مقایسه سنجش فعالیت پاداکسایشی عصاره های متانولی وآبی دو رقم انگور(*Vitis vinifera* L.)

***نسرین حسین زاده**
گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه
* نویسنده: *nasrinnhoseinzadeh@gmail.com*

چکیده

انگور (*Vitis vinifera* L) یکی از مهمترین وقدیمی ترین گیاهان چند ساله در جهان است که از دیر باز مورد استفاده بشر قرار گرفته است وتنوع مصرف وسطح زیر کشت آن درسراسر جهان بیانگر اهمیت این محصول می باشد. این مطالعه تهیه عصاره های متانولی وآبی از میوه دو رقم انگور (ایزابلای فرانسوی و سیاه ارومیه) است که درپنج غلظت مختلف (متانول ۱۰۰،۷۵،۵۰،۲۵،۰٪) تهیه واستخراج ترکیبات فنلی وفلاونوئیدی صورت گرفت. بررسی فعالیت پاداکسایشی عصاره های متانولی وآبی دو رقم مذکور بوسیله سه آزمایش مختلف مانند سنجش فنول کل، اندازه گیری محتوای فلاونوئید، ظرفیت جمع آوری رادیکال DPPH با سه تکرار انجام شد ونتایج تحت تجزیه وتحلیل آماری قرار گرفت. نتایج حاصل از تجزیه واریانس هر دو آزمایش نشان داد که اثرات اصلی و برهم کنش آنها برای کلیه ی ویژگی های اندازه گیری شده معنی دار بود. درآزمایش فنول کل میزان غلظت (۷۵درصد متانول) در انگور ایزابلا بیشتر از دیگر غلظتهای دو انگور مذکور بود، وکمترین مقدار مربوط به غلظت (صفر درصد متانول) در انگورایزابلا بود .در اندازه گیری محتوای فلاونوئید کل میزان غلظت (۱۰۰ درصد متانول) در انگور ایزابلا بیشترین مقدار را نسبت به غلظتهای دیگر داشت وکمترین مقدار مربوط به غلظت (۲۵درصد متانول) در انگور سیاه بود. در اندازه گیری میزان ظرفیت جