم در لیتر) مخلوط و به مدت نیم ساعت در حمام آب با دمای 50°C قرار گرفت. سپس 2/5 میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید10 % (وزنی:حجمی) به نمونه‌ها اضافه شد و نمونه‌ها به مدت 10 دقیقه با سرعت 1650 g سانتریفوژ شدند. از محلول رویی پس از سانتریفوژ 2/5 میلی‌لیتر به دقت برداشته و پس از افزودن 2/5 میلی‌لیتر آب مقطر و 0/5 میلی‌لیتر کلرید آهن III (1 گرم در لیتر) جذب نمونه‌ها در طول موج 700 نانومتر خوانده شد (14).

شناسایی و اندازه‌گیری ترکیبات فلاونوئیدی عصاره‌ی میوه با دستگاه HPLC: به منظور تعیین نوع و میزان ترکیبات فلاونوئیدی موجود در عصاره از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا استفاده شد. شناسایی ترکیبات با دستگاه Merck-Hitachi با دتکتور Diode array detector Hitachi L-2450 و ستون Reverse Phase-18 با ابعاد 4/6 × 250 میلی‌متر و اندازه‌ی ذرات 5 میکرومتر انجام شد. فاز متحرک مورد استفاده در این بررسی شامل آب بدون یون: متانول: استونیتریل: اسید استیک: اسید فسفریک به نسبت 139/5: 70: 50: 0/25: 0/25 میلی‌لیتر (حجمی: حجمی) با pH= 2/9، سرعت جریان فاز متحرک در ستون 0/6 میلی-لیتر در دقیقه، سیستم مورد استفاده ایزوکراتیک (Isocratic) و دمای ستون 28°C بود.

برای اندازه‌گیری روتین، کوئرستین و کامپفرول عصاره‌ی ولیک، مقدار 1 گرم از میوه‌ی خشک و آسیاب شده در 30 میلی‌لیتر حلال (متانول 80%) به مدت 24 ساعت در دمای محیط با همزن مغناطیسی هم زده شد. پس از این مرحله، بخش جامد به وسیله‌ی کاغذ صافی واتمن جدا شد و عمل استخراج با حلال تازه مانند قبل تکرار شد. عصاره‌های حاصل از دو مرحله با هم ادغام شدند و بخشی از حلال در دمای 40°C توسط دستگاه تبخیرکننده چرخان تغلیظ شد. سپس میزان 20 میکرولیتر از عصاره بعد از عبور از فیلتر 0/2 میکرون به ستون HPLC تزریق شد. با مقایسه‌ی زمان بازداری (retention time) و سطح زیرِ منحنی نمونه با نمونه‌های استاندارد، میزان کوئرستین، روتین و کامپفرول تعیین و در نهایت بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن خشک میوه بیان شد (15).

تجزیه و تحلیل آماری: در این پژوهش، تیمارها در سه تکرار انجام شد و نتایج حاصل با استفاده از روش آنالیز واریانس (ANOVA) و مقایسه‌ی میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال $P < 0/05$ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SAS.9.1 و نمودارها با نرم افزار Excel انجام شد.

• یافته‌ها

میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی: میزان کل ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی استخراج شده از میوه توسط حلال متانول 80% در جدول 1 نشان داده شده است. میزان کل ترکیبات فنلی عصاره‌ی میوه‌ی ولیک به روش فولین سیوکالتیو (10) و بر اساس معادله‌ی خط منحنی استاندارد گالیک اسید ($y= 0.0676x + 0.0069$, $R^2= 0.9973$) محاسبه شد. میزان کل ترکیبات فلاونوئیدی عصاره‌ی میوه به روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلرید (11) و بر اساس معادله‌ی خط منحنی استاندارد کوئرستین ($y= 14.603x - 0.0035$, $R^2= 0.9993$) اندازه‌گیری شد.

