ارزیابی ترکیبات فنولی و آنتی اکسیدانی عصاره های متانولی، هگزانی و آبی میوه "به" (*Cydonia oblonga*)

سیده فائزه تقی زاده[۱،*]، غلامحسین داوری نژاد[۲]، جواد اصیلی[۳]

۱- دانشجوی دکتری علوم باغبانی، دانشگاه فردوسی، مشهد. ۲- استاد گروه علوم باغبانی، دانشگاه فردوسی، مشهد. ۳- دانشیار گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی، مشهد.

*نویسنده مسئول: sfaezeh_taghizadeh@yahoo.com

چکیده

به منظور بررسی مقادیر فنول، فلاونوئید و پروآنتوسیانین کل و نیز ارزیابی اثرات آنتی اکسیدانی عصاره های متانولی، هگزانی و آبی میوه "به" (*Cydonia oblonga*) آزمایشی در قالب طرح کاملا تصادفی با ۳ تکرار انجام گرفت. در بررسی به عمل آمده، اختلاف معنی داری در سطح ۰/۰۱ میان مقادیر فنول، فلاونوئید و پروآنتوسیانین کل عصاره های انتخابی گزارش شد، همچنین از نظر عملکرد نوع حلال نیز متانول، نسبت به هگزان و آب، در استخراج ترکیبات مورد نظر از راندمان بالاتری برخوردار بود. نتایج حاصل از به دام انداختن رادیکال های آزاد با روش DPPH نشان داد که عصاره های متانولی، هگزانی و آبی در جایگاهی بعد از ویتامین C و BHT (کنترل مثبت) قرار داشتند. بررسی شاخص IC_{50} نشان داد که عصاره متانولی در غلظت کمتر، سبب ۵۰٪ فعالیت روبشگری شده است، از این رو قابلیت مهار کنندگی عصاره متانولی نسبت به عصاره های هگزانی و آبی بیشتر بوده است.

مقدمه

آنتی اکسیدان ها موادی هستند که در غلظت های کم، قادر به پیشگیری و یا به تاخیر انداختن اکسیداسیون ناشی از رادیکال های آزاد می باشند (Gate te al., 1999). ترکیبات سنتتیک، مانند BHA (بوتیل هیدروکسی آنیزول) و BHT (بوتیل هیدروکسی تولوئن) از آنتی اکسیدان هایی هستند که به دلیل سمیت زیاد استفاده از آنها محدود شده است و توجه صنایع غذایی و دارویی به گسترش آنتی اکسیدان های طبیعی و گیاهی معطوف شده است (Laughton et al., 1989). و به همین دلیل یافتن آنتی اکسیدان ها از منابع طبیعی به ویژه گیاهان و استفاده از آنها بسیار مطلوب است (Milos et al., 2000)."به" (*Cydonia oblonga*) از میوه های مناطق معتدله است (Silva et al., 2005). ایران با دارا بودن سطح زیر کشت ۴۹۳۷ هکتار و تولید ۳۵۴۳۰ تن از کشورهای مطرح تولید کننده این میوه به شمار می رود (FAO, 2011). "به" منبع خوبی از اسید اسکوربیک و عناصری از قبیل پتاسیم، فسفر و کلسیم است (Sharma et al., 2011). با توجه به راندمان حلال های قطبی و غیر قطبی در آزاد سازی ترکیبات فنولی، در این جا سعی بر آن شده است تا خواص آنتی اکسیدانی میوه " به" و مقادیر فنول، فلاونوئید و پروآنتوسیانین کل آن با توجه به راندمان استخراج برخی حلال های قطبی و غیر قطبی تعیین گردد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

میوه های تازه "به" از باغی در شاندیز در اطراف مشهد تهیه گردید. پس از جدا نمودن دانه های آن و عصاره گیری، حذف حلال برای عصاره های متانولی و هگزانی توسط دستگاه روتاری و برای عصاره آبی با دستگاه فریز درائینگ صورت گرفت.

فنل کل

۱۰۰میکرولیتر از نمونه (غلظت های مختلف گالیک اسید یا عصاره) توسط آب مقطر حجم آن به ۵/ ۰میلی لیتر رسانده شد، سپس به ترتیب ۰/۲۵ میلی لیتر از معرف فولین سیوکالتو و ۱/۲۵ میلی لیتر سدیم کربنات ۲۰٪ به هر لوله افزوده شد. بعد از مخلوط

کردن کامل محتویات لوله‌ها و بعد از گذشت ۴۰ دقیقه در دمای اتاق، جذب هر نمونه در طول موج۷۲۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. میزان فنل کل هر نمونه با توجه به نمودار استاندارد برحسب معادل گالیک اسید (GAE) بیان می‌شود.

فلاونوئیدهای کل

میزان فلانونوئید براساس تشکیل کمپلکس فلاونوئید ـ آلومینیم است که دارای جذب ماکزیمم در طول موج ۴۳۰ نانو متر است. کوئرستین برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد.

پروآنتوسیانیدین کل: ۰/۵ میلی لیتر از غلظت های مختلف کاتشین (یا محلول عصاره) با ۱/۵ میلی لیتر محلول متانولی وانیلین ۴٪ و ۰/۷۵ میلی لیتر HCl غلیظ مخلوط شد. بعد از ۱۵ دقیقه، جذب آن در طول موج ۵۰۰ نانومتراندازه گیری شد.

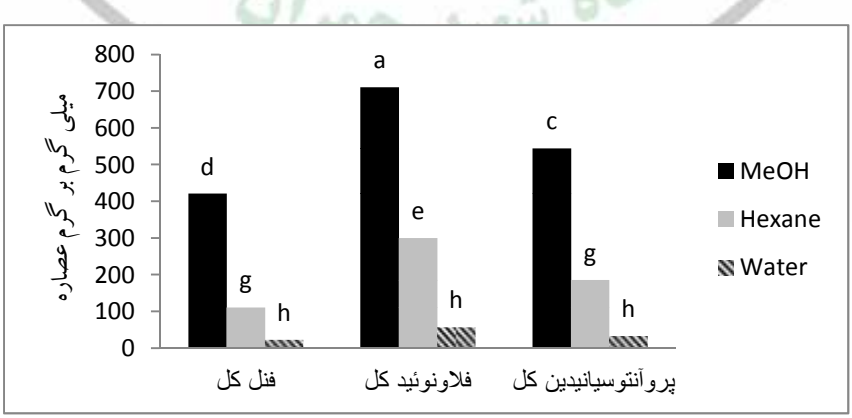
تعیین فعالیت روبشگری رادیکال DPPH : این روش توانایی هیدروژن دهندگی (الکترون‌دهندگی) را اندازه‌گیری می‌کند. بنابراین میزان فعالیت روبشگری رادیکال آزاد توسط آنتی‌اکسیدان را نشان می‌دهد (Kirby and Schmidt, 1997). ابتدا برای تهیه محلول‌های مختلف نمونه (۱۰۰، ۸۰، ۶۰، ۴۰، ۲۰، ۱۰میکروگرم در میلی لیتر) عصاره‌ها در متانول حل شدند. ۲ میلی لیتر از محلول نمونه با ۱ میلی لیتر محلول متانولی DPPH (۰/۲ میلی مولار) مخلوط شد و پس از تکان دادن در دمای اتاق و تاریکی ۳۰ دقیقه نگهداری و جذب آنها در طول موج ۵۱۷ نانو متربا استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد (Saha et al., 2004). متانول برای صفر کردن دستگاه استفاده شد (kulisic et al., 2004). درصد رنگ بری محلول DPPH طبق معادله محاسبه می‌شود.

$$\text{٪مهار} = (B_0 - B_1/B_0)\times 100 \qquad B_0 = \text{جذب محلول کنترل منفی} \qquad B_1 = \text{جذب مخلوط واکنش}$$

در این آزمایش ویتامینC و BHT به عنوان استاندارد بودند. آزمایش به صورت طرح کاملا تصادفی انجام گرفت. داده ها توسط نرم افزار رایانه ای Mstat-C مورد تجزیه شد.

