بررسی ترکیبات شیمیایی و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره برگ به(Cydonia Oblonga)

محمد مهدی معدنی پور[1]، اکرم شریفی[2*]

1- گروه علوم وصنایع غذایی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

2-گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده مهندسی صنایع و مکانیک، واحد قزوین، دانشگاه آزاد اسلامی، قزوین، ایران.

تاریخ دریافت: 1395/12/13 تاریخ پذیرش: 1396/04/15

چکیده

امروزه صنعت غذا توجه فراوانی به جایگزینی مواد شیمیایی مصنوعی با فرآورده های طبیعی برخوردار از ویژگی های زیست فعالی و دارای منشا گیاهی نشان می دهد. هدف از این مطالعه بررسی ترکیبات شیمیایی و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره برگ به بود. در این مطالعه اسید های فنولی و ترکیبات فلاونوئیدی موجود در عصاره برگ به پس از استخراج عصاره آن به روش ماسراسیون (خیساندن) با حلال های متانول، اتانول و هگزان در دماهای50°C و 25°C، توسط دستگاه HPLCمورد شناسایی قرارگرفت. همچنین فعالیت آنتی اکسیدانی این عصاره به روش قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH بررسی گردید. نتایج نشان داد درصد بازدارندگی عصاره ها با افزایش غلظت افزایش می یابد و نمونه عصاره متانولی استخراج شده در دمای 50°C نسبت به سایر عصاره ها خاصیت آنتی اکسیدانی بیشتری را نشان داد. شناسایی ترکیبات فنولی عصاره متانولی با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا حاکی از وجود ترکیبات5-O- Caffeoy lquinic acid (54/52%)، Rutin (38/66%)، 3-O-Caffeoy lquinic acid (۲/۳۷%)، Quercetin (1/43%) و 4-O- Caffeoylquinic acid(1/36%) بود که نسبت به سایر ترکیبات دارای مقادیر بیشتری بودند. بر اساس نتایج حاصل عصاره متانولی برگ به را می توان به عنوان منبع غنی و جدید از آنتی اکسیدان های طبیعی به عنوان افزودنی غذایی در صنعت غذا در نظر گرفت.

واژه های کلیدی: اسید های فنولی، عصاره برگ به، فلاونوئیدها، فعالیت آنتی اکسیدانی.

[*]مسوول مکاتبات: asharifi@qiau.ac.ir

1-مقدمه

استرس اکسیداتیو یکی از شناخته شده ترین علل بسیاری از بیماری‌های مزمن است که توسط رادیکال‌های آزاد ایجاد می‌شود. صدمات اکسیداتیو به مولکول‌های بیولوژیکی همانند اسیدهای چرب، لیپو پروتئین‌ها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلوئیک باعث موتاسیون در ژن‌ها خواهد شد. مهمترین عامل دفاعی علیه رادیکال‌های آزاد، آنتی اکسیدان‌ها هستند. عدم تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد و آنتی اکسیدان‌ها منجر به حمله رادیکال‌های آزاد به مولکول‌های بیولوژیکی خواهد شد. نقش فیزیولوژیکی آنتی اکسیدان‌ها،مهار رادیکال‌های آزاد است(5،6،8). گیاهان حاوی بسیاری از ترکیبات فعال نظیر آلکالوئیدها، استروئیدها، تانن‌ها، گلیکوزیدها، روغن‌های فرار، روغن‌های ثابت، رزین‌ها، فنول-ها و فلاونوئیدها می‌باشند که در بخشهای خاص گیاه مثل برگها، گل‌ها، پوست، بذور، میوه‌هاو ریشه جمع می‌شوند. اثرات مثبت دارویی مواد گیاهی معمولاً ناشی از ترکیب این فرآورده‌های ثانویه یا ترکیبات زیست فعال می‌باشد (20). حضور ترکیبات زیست فعال با خاصیت آنتی اکسیدانی به ویژه ترکیبات پلی فنولی و ویتامین ها در مواد غذایی با منشأ گیاهی عاملمؤثر در حفظ سلامت انسان می باشد (19). بسیاری از گونه های گیاهی دارای ظرفیت آنتی اکسیدانی مشابهی با آنتی اکسیدان های سنتزیبدون اثرات جانبی می باشند و به عنوان یک جایگزین در صنعت غذا و دارو مورد استفاده قرار می گیرند (14). درخت به (Cydonia Oblonga) به جنس Cydonia و خانواده Rosaceae تعلق دارد و بومی مناطقی در جنوب شرقی آسیا، ایران و ترکیه است. بهاز میوه های دانه دار متعلق به تیره وردسانان (Rosaceae) و زیر تیره سیبیان (Pomoidae) می باشد(6). میوه و برگ به سرشار از ترکیبات زیست فعال گیاهی است. درطی سالهای اخیر،در زمینه استخراج و شناسایی ترکیبات زیست فعال گیاهی پژوهش های زیادی صورت گرفته که به چند مورد اشاره میشود. سلمانیان و همکاران (1392) شناسایی اسیدهای فنولی و اندازه گیری میزان ترکیبات فنولی کل و فلاونوئیدی، فعالیت مهارکنندگی رادیکالهای آزاد و قدرت احیاءکنندگی عصاره های اتانولی و متانولی سبزی زولنگ بومی ایران را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که عصاره متانولی بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی را در کلیه آزمونهای انجام شده داراست. به علاوه شناسایی اسیدهای فنولی عصاره متانولی صورت گرفته توسط کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا حاکی از وجود اسیدهای گالیک، کلروژنیک، کافئیک و پاراکوماریک بود. اسید فنولی غالب در عصاره متانولی، کلروژنیکاسید گزارش گردید(2). همچنینصادقی ماهونک و همکاران (1392) در مطالعه ای دیگر ترکیبات فنولیکل، فلاونوئیدی، آنتوسیانینی و فعالیت ضد باکتریایی عصاره استونی استخراج شده از میوه ی ولیک ایرانی را مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج نشان داد که در دمای $50^{\circ}C$میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی بیشتری از بافت میوه نسبت به دمای $25^{\circ}C$ از ماده گیاهی استخراج گردید. همچنین عصاره استونی در غلظت 500 میکروگرم بر میلی لیتر فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتری نسبت به آنتی اکسیدان سنتزی BHT از خود نشان داد که از این نظر قابلیت رقابت با آنتی اکسیدان سنتزی را دارا بود(3).ممشلو و همکاران (1391) ویژگی های آنتی اکسیدانی و میزان ترکیبات فنولی کل استخراج شده از میوه ازگیل با استفاده از حلال های استون، متانول و اتانول 80 % و آب رامورد ارزیابی قراردادند. نتایج نشان داد که عصاره استونی بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی را در کل آزمون های انجام شده دارد(5). وانگ[1] و همکاران (2014) فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره برگ های پنج واریته چای ترش را مورد ارزیابی قرار دادند و پنج ترکیب فنولی اصلی آن را با استفاده از روش LC-Q-TOF-MS[2] تعیین نمودند. اسید نئوکلروژنیک[3]، اسید