آزمون مهار رادیکال‌های آزاد DPPH: در محدوده‌ی غلظت 50 تا 500 میکروگرم در میلی‌لیتر، درصد مهارکنندگی آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT و عصاره‌ی متانولی میوه به ترتیب 91/04- 67/95 و 93/41- 17/33 درصد اندازه‌گیری شد (شکل 1). فعالیت ضدرادیکالی در عصاره و آنتی‌اکسیدان سنتزی، وابسته به غلظت بود. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی میوه‌ی ولیک تأثیر معنی-

www.SID.ir

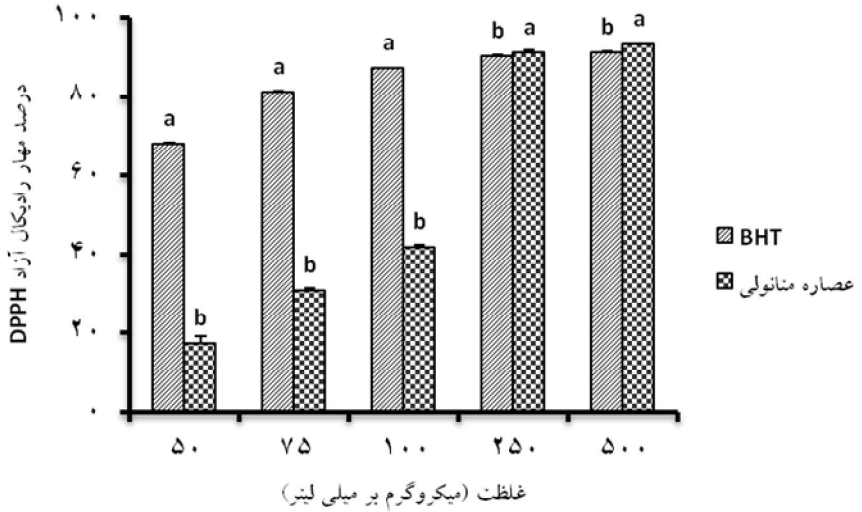
Archive of SID

داری بر مهار رادیکال‌های آزاد DPPH داشت. در سه غلظت 100، 75 و 50 میکروگرم در میلی‌لیتر آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT فعالیت ضدرادیکالی بالاتری نسبت به عصاره‌ی میوه داشت، اما فعالیت ضدرادیکالی آن در غلظت‌های بالاتر کمتر بود و اختلاف معنی‌داری از نظر آماری داشت ($P < 0/05$). بالاتر بودن فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH را می‌توان به محتوای فنلی و فلاونوئیدی عصاره نسبت داد.

آزمون ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل: برای ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدان‌های محلول در آب و محلول در چربی (ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل) از روش فسفومولیبدینوم استفاده شد. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره و آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT وجود دارد ($P<0/05$). ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره‌ی میوه‌ی ولیک و آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT در شکل 2 نشان داده شده است. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی میوه‌ی ولیک وابسته به غلظت بود. به طوری که با افزایش غلظت، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل نیز به طور معنی‌داری ($P < 0/05$) افزایش یافت. در محدوده‌ی غلظتی 50 تا 500 میکروگرم در میلی‌لیتر، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT و عصاره‌ی متانولی میوه‌ی ولیک به ترتیب در محدوده‌ی 0/33 تا 1/52 و 0/2 تا 0/59 میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره تعیین شد. همان طور که از شکل 2 پیداست، در همه‌ی غلظت‌ها آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل بالاتری نسبت به عصاره داشت و عصاره از این نظر قابل رقابت با آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT نبود.

جدول1. میزان کل ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و بازده استخراج عصاره‌ی متانولی میوه‌ی ولیک

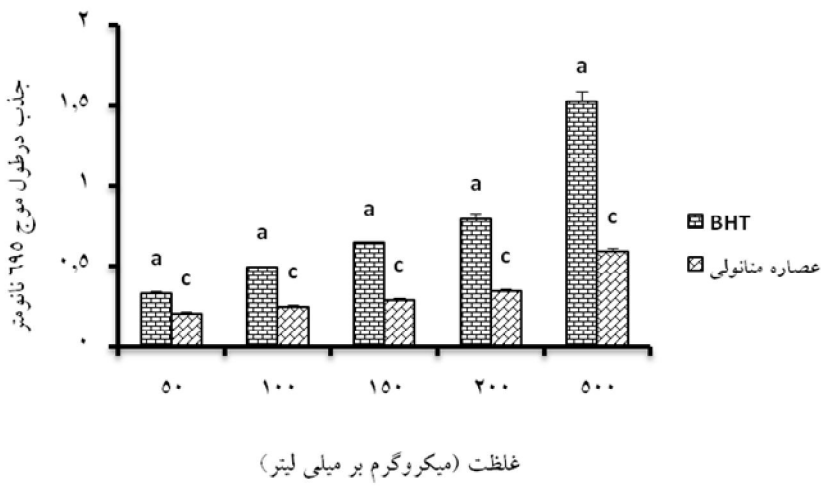
نمونه	فنل کل (میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره)	فلاونوئید کل (میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره)	بازده استخراج (%)
عصاره‌ی متانولی	51/74±1/9	1/56±0/03	13/1±0/9



شکل 1. مقایسه‌ی میانگین درصد مهار DPPH در غلظت‌های مختلف عصاره‌ی متانولی میوه‌ی ولیک و آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT
حروف غیر مشابه در هر غلظت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال 5% است.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل2. مقایسه‌ی میانگین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل غلظت‌های مختلف عصاره‌ی متانولی میوه‌ی ولیک و آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT

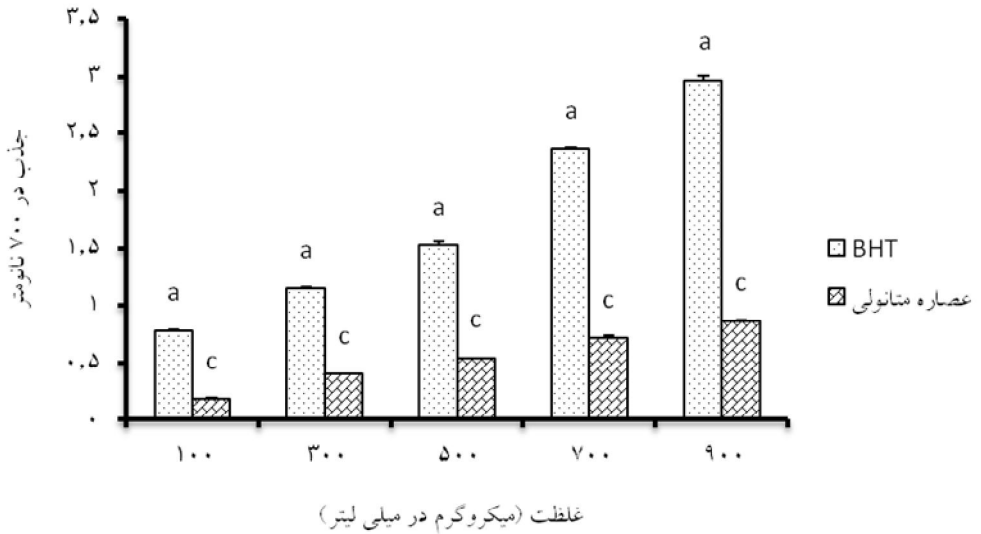
حروف غیر مشابه در هر غلظت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال 5% است.

آزمون قدرت احیاءکنندگی: در این آزمون، تغییر رنگ زرد محلول حاوی عصاره به رنگ‌های سبز و آبی به قدرت احیاءکنندگی ترکیبات موجود در عصاره بستگی دارد. حضور مواد احیاءکننده در محلول به احیای کمپلکس Fe^{3+}/ فری سیانید به Fe^{2+} منجر می‌شود. شکل 3 فعالیت احیاءکنندگی عصاره‌ی متانولی 80 % از میوه‌ی ولیک و آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT را در محدوده‌ی غلظت 100 تا 900 میکروگرم در میلی‌لیتر نشان می‌دهد. افزایش در جذب مخلوطِ واکنش حاکی از قدرت احیاءکنندگی بالای نمونه‌ها است. قدرت احیاءکنندگی عصاره‌ی ولیک با افزایش میزان غلظت عصاره، افزایش یافت و همه‌ی مقادیر، فعالیت بالایی را نشان دادند (شکل 3). نتایج آنالیز واریانس نشان داد که تأثیر غلظت بر قدرت احیاءکنندگی عصاره‌ها و در نتیجه، فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها معنی‌دار است ($P < 0/05$). نتایج مقایسه‌ی میانگین میزان جذب در همه‌ی غلظت‌های مورد بررسی نشان داد که آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT بیشترین قدرت احیاءکنندگی را داراست.

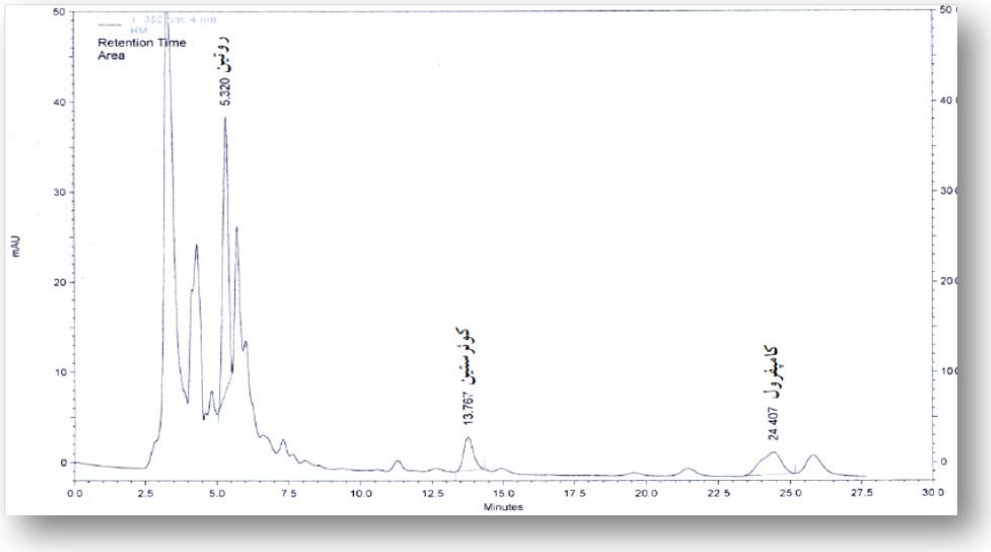
شناسایی و اندازه‌گیری ترکیبات فلاونوئیدی: نوع ترکیبات فلاونوئیدی موجود در عصاره با مقایسه‌ی زمان بازداری پیک‌های نمونه با استانداردهای ترکیبات فلاونوئیدی مشخص شد. فراوان‌ترین ترکیب فلاونوئیدی عصاره، روتین بود و به دلیل قطبیت بالا زودتر از سایر ترکیبات از ستون خارج شد. احتمالاً ساختار قطبی این ترکیب با تمایل زیاد آن برای حل شدن در حلال‌های قطبی همراه است و از این رو ترکیب فلاونوئیدی غالب عصاره است (شکل 4). از بین ترکیبات مورد بررسی، کامپفرول بیشترین زمان بازداری را داشت و آخرین پیک موجود در کروماتوگرام مخلوط استانداردها به این ترکیب مربوط شد. جدول 2 مقدار ترکیبات فلاونوئیدی موجود در عصاره‌ی میوه‌ی ولیک را نشان می‌دهد. از بین سه ترکیب فلاونوئید شناسایی شده، روتین بیشترین مقدار را به خود اختصاص داد و دو فلاونوئید کامپفرول و کوئرستین به ترتیب در مراتب بعدی قرارداشتند.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل3. مقایسه میانگین قدرت احیاءکنندگی غلظت‌های مختلف عصاره‌ی متانولی میوه‌ی ولیک و آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT
حروف غیر مشابه در هر غلظت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال 5% است.



شکل 4. کروماتوگرام ترکیبات فلاونوئیدی عصاره‌ی متانولی میوه‌ی ولیک

جدول 2. ترکیبات فلاونوئیدی (میکروگرم در گرم بافت خشک) موجود در عصاره‌ی متانولی میوه‌ی ولیک

ترکیب فلاونوئید	فرمول ملکولی	زمان بازداری	مقدار
روتین	$C_{27}H_{30}O_{16}$	5/32	269/17
کوئرستین	$C_{15}H_{10}O_7$	13/76	64/84
کامپفرول	$C_{15}H_{10}O_6$	24/4	140/55

www.SID.ir

Archive of SID

• بحث

روش فولین-سیوکالته از متداول‌ترین روش‌های اندازه‌گیری ترکیبات فنلی است. اساس کار در این روش، احیای معرف فولین توسط ترکیبات فنلی در محیط قلیایی و ایجاد کمپلکس آبی رنگ است که حداکثر جذب را در طول موج 760 نانومتر نشان می‌دهد. مخلوط متانول-آب (80 درصد) برای استخراج ترکیبات فنلی به ویژه فلاونوئیدها و اسیدهای فنلی از بافت گیاهی به کار می‌رود (16). نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که میوه‌ی ولیک بومی ایران مقادیر قابل ملاحظه‌ای ترکیبات فنلی (51/74 میلی‌گرم در گرم عصاره) به ویژه فلاونوئیدها دارد. این میزان نسبت به ترکیبات فنلی گزارش شده‌ی موجود در عصاره‌ی متانولی طالبی (1/68 میلی‌گرم در گرم عصاره) بسیار بالاست (17). در کل، افزایش غلظت ترکیبات فنلی به طور مستقیم میزان توانایی عصاره‌های مختلف را در مهار رایکال‌های آزاد افزایش می‌دهد. در غلظت‌های بالاتر ترکیبات فنلی، به دلیل افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل موجود در محیط واکنش، احتمال دادن هیدروژن به رادیکال‌های آزاد و به دنبال آن قدرت مهارکنندگی عصاره افزایش می‌یابد. توانایی مهارکنندگی فنل‌ها به دلیل گروه‌های هیدروکسیل (OH-) و گروه‌های قابل تعویض متوکسی ($-OCH_3$) در ملکول‌هاست (18)، نتایج تحقیق حاضر با نتایج *Young Kil* و همکاران (19)؛ *Shukla* و همکاران (3)؛ *Sun* و همکاران (21) همسو است. این محققان گزارش کردند که فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH عصاره‌های گیاهی به غلظت بستگی دارد و با افزایش غلظت اثر مهارکنندگی شدت می‌یابد. ترکیبات این عصاره توانایی دادن الکترون‌ها به رادیکال‌های آزاد فعال را دارند و در نتیجه واکنش زنجیره‌ای رادیکال‌های آزاد را متوقف می‌کنند. این محققان، فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی عصاره‌های گیاهی را با میزان بالای فنل‌ها و فلاونوئیدهای موجود در عصاره‌ها مرتبط دانستند. در بین ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها ترکیبات آنتی‌اکسیدانی قوی‌تری محسوب می‌شوند. فلاونوئیدها بازدارنده‌های قوی رادیکال‌های هیدروکسیل و پراکسید هستند و تأثیر آن‌ها بر رادیکال‌های سوپراکسید هنوز مشخص نشده است. این ترکیبات می‌توانند حتی زمانی که با یون‌های فلزی کمپلکس تشکیل می‌دهند، بر رادیکال‌های آزاد اثر بگذارند. وجود گروه‌های هیدروکسیل در موقعیت‌های 3 و 5 و گروه‌های اورتودی فنل در ساختار فلاونوئیدها به آن‌ها امکان مهار رادیکال‌های آزاد را می‌دهد. کوئرستین یک فلاونول است و یکی از قوی‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به شمار می‌آید. افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل با قدرت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فلاونوئیدی رابطه‌ی مستقیم دارد (22). نتایج به دست آمده در آنالیز ترکیبات فلاونوئیدی عصاره‌ها، نتایج حاصل از آزمون‌های ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی را تأیید می‌کند.

ترکیبات فلاونوئیدی روتین، کوئرستین و کامپفرول خواص دارویی، ضدباکتری و ضد اکسیداسیونی دارند. اثرات آنتی‌اکسیدانیِ کوئرستین ناشی از شلاته کردن فلزات، مهار کردن رادیکال‌ها، بازدارندگی آنزیمی و تحریک بیان آنزیم‌های محافظتی است. روتین به عنوان یک رنگدانه‌ی طبیعی، پایدارکننده و نگهدارنده‌ی مواد غذایی در صنایع مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد. این ترکیب، فعالیت‌های بیوزیستی گوناگونی از جمله اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و محافظتی روی کبد دارد که برای سلامت انسان مفید است (24، 23). از این رو، بررسی میزان این ترکیبات در میوه به دلیل اثرات دارویی، تغذیه‌ای و خواص آنتی‌اکسیدانی بسیار مهم بود. نتایج به دست آمده‌ی این پژوهش نشان داد که میوه‌ی ولیک به دلیل دارا بودن مقادیر قابل ملاحظه‌ای از ترکیبات فنل و فلاونوئید قدرت آنتی‌اکسیدانی بالایی دارد. حضور ترکیبات فلاونوئیدی نظیر روتین، کوئرستین و کامپفرول در عصاره‌ی میوه با فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجه این عصاره همسو است. با توجه به اثرات نامطلوب آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی بر سلامت انسان، مطالعات بیشتر در زمینه‌ی استخراج، خالص‌سازی و کاربرد عصاره‌ی میوه در سیستم‌های غذایی پیشنهاد می‌شود. در نتیجه، با شناسایی و کاربرد بیشتر ترکیبات زیست فعال میوه‌ی ولیک می‌توان از هدر رفتن مقادیر انبوهی از این گیاه دارویی در مناطق جنگلی شمال کشور جلوگیری کرد.

www.SID.ir

Archive of SID

References

1. Kulshreshtha M, Goswami MV, Rao C, Ashwlayan, V, Yadav S. estimation of antioxidant potential of aqueous extract of *Ficus bengalensis* leaf on gastric ulcer. Int J Pharmaceutical Sci Rev Res 2011; 9(1): 122-6.
2. Nayaka MAH, Sathisha UV, M.Dharmesh S. Cytoprotective and antioxidant activity of free, conjugated and insoluble-bound phenolic acids from swallow root (*Decalepis hamiltonii*). Food Chem 2010; 119: 1307-12.
3. Shukla Sh, Mehta A, Bajpai V.K, Shukla S. In vitro antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. Food Chemical Toxicol 2009; 47: 2338-43.
4. Sahreen S, Rashid Khan M, Ali Khan R. Evaluation of antioxidant activities of various solvent extracts of Carissa opaca fruits. Food Chem 2010; 122: 1205-11.
5. Roy A, Sitalakshmi T, Geetha R.V, Lakshmi T, Vishnu Priya V. *In Vitro* Antioxidant and Free Radical Scavenging Activity of the Ethanolic Extract of *Dioscorea villosa* (Wild Yam) Tubers. Drug Invention Today 2011; 3(9): 214-15.
6. Ghahreman A. Iran's colour flora. Tehran: Research institute of forestes and pastures; 2007 [in Persian].
7. Liu P, Yang B, Kallio H. Characterization of phenolic compounds in Chinese hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bge. var. major) fruit by high performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. Food Chem 2010; 121: 1188-97.
8. Cui HY, Jia XY, Zhang X, Zhang J, Zhang ZQ. Optimization of high-speed counter-current chromatography for separation of polyphenols from the extract of hawthorn (*Crataegus laevigata*) with response surface methodology. Sep Purif Technol 2011; 77: 269-74.
9. Arabshahi DS, Urooj A. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. Food Chem 2007; 102: 1233-40.
10. Slinkard K, Singleton VL. Total phenol analysis; automation and comparison with manual methods. Am J Enol Viticult 1977; 28: 49-55.
11. Chang C, Yang M, Wen H, Chern J. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Food Drug Anal 2002; 10: 178-82.
12. Shimada K, Fujikawa K, Yahara K, Nakamura T. Antioxidative properties of xanthin on autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. Agricul Food Chem 1992; 40: 945-48.
13. Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. Anal Biochem 1999; 269: 337-41.
14. Yildirim A, Mavi A, Kara AA. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of Rumex crispus L. extracts. Agricul Food Chem 2001; 49: 4083--9.
15. Chen X, Xiao J. RP-HPLC-DAD determination of flavonoids: separation of Quercetin, Luteolin and Apigenin in Marchantia Convoluta. Tranian J Pharmaceutical Res 2005; 3: 175-81.
16. Naczk M, Shahidi F. Review Extraction and analysis of phenolics in food. J Chromatography A 2004; 1054: 95–111.
17. Iqbal Ismail H, Wei Chan K, Adam Mariod A, Ismail M. Phenolic content and antioxidant activity of cantaloupe (*cucumis melo*) methanolic extracts. Food Chem 2010; 119: 643-7.
18. Cai Y.Z, Sun M, Xing J, Luo Q, Corke H. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. Life Science 2006; 78: 2872-88.
19. Young Kil H, Seong ES, Ghimire BK, Chung Ill-M, Kwon SS, Goh EJ, et al. Antioxidant and antimicrobial activities of crude sorghum extract. Food Chem 2009; 115: 1234-9.
20. Sun L, Zhang J, Lu X, Zhang L, Zhang Y. Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves. Food Chemical Toxicol 2011; 49: 2689-96.
21. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenol: food sources and bioavailability. Am J Clin Nutr 2004; 79: 727- 47.
22. Koda T, Kuroda Y, Imai H. Protective effect of rutin against spatial memory impairment induced by trimethyltin in rats. Nutr Res 2008; 28: 629–634.
23. Ozkan G, Sagdic O, Baydar NG, Baydar H. Antioxidant and anti bacterial acitvities of Rosa damascene flower extracts. Food Sci Technol Int 2004; 10: 277-81.