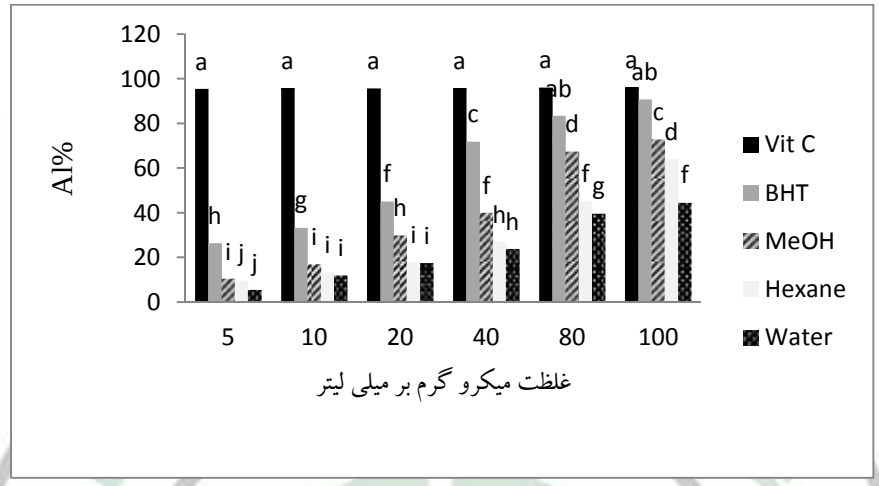
نتایج و بحث

بر اساس نتایج حاصل مقادیر فنل، فلاونوئید و پروآنتوسیانیدین کل عصاره متانولی نسبت به عصاره های هگزانی و آبی اختلاف معنی داری مشاهده گردید ($P<0.01$)، این مقادیر در عصاره های آبی نسبت به عصاره های هگزانی و متانولی کمتر گزارش شد. همچنین در میوه "به" مقادیر فلاونوئید کل عصاره های مختلف نسبت فنل و پروآنتوسیانیدین کل انواع عصاره ها اختلاف معنی داری را نشان داد ($P<0.01$) (شکل ۱).



شکل ۱- مقادیر فنل، فلاونوئید و پروآنتوسیانیدین عصاره های متانولی، هگزانی و آبی میوه "به"

شاخص آنتی اکسیدانی ویتامین C > BHT > عصاره متانولی > عصاره هگزانی > عصاره آبی بود. همچنین با افزایش غلظت، شاخص آنتی اکسیدانی افزایش یافت (شکل ۲). با توجه به نتایج IC_{50} عصاره های متانولی، هگزانی و آبی اختلاف معنی داری مشخص شد به طوری که عصاره متانولی در غلظت کمتر سبب ۵۰٪ فعالیت روبشگری می گردید و این نشان دهنده قابلیت مهار کنندگی بیشتر عصاره متانولی نسبت به عصاره های هگزانی و آبی بوده است.



شکل ۲- میانگین شاخص آنتی اکسیدان عصاره های متانولی، هگزانی و آبی میوه "به" ، ویتامین C و BHT به روش DPPH

جهت مقایسه اثرات آنتی‌اکسیدان عصاره‌های متانولی، هگزانی و آبی "به" در روش DPPH از پارامتر دیگری به نام IC_{50} استفاده شد. IC_{50}عصاره، غلظتی از عصاره می‌باشد که باعث ۵۰٪ فعالیت روبشگری می شود. در جدول ۱ نتایج حاصل از محاسبه IC_{50} عصاره‌های مختلف، ویتامین C و BHT در روش DPPH آمده است.

جدول ۱ نتایج حاصل از محاسبه IC_{50} عصاره‌های مختلف، ویتامین C و BHT در روش DPPH

نمونه مورد بررسی	IC_{50} (µg/ml)
ویتامین C	۲/۴۸
BHT	۲۵/۳۱
عصاره متانولی	۵۳/۹۷
عصاره هگزانی	۸۸/۶۸
عصاره آبی	۲۴۲/۶۵

تحقیقات بسیاری نشان داده اند که گونه هایی که حاوی ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی هستند دارای فعالیت آنتی اکسیدانتی نیز می باشند (Hinneburg et al., 2008. Oskoueian et al., 2011). فنل ها از ترکیبات بسیار مهم گیاه هستند چون این ترکیبات توانایی روبشگری دارند که این اثر به علت وجود گروه هیدروکسیلی آن ها است. وجود ترکیبات فنلی ممکن است مستقیما در اثر آنتی اکسیداتیو نمونه دخیل باشد (Gulcin et al., 2002). به علت پیچیدگی خصوصیات شیمیایی حلال ها و ساختار متنوع و ترکیب مواد گیاهی، رفتار سیستم های حلال حاوی مواد گیاهی متفاوت است و همین امر پیش بینی عملکرد آنها را مشکل کرده است. هیچ حلالی به تنهایی قادر به استخراج همه آنتی اکسیدان های با دارای قطبیت و مقادیر انحلال متفاوت نیست (Yang ME et al., 2007).

منابع

1. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2011. Biodiversity: Agricultural biodiversity in F A O, Retrived july 15, 2013. rom http://www. Fao, Org/biodiversity.
2. Gate, L., Paul, J., Nguyen Ba, G., Tew, D.K., and Tapiero, H. 1999. Oxidative stress induced in pathologies : the role of antioxidants. Biomed. Pharmacother. 53: 169-180.
3. Gulcin, I., Oktay, M., Kufrevioglu, I.Ö., and Aslan, A. 2002. Determination of antioxidant activity of *Lichen Cetriaria islandca* (L) Ach. J. Ethnopharmacol. 79: 325-329.
4. Hinneburg, I., Damien Dorman, HJ., and Hiltunen, R. 2008. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. Food Chem. 97: 122-129.
5. Kirby, A.J. and Schmidt, R.J. 1997. The antioxidant activity of Chinese herbs for eczema and of placebo herbs-1. J. Ethnopharmacol. 56: 103-108.
6. Kulisic, T., Radonic, A., Katalinic, V. and Milos, M. 2004. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil . Food Chem. 85: 633-640.
7. Laughton, M.J., Halliwell, B., Evans, J.P., and Hoult, S.R.J. 1989. Antioxidant and prooxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. Biochem. Pharmacol. 38: 2859-2865.
8. Milos, M., Mastelic, J., and Jerkovic, I. 2000. Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from organo (*Origanum vulgar* L. ssp. hirtum). Food Chem.71: 79-83.
9. Oskoueian, E., Abdullah, N., Ahmad, S., Saad, WZ., Omar, AR., and HO, YW. 2011c. Bioactive compounds and biological activities of *Jatropha curcas* L. kernel meal extract. Int. J. Mol. Sci. 12: 5955-5970.
10. Saha, K., Lajis, N.H., Israf, D.A., Hamzah, A.S., Khozirah, S., Khamis, S. and Syahida, A. 2004. Evaluation of antioxidant and nitric oxide inhibitory activities of selected Malaysian medicinal plant. J. Ethnopharmacol .92: 263-267.
11. Sharma. R, V. K. Joshi and J. C. Rana. 2011. Nutritional composition and processed of Quince (*Cydonia oblonga Mill*.). Indian Journal of Natural Products and Resources.2(3): 354-357.
12. Silva. B. M, P. B. Andrade, R. C. Martins, P. Valentao, F. Ferreres, R. M. Seabra and M. A. Ferreira. 2005. Quince (*Cydonia oblonga Mill*.) fruit characterization using principal component analysis. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53: 111–122.
13. Yang ME, D., Wang ME, Q., Ke BE, L., Jiang BE, J. and Ying., T. 2007. Antioxidant activities of various extracts of lotus (Nelumbo nuficera Gaertu) rhizome. J. Clin. Nutr. 16: 158-163.

Study of Total Phenolic Content and Antioxidant Activity In Some Selected Extract of *Cydonia oblonga*

S.F.Taghizadeh[1*], Gh.Davarynejad[2], J.Asili

1-Ph.D Student of Horticultural Science, Ferdowsi University of Mashhad. 2-Professor, Dep. of Horticultural Science, Ferdowsi University of Mashhad. 3- Associate Professor, Dep. of Pharmacognosy, Mashhad University of Medical Science

[*]Corresponding author: sfaezeh_taghizadeh@yahoo.com

Abstract

For investigating the total phenolic, flavonoid, proanthocyanin content and antioxidant activities of methanol, hexane and water extracts from *Cydonia oblonga* the examination were conducted as a complete randomized design with three replications. The results showed the significant different ($p<0.01$) between total phenolic, flavonoid, proanthocyanin content of selected extract. Higher extraction yield was seen in methanol extract than hexane and water extract. The results about the DPPH radical- scavenging activities revealed that the highest activity of methanol extract and lowest activity in aqueous solvent. The most effective of IC50 values were calculated in methanol extract, so methanol was the most efficiency solvent among the other selected ones.

Key words: Phenolic compound, Flavonoid, Proanthocyanidin, Antioxidant activity, Cydonia oblonga