1-Wang
2-Liquidchromatography/quadrupole-time-of-flight mass spectrometry
3-Neochlorogenic acid

کلروژنیک[1]، اسید کریپتوکلروژنیک[2]، روتین[3] و ایزوکوئرسیترین[4] پنج ترکیب اصلی شناسایی شده بود. نتایج فعالیت بالای آنتی اکسیدانی در همه واریته های مورد بررسی را نشان داد(22). از آنجایی که امروزه برای نگهداری و افزایش زمان ماندگاری محصولات غذایی بیشتر از نگهدارنده های مصنوعی و سنتتیک استفاده می شود و استفاده بیش از حد آن ها در مواد غذایی عوارض جانبی و یا خطرناکی را برای مصرف کنندگان به دنبال دارد، جایگزینی این ترکیبات با نگهدارنده های طبیعی نظیر عصاره برگ به می تواند نقش بسزایی در ارتقاء سطح سلامت جامعه داشته باشد. با توجه به این امر که تاکنون تحقیقی جهتبررسی ترکیبات شیمیایی و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره برگ به صورت نگرفته است،بنابراین هدف از این مطالعه ارزیابی ترکیبات شیمیایی و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره برگ به بود.

2-مواد و روش ها

2-1 مواد مورد استفاده

در این پژوهش نمونه برگ تازه به در هنگام گل دهی درخت به در اوایل اردیبهشت از باغات شهرستان ساوجبلاغ واقع دراستان البرز جمع آوری شد.متانول، اتانول، هگزانوBHT از شرکت مرک و DPPH از شرکت سیگما آلدریچ تهیه گردید. جهت شناسایی نوع اسیدهای فنولی از استاندارد های کلروژنیک اسید، فلوریک اسید، روتین، کافئیک اسید و کوئرستین مربوط به شرکت سیگما آلدریچ استفاده شد.

2-2- تهیه عصاره

برگ های جمع آوری شده بلافاصله پس از جمع آوری و جداسازی ناخالصی های آن جهت خشک شدن در سایه در اتاقی با دمای C° 25 پهن شدند. برگ ها پس از خشک شدن کامل، آسیاب (مولینکس،مدل AW5،فرانسه) گردید و پودر برگ آسیاب شده تا زمان انجام آزمایشات در کیسه های محافظ به هوا و رطوبت، در فریزر با دمایC° 18- نگهداری گردید. تهیه عصاره برگ به در آزمایشگاه شیمی آلی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران واقع در شهر کرج انجام شد که طی این مرحله سه نوع عصاره متانولی، اتانولی و هگزانی در دو دمای C° 25 و C° 50 طی مدت زمان ثابت، به روش ماسراسیون[5] استخراج گردید.تیمارها با مطالعه پژوهش های پیشین و مرتبط انتخاب شد.به این منظورحدود 100 گرم نمونه برگ بهدر مقدارکافی از حلال خیسانده شد. نمونه بعد ازگذشت 48 ساعت در دو دمای C°25 و C°50 توسط قیف بوخنر صاف گردید و برای حذف حلال از دستگاه روتاری اواپراتور[6](Stuart, RE300، انگلستان) استفاده شد. در پایان نمونه تا هنگام انجام آزمون ها در دمای C° 18- در فریزر نگهداری شد.

2-3- قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد 2،2- دی فنیل -1- پیکریل هیدرازیل(DPPH)[7]

جهت بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی، ابتدا غلظت های مشخص از عصاره های حاصل(150-25میکروگرم برمیلی لیتر) و نیز آنتی اکسیدان سنتزی BHT[8] درحلال متانول تهیه شد. سپس برای هر غلظت 3 لوله آزمایش آماده گردید. یک میلی لیتر از محلول متانولی DPPH (با غلظت یک میلی مولار معادل 0/394 میلی گرم) به 3 میلی لیتر از متانول و عصاره افزوده و مخلوط فوق به شدت همزده شد (محلول کاملا ورتکس شد). لوله های آزمایش به مدت 30 دقیقه در محل تاریک قرار گرفتند و جذب آن پس از 30 دقیقه نگهداری در محیط تاریک درطول موج 517 نانومتر قرائت گردید.همچنین یک سل مبنا تهیه شد که حاوی تمام ترکیبات به جز رادیکال DPPH بود. علاوه برسل مبنا یک نمونه شاهد هم تهیه گردید که حاوی تمامی مواد بجز عصاره بود و جذب نمونه و شاهد

1-Chlorogenicacid
2-Cryptochlorogenic acid
3-Rutin
4-Isoquercitrin

5-Maceration
6-Rotary evaporator
7-2,2-diphenyl-1- picryl hydrazyl
8- Butylated Hydroxy Toluene

نسبت به سل مبنا سنجیده شد.فعالیت مهار رادیکال DPPH توسط عصاره که معیاری از میزان فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره است مطابق فرمول زیر محاسبه شد(2).

100×(میزان جذب شاهد/میزان جذب نمونه - میزان جذب شاهد) = قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH (%)

2-4- تعیین میزان ترکیبات فنولی کل

میزان ترکیبات فنولی کل با روش فولین سیوکالتیو[1] اندازه گیری شد(19). در این روش میزان 20 میکرولیتر از محلول عصاره با 1/160 میلی لیتر آب مقطر و 100 میکرولیتر معرف فولین سیوکالتیو مخلوط شد. سپس 300 میکرولیتر محلول کربنات سدیم20% بعد از گذشت 1 تا 8 دقیقه به آن ها افزوده شد. لوله های آزمایش بعد از تکان دادن در حمام آب با دمای40°C درجه سانتیگراد قرار گرفته و پس از گذشت 30 دقیقه جذب آنها با دستگاه اسپکتروفتومتر(PG instrument، انگلستان)در طول موج 760 نانومتر قرائت شد. جهت رسم منحنی استاندارد از گالیک اسید استفاده شد. میزان ترکیبات فنولی کل موجود در عصاره با استفاده از معادله حاصل از منحنی استاندارد گالیک اسید (Y=0/0099x+0/0062 وR^2=1) محاسبه و نتایج بر حسب میلی گرم اسید گالیک در هر گرم عصاره بیان شد. آزمایش ها در سه تکرار انجام و میانگین آنها گزارش شد.برای کنترل دقیق این روش حتما باید از محلول شاهد یا استاندارد استفاده نمود که در بیشتر تحقیقات از گالیک اسید به عنوان استاندارد استفاده می شود و نتیجه نهایی به صورت معادل گالیک اسید بر حسب میلی گرم در 100 گرم وزن خشک ماده بیان می شود(13،15). در این مطالعه میزان ترکیبات فنولی کل استخراج شده از عصاره های متانولی، اتانولی و هگزانی برگ به در دو سطح دمایی25°C و50°Cدر مدت زمان 48 ساعت اندازه گیری گردید.

2-5- شناسایی و ارزیابی کمی ترکیبات فلاونوئیدیو اسیدهای فنولی عصاره برگ به

آماده سازی عصاره گیاهی برگ به، جهت تعیین نوع و میزان اسیدهای فنولی موجود در آن به روش کووک[2] و همکاران (11) با کمی تغییرات انجام شد. شناسایی و تعیین کمیاسیدهای فنولی توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا توسط دستگاه HPLC[3] ساخت شرکت KNAUER کشور آلمان مدل PLATIN blue به همراه پمپ PLATIN blue مجهز به دتکتور مدل PDAPLATIN blue[4]، سیستم تزریق اتوماتیک مدل PLATIN blue و رابط نرم‌افزاری Ezchrom Eilte انجام شد. ستون مورد استفاده (ODS-2 C18 (4 - 250 mm, with pre column Sphere-image 80-5, CA, German column با طول 250 میلی-متری و قطر داخلی 4 میلی‌متر بود. به دلیل دارا بودن بالاترین میزان ترکیبات فنولی کل و بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی در عصاره متانولی برگ به با سطح دمایی استخراج 50°C، این نمونه جهت شناسایی نوع و میزان اسیدهای فنولی و ترکیبات فلاونوئیدی انتخاب گردید. پس از آماده سازی نمونه عصاره استخراجی برگ به (عصاره متانولی با دمای استخراج 50°C)، مقدار 10 میکرولیتر از عصاره بعد از عبور از فیلتر سرنگی 0/2 میکرون به ستون HPLC تزریق گردید. سیستم مورد استفاده در این بررسی، گرادیان و فاز متحرکشامل آب با 2%اسید سولفوریک 0/01 مولار(حلال1) و متانول(حلال2)، سرعت جریان فاز متحرک در ستون 0/6 میلی لیتر در هر دقیقه، دمای ستون 80°C درجه سانتیگراد و طول موج 220 تا 400 نانومتر اندازه گیری شد. جهت شناسایی نوع اسیدهای فنولی از استاندارد های کلروژنیک اسید، فلوریک اسید، روتین، کافئیک اسید و کوئرستین استفاده شد. با مقایسه زمان تأخیر و سطح زیر منحنی نمونه با نمونه های استاندارد، اسیدهای فنولی

1- Folin-Ciocalteu

2-Kwok
3-High-performance liquid chromatography
4-Photo Diode Array

شناسایی و میزان این ترکیبات با رسم منحنی های استاندارد تعیین گردید.

2-6- آنالیز آماری

مقایسه بین نتایج حاصل توسط آزمون های آماری چند دامنه ای دانکن و آنالیز واریانس با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه 22 انجام گرفت و نمودارها به وسیله نرم افزار2007، Excel رسم شد.

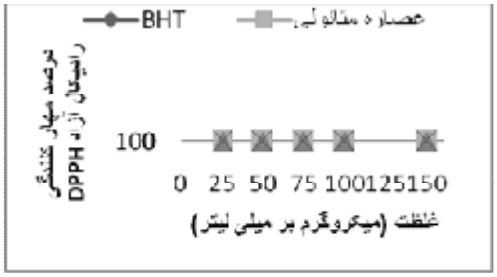
3-نتایج و بحث

3-1- قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH

برای تعیین قدرت مهار رادیکال های آزاد نتایج بر حسب درصد کاهش در میزان جذب محلول های DPPH در حضور عصاره نسبت به محلول DPPH فاقد عصاره بیان می گردد(9). مقایسه میانگین درصد مهار رادیکال های آزاد توسط غلظت های مختلف عصاره های الکلی (هگزانی، اتانولی و متانولی در دمای استخراج25°C) برگ به و آنتی اکسیدان سنتزی BHT در شکل 1 نشان داده شده است. در محدوده غلظت 150-25 میکروگرم در میلی لیتر و دمای استخراج 25°C درجه سانتی گراد، درصد فعالیت مهارکنندگی آنتی اکسیدان سنتزی BHT، 91/9%-51/56%، عصاره هگزانی35/44%-3/94% ، عصاره اتانولی 80%، 79/04 %-17/27%و عصاره متانولی 80 %، 87/55 %-38/57 % تعیین شد. در تمامی غلظت های مورد بررسی فعالیت مهارکنندگی عصاره متانولی بالاتر از سایر عصاره های برگ به بود.

شکل 1-درصد مهار رادیکال های DPPHدر غلظت های مختلف عصاره های برگ به در دمای استخراج 25°C و آنتی اکسیدان سنتزی BHT

در محدوده غلظت 150- 25 میکروگرم در میلی لیتر و دمای استخراج50°Cدرجه سانتی گراد، درصد فعالیت مهارکنندگی آنتی اکسیدان سنتزی BHT،91/9 %-51/56 %، عصاره هگزانی 37/48 %- 5/58 %، عصاره اتانولی 80 %، 86/87 %-23/53 % و عصاره متانولی 80%، 90/95%-39/86 % تعیین شد. در کلیه غلظت های مورد بررسی، فعالیت مهارکنندگی عصاره متانولی بالاتر از سایر عصاره های برگ به بود. فعالیت ضد رادیکالی عصاره های اتانولی و متانولی برگ به در غلظت های بالا قابل رقابت با آنتی اکسیدان سنتزی BHT بود(شکل 2).



شکل 2- درصد مهار رادیکال های DPPH در غلظت های مختلف عصاره های برگ به در دمای استخراج50°C و آنتی اکسیدان سنتزی BHT

در این مطالعه نتایج آنالیز واریانس نشان داد، نوع و غلظت عصاره ها و آنتی اکسیدان سنتز یتأثیر معنی داری بر میزان مهارکنندگی رادیکال های آزاد داشتند(P< 0/01) به طوری که با افزایش غلظت، فعالیت ضد رادیکالی آنها افزایش می یافت. میزان جذب شاهد در این پژوهش 1/47 تعیین شد. همچنین با افزایش دما از25°C به50°C فعالیت ضد رادیکالی نمونه های مورد بررسی بیشتر بود و نمونه عصاره متانولی استخراج شده در دمای50°C نسبت به سایر عصاره ها خاصیت آنتی اکسیدانی بیشتری نشان داد.نتایج مطالعه سلمانیان و همکاران (1392) نشان داد که عصاره متانولی بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی را در کلیه آزمونهای انجام شده داشت(2). همچنین صادقی ماهونک و همکاران (1392) در مطالعه ای دیگر برای تعیین ترکیبات زیست فعال عصاره

استونی استخراج شده از میوه ولیک ایرانی دریافتند که در دمای50°C میزان ترکیبات فنولی کل و فلاونوئیدی بیشتری از بافت میوه نسبت به دمای25°C درجه سانتیگراد از ماده گیاهی استخراج گردید(3). پتانسیل آنتی اکسیدانی ترکیبات فنولی موجود در عصاره های گیاهی ناشی از نوع و غلظت این ترکیبات و نیز تعداد و موقعیت گروه های هیدروکسیل موجود در حلقه آروماتیک این ترکیبات است. افزایش غلظت ترکیبات فنولی به طور مستقیم میزان توانایی عصاره های مختلف را در مهار رادیکال آزاد افزایش می دهد. در غلظت های بالاتر ترکیبات فنولی، به دلیل افزایش تعداد گروه های هیدروکسیل موجود در محیط واکنش، احتمال اهداء هیدروژن به رادیکال های آزاد و به دنبال آن قدرت مهارکنندگی عصاره افزایش می یابد(22). همچنین در زمینه استخراج ترکیبات فنولی از بافت های گیاهی، محققان بسیاری بیان نموده اند که افزایش دمای استخراج به طور مطلوبی میزان استخراج ترکیبات فنولی از بافت گیاهی را افزایش می دهد و دلیل این افزایش نرم شدن بافت های گیاهی، ضعیف شدن برهم کنش ترکیبات فنولی با پروتئین و پلی ساکارید ها و در نتیجه خروج مقدار بیشتری از ترکیبات مذکور از نمونه گیاهی به حلال می باشد(18). در مطالعه ای، مبنی بر بررسی تأثیر دمای خیساندن بر میزان استخراج ترکیبات فنولی از میوه لیچی[1] نیز مشخص شد که با افزایش دما (30°C - 80°C) مقدار ترکیبات فنولی استخراج شده به طور قابل ملاحظه ای افزایش یافت (17). نتایج مطالعه حاضر نیز حاکی از خروج بیشتر ترکیبات فنولی از عصاره برگ به با افزایش دمای استخراج بود که با نتایج محققان پیشین مطابقت داشت. در این مطالعه مقادیر IC_{50} (غلظتی که باعث حذف رادیکال های آزاد به میزان 50% می شود) برای عصاره های مختلف تعیین و با آنتی اکسیدان سنتزی BHT مقایسه گردید. بعد از آنتی اکسیدان سنتزی BHT، کمترین مقدار IC_{50} متعلق به عصاره متانولی با دمای استخراج50°C بود. درنتیجه بیشترین توانایی در مهار رادیکال های آزاد به عصاره متانولی با دمای استخراج 50°C تعلق داشت(جدول 1).

جدول 1- میزانIC_{50} برای عصاره های مختلف برگ به و BHT در آزمون مهار رادیکال های آزاد DPPH

نمونه	IC_{50} (میکروگرم در میلی لیتر)
آنتی اکسیدان سنتزی BHT	21/53[a*]
عصاره متانولی با دمای استخراج50°C	29/46[b]
عصاره اتانولی با دمای استخراج50°C	64/43[c]
عصاره هگزانی با دمای استخراج50°C	187/57[d]
عصاره متانولی با دمای استخراج 25°C	52/13[e]
عصاره اتانولی با دمای استخراج25°C	83/48[f]
عصاره هگزانی با دمای استخراج25°C	193/50[g]

عصاره برگ به با دارا بودن مقادیر قابل ملاحظه ای از ترکیبات فنولی، فعالیت ضد رادیکالی بالایی را نسبت به ترکیب استانداردBHT نشان داد. تفاوت های مشاهده شده بین IC_{50} عصاره های مختلف در این پژوهش را میتوان به تفاوت در نوع ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی آنها نسبت داد. محققان، فعالیت آنتی اکسیدانی قوی عصاره های گیاهی را با میزان بالای فنول ها و فلاونوئیدهای موجود در عصاره مرتبط می دانند(1). در مطالعه صادقی ماهونک و همکاران نیز عصاره استونی در غلظت 500 میکروگرم بر میلی لیتر فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتری نسبت به آنتی اکسیدان سنتزی BHT از خود نشان داد که از این نظر قابلیت رقابت با آنتی اکسیدان سنتزی را دارا بود(3).

3-2- تعیین میزان ترکیبات فنولی کل

مقایسه میانگین و انحراف معیار میزان کل ترکیبات فنولی استخراج شده از عصاره های متانولی، اتانولی و n-هگزانی، در دو سطح دمایی استخراج 25°C و50°Cدر جدول 2آورده شده است.

جدول2-میزان ترکیبات فنولی کل عصاره های برگ به در دمای25°C و50°C

نمونه	میزان ترکیبات فنولی کل در دمای استخراج 25°C (میلی گرم گالیک اسید در گرم عصاره) میانگین±انحراف معیار	میزان ترکیبات فنولی کل در دمای استخراج50°C (میلی گرم گالیک اسید در گرم عصاره) میانگین±انحراف معیار
عصاره متانولی	308/88[a*] ±1/53	337/17 [a] ±2/78
عصاره هگزانی	221/01 [b] ±5/58	279/59 [b] ±6/85
عصاره اتانولی	243/23 [c] ±2/69	282/62 [c] ±4/02

*حروف غیرمشابه در هر ستون بیانگر اختلاف معنی دار در سطح اطمینان 5درصد است(P<0/05).

همانطور که ملاحظه می شود، نتایج آنالیز واریانس نشان داد، نوع حلال مورد استفاده جهت استخراج، تأثیر معنی داری بر مقدار ترکیبات فنولی دارد(p<0/05) و عصاره متانولی دارای بیشترین میزان ترکیبات فنولی کل می باشد. همچنین در دمای50°C میزان ترکیبات فنولی بیشتری نسبت به دمای 25°C از برگ به استخراج گردید.میزان ترکیبات فنولی عصارهها با افزایش قطبیت حلال افزایش می یابد چون ترکیبات فنولی شامل گروه وسیعی از ترکیباتی هستند که ساختارهای متفاوت واغلب قطبی دارند کارایی حلال های قطبی در استخراج ترکیبات فنولی در مقالات زیادی به اثبات رسیده است(4). نتایج تحقیق سلمانیان و همکاران (1392) نیز در مورد میزان ترکیبات فنولی کلزولنگ نشان داد که عصاره متانولی بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی و میزان ترکیبات فنولی کل را دارا بود(2). درتحقیقی که راباباه[1]وهمکاران (2004)انجام دادند میزان ترکیبات فنولی شنبلیله، چای سبز، چای سیاه، دانه یانگور، زنجبیل وروزماری به ترتیب 92/5، 63/5، 59/3 ، 59/8، 54/3 میلی گرم فنولی /گرم نمونه خشک بود(16).

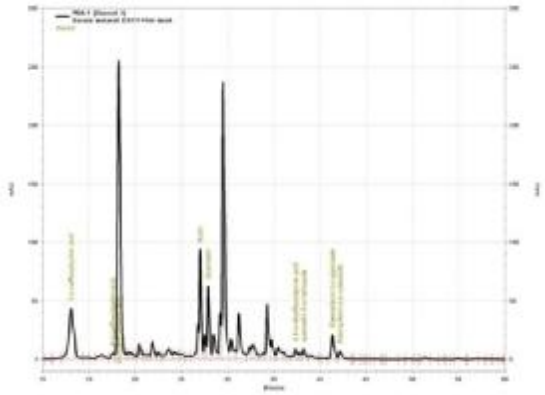
3-3- شناسایی و تعیین کمی ترکیبات فلاونوئیدی و اسیدهای فنولی

نوع و میزان ترکیبات فلاونوئیدی و اسیدهای فنولی موجود در عصاره متانولی برگ به استخراج شده در دمای50°Cدر جدول 3 و شکل 3 گزارش شده است.طبق مشاهدات، 5-O-Caffeoylquinic Acid و Rutin به ترتیب با 54/52% و 38/66% بیشترین اسیدهای فنولی و ترکیبات فلاونوئیدی موجود در عصاره متانولی برگ به استخراج شده در دمای 50°C بودند

1-Rababah

جدول 3- اسیدهای فنولی و ترکیبات فلاونوئیدی موجود در عصاره متانولی برگ به استخراج شده در دمای50°C

نمونه عصاره متانولی برگ به (استخراج شده در دمای50°C)	زمان بازداری(دقیقه)	درصد ترکیبات شناسایی شده	مقدار ترکیبات شناسایی شده(mg/g)
3-O-Caffeoylquinic acid	13/067	2/37	0/3027
4-O-Caffeoylquinic acid	17/533	1/36	0/1732
5-O-Caffeoylquinic acid	18/200	54/52	6/9633
Rutin	27/033	38/66	4/9378
Quercetin	27/887	1/43	0/1823
3-8-O-Dicaffeoylquinic acid	37/317	0/50	0/0633
quercetin-3-O-rutinoside	38/200	0/88	0/1125
Kaempferol-3-O-glucoside	41/317	0/03	0/0033
Kaempferol-3-O-rutinoside	42/117	0/26	0/0338



شکل 3- کروماتوگرام اسیدهای فنولی و ترکیبات فلاونوئیدی موجود در عصاره متانولی برگ به استخراج شده در دمای50°C

در مطالعه سلمانیان و همکاران (1392) اسیدهای فنولی عصاره متانولی زولنگ، شناسایی شده با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا حاکی از وجود اسیدهای گالیک، کلروژنیک، کافئیک و پاراکوماریک بود. اسید فنولی غالب در عصاره

متانولی، کلروژنیک اسید به میزان 64/07 میلی گرم در 100 گرم ماده خشک گزارش گردید(2).وانگ[1] و همکاران (2014) پنج ترکیب فنولی اصلی چای ترش شامل اسید نئوکلروژنیک، اسید کلروژنیک، اسید کریپتوکلروژنیک، روتین و ایزوکوئرسیترین را شناسایی کردند (22). اسیدهای فنولی، مشتقات هیدروکسیل شده بنزوئیک اسید و سینامیک اسید می باشند. هیدروکسی سینامیک اسیدها به فراوانی در اغلب گیاهان یافت می شوند که متداول ترین این ترکیبات کلروژنیک اسید، کافئیک اسید، پاراکوماریک اسید و فرولیک اسید می باشند. اکثر مطالعات مزایای سلامتی بخش اسیدهای فنولی را با فعالیت آنتی اکسیدانی این ترکیبات مرتبط دانسته اند(12).هیدروکسی سینامیک اسیدها، فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتری نسبت به هیدروکسی بنزوئیک اسیدها دارند که این فعالیت آنتی اکسیدانی بالا در مشتقات هیدروکسی سینامیک اسیدها ناشی از حضور یک زنجیره جانبی پروپنوئیکبه جای یک گروه کربوکسیل است(14). محققان بیان نموده اند که مشتقات هیدروکسی سینامیک اسیدها مانند کافئیک اسید و فرولیک اسید، فعالیت مهارکنندگی رادیکال موثری را دارا می باشند(7،21). در بین ترکیبات فنولی، فلاونوئیدها ترکیبات آنتی اکسیدانی قویتری محسوب می شوند. فلاونوئیدها بازدارنده های قوی رادیکال های هیدروکسیل و پراکسید هستند و تأثیر آن ها بر رادیکالهای سوپراکسید هنوز مشخص نشده است(10).کوئرستین یک فلاونول است و یکی از قوی ترین آنتی اکسیدان های طبیعی به شمار می آید. افزایش تعداد گروه های هیدروکسیل با قدرت آنتی اکسیدانی ترکیبات فلاونوئیدی رابطه مستقیم دارد(3). ترکیبات فلاونوئیدی روتین، کوئرستین و کامپفرول خواص دارویی، ضد باکتریایی و ضد اکسیداسیونی دارند. اثرات آنتی اکسیدانی کوئرستین ناشی از شلاته کردن فلزات، مهار کردن رادیکال ها و تحریک بیان آنزیم های محافظتی است. روتین به عنوان یک رنگدانه طبیعی، پایدار کننده و نگهدارنده مواد غذایی در صنایع مختلف مورد استفاده قرار می گیرد. این ترکیبدارای فعالیت های بیولوژیکی گوناگونی از جمله اثرات آنتی اکسیدانی، ضد التهابی و محافظتی روی کبد می باشد که برای سلامت انسان مفید است(3). از این رو، بررسی میزان این ترکیبات در عصاره ی برگ به، جهت تأکید بر اثرات دارویی، تغذیه ای و خواص آنتی اکسیدانی آن بسیار مهم بود. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که عصاره ی برگ به، به دلیل دارا بودن مقادیر قابل ملاحظه ای از ترکیبات فنولی و فلاونوئید قدرت آنتی اکسیدانی بالایی دارد. حضور ترکیبات فلاونوئیدی نظیر روتین، کوئرستین و کامپفرول در این عصاره با فعالیت آنتی اکسیدانی قابل توجه این عصاره تطابق دارد. در نهایت نتایج بدست آمده در آنالیز ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی عصاره برگ به، نتایج حاصل از آزمون های ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی را تأیید می نماید.

4-نتیجه گیری

با در نظر گرفتن فعالیت آنتی اکسیدانی بالقوه و مقادیر غنی از ترکیبات فنولی در عصاره برگ به، می توان از این عصاره در صنایع غذایی و داروسازی به جای آنتی اکسیدان های سنتزی و سایر نگهدارنده های شیمیایی جهت به تأخیر انداختن پراکسیداسیون لیپید ها و جلوگیری از رشد پاتوژن های غذایی استفاده نمود. همچنین با توجه به اثرات نامطلوب آنتی اکسیدان های سنتزی بر سلامت انسان، مطالعات بیشتر در زمینه ی استخراج و شناسایی کامل ترکیبات شیمیایی موجود در عصاره های برگ به و شناخت خواص اجزاء تلخیص شده از آن و همچنین مقایسه ترکیبات شیمیایی و خواص آنتی اکسیدانی عصاره برگ به با سایر گونه های آن و بررسی

1-Wang

روش های مختلف سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره برگ به پیشنهاد می گردد.

5-منابع

1. جمشیدی، احمدی آشتیانی، ح. ر. رضازاده، ش. فتحی آزاد، ف. مازندرانی، م. وخاکی، آ. 1389. بررسی ومقایسه ترکیبات فنولی وفعالیت آنتی اکسیدانی چندگونه گیاهی بومی مازندارن. فصلنامه گیاهان دارویی، 34، 183- 177.
2. سلمانیان، ش. صادقی ماهونک، ع.ر. جامسون، م. و طباطبایی عمید، ب. 1392. شناسایی و اندازه گیری اسیدهای فنولی، فعالیت مهارکنندگی رادیکال و قدرت احیاء کنندگی آهن عصاره های اتانولی و متانولی زولنگ. نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی. جلد 2، شماره 2، 204-193.
3. صادقی ماهونک، ع. ر. سلمانیان، ش. قربانی، م. اعلمی، م. 1392. ارزیابی فعالیت ضد رادیکالی، آنتی اکسیدانی و تعیین ترکیبات فلاونوئیدی میوهی ولیک (Crataegus lbursensis).مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران،سال هشتم، شماره 1 ، بهار 1392 ، صفحات 185 -177.
4. صبورا، ع. احمدی، ا. زینالی، ا. پارسا، م. 1393. مقایسه محتوای ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و فعالیت آنتیاکسیدانی اندام هوایی دو جمعیت گیاه بشقابی سنبلهای (Scutellaria Pinnatifida) در شمال ایران. مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان. جلد13. شماره3.
5. مشلو، س. صادقی ماهونک، ع. قربانی، م. اعلمی، م. و ضمیری، م. 1391. بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی ومیزان پایداری ترکیبات فنولی حاصل از میوه ازگیل ،نشریه پژوهش ونوآوری در علوم وصنایع غذایی. جلد1، شماره 3 ، 228-219.
6. Amiri, M.E. 2008. The status of genetic resources ofdeciduous, tropical, and subtropical fruit speciesin Iran.Acta Horticulture, 769:159–167.
7. Andreasen, M.F. Landbo, A.K. Christensen, L.P. Hansen, A. and Meyer, A.S. 2001.Antioxidant effects of phenolic rye (Secale cereale L.) extracts, monomerichydroxycinnamates, and ferulic acid dehydrodimers on human low-density lipoproteins.Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49: 4090–4096.
8. Choe, E. and Min, B.D. 2009. Mechanisms of antioxidants in the oxidation of food. Comprehensive Review in Food Science and Food Safety, 8: 345-358.
9. Ferreres, F. Sousa, C. Valento, P. Seabra, R.M. Pereira, J.A. and Andrade, P.B. 2007.Tronchuda cabbage (Brassica oleracea L. var. costata DC) seeds: phytochemicalcharacterization and antioxidant potential. Food Chemistry, 101: 549-558.
10. Koda, T. Kuroda, Y. and Imai, H. 2008. Protective effect ofrutin against spatial memory impairment inducedby trimethyltin in rats. Nutrition Research, 28: 629–634.
11. Kwok, C.Y. Wong, C.N.Y. Mabel, Y.C.Y. Yu, P.H.F. Au, A.L.S. Poon, C.C.W.Seto, S. Lam, T. Kwang, Y. Chan,S. 2010. Consumption of dried fruit of Crataegus pinnatifida (hawthorn) suppresses high-cholesterol diet-induced hypercholesterolemia in rats. Journal of Functional Foods, 2: 179-186.
12. Mattila, P. and Hellström, J. 2007. Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of theirproducts. Journal of Food Composition and Analysis, 20: 152 – 160.
13. Medina, M. B. 2011. Determination of the total phenolics in juices and superfruits by a novel chemical method. Journal of Functional Foods, 3, 79–87.

14. Natella, F. Nardini, M. Di Filici, M. and Scaccini, C. 1999. Benzoic acid and cinnamic acid derivatives as antioxidants, structure–activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry,47: 1453–1459.
15. Obied, H. K. Bedgood Jr, D. R. Prenzler, P. D. and Robards, K. 2007. Bioscreening of Australian olive mill waste extracts: Biophenol content, antioxidant, antimicrobial andmolluscicidal activities. Food & Chemical Toxicology. 45, 1238–1248.
16. Rababah, T.M., Hettiarachchy, N.S. andHorax, R. 2004. Total Phenolics andAntioxidant Activities of Fenugreek, GreenTea, Black Tea, Grape Seed, Ginger,Rosemary, Gotu Kola, and Ginkgo Extracts,Vitamin E, and tert-Butylhydroquinone.Journal of Agricultural and Food Chemistry,52, 5183-5186.
17. Ruenroengklin, N. Zhong, J. Duan, X. Yang, B. Li, J. andJiang, Y. 2008. Effects of various temperatures and pHvalues on the extraction yield of Phenolics fromLitchi fruit pericarp tissue and the antioxidant ofthe extracted anthocyanins. International Journal of Molecule Science, 9: 1333-1341.
18. Shi, J. Yu, J. Pohorly, J. Young, J.C. Bryan, M. and Wu, Y. 2003.Optimization extraction of polyphenols fromgrape seed meal by aqueous ethanol solution. FoodAgriculture Environment, 1(2): 42-47.
19. Slinkard, K. and Singleton, V.L. 1977. Total phenol analysis; automation and comparison with manual methods. American Journal Enology and Viticulture, 28: 49-55.
20. Tonthubthimthong, P., Chuaprasert, S., Douglas, P.and Luewisutthichat, W. 2001. Supercritical CO2 extraction of nimbin from neem seeds an experimental study. J. Food Eng., 47: 289-293.
21. Vuorela, S. Meyer, A.S. and Heinonen, M. 2004. Impact of isolation method on theantioxidant activity of rapeseed meal phenolics. Journal of Agricultural and FoodChemistry, 52: 8202–8207.
22. Wang, J. Cao,X. Jiang, H. Qi,Y. Chin, K.L. and Yue, Y. 2014. Antioxidant Activity of Leaf Extracts from DifferentHibiscus sabdariffa Accessions and Simultaneous DeterminationFive Major Antioxidant Compounds by LC-Q-TOF-MS. Molecules, 19, 21226-21238.