www.SID.ir

Archive of SID

Determination of antiradical and antioxidant activities and flavonoid content in hawthorn fruit *(Crataegus elbursensis)*

Salmanian Sh[1], Sadeghi Mahoonak AR[2], Alami M[3], Ghorbani M[4]*

1- M.Sc in Food Science & Technology, Faculty of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Science & Natural Resources, Gorgan, Iran.

*2- *Corresponding Author:Associate Prof, Dept. of Food Science & Technology, Faculty of Food Science & Technology,Gorgan University of Agricultural Science & Natural Resources, Gorgan, Iran. Email: sadeghiaz@yahoo.com*

3- Assistant Prof, Associate Prof, Dept. of Food Science & Technology, Faculty of Food Science & Technology,Gorgan University of Agricultural Science & Natural Resources, Gorgan, Iran.

4- Associate Prof, Dept. of Food Science & Technology, Faculty of Food Science & Technology,Gorgan University of Agricultural Science & Natural Resources, Gorgan, Iran.

Received 12 Dec, 2012 **Accepted 23 Feb, 2013**

Background and Objective: Hawthorn fruit *(Crataegus elbursensis*) has beneficial effects on certain physiological systems of the body, e.g., the cardiovascular system. Since these properties may be related to the presence of antioxidant compounds, especially flavonoids, this study was conducted to determine the antioxidant activity, bioactive compounds and flavonoids in the methanolic extracts of hawthorn fruit.

Materials and Methods: Polyphenolic compounds were extracted from hawthorn fruit by the maceration method. Total phenolic and flavonoid contents were measured spectrophotometrically and the antioxidant capacity of methanolic extract was assessed by measuring DPPH radical-scavenging activity, total antioxidant capacity and reducing power assays, and compared with the synthetic antioxidant butylated hydroxytoluene (BHT). Finally, the quantitative measurement of the fruit extract flavonoids was made by high-performanve liquid chromatography

Results: The total phenolic and flavonoid compound contents per gram of the methanolic fruit extract were 51.74±1.9 mg gallic acid equivalents (GAE) and 1.56±0.03 mg quercetin equivalents (QE), respectively. The free radical-scavenging activity of the extract was found to be in the range 17.33-93.41%, higher than that of BHT, which was 67.95- 91.04%. In other assays, the antioxidant activit of BHT was higher as compared to that of the fruit extract. Qualitative and quantitative analysis showed that among the three flavonoids in the fruit extract (quercetin, rutin and kaempferol), rutin (269.17 µg/g dry tissue weight) was the major one.

Conclusion: On the basis of the results obtained, hawthorn fruit can be introduced as a potential source of natural bioactive compounds due to their high antioxidant activity.

Keywords: Hawthorn fruit, Plant extract, Antioxidant activity, Phenolic compounds

www.SID.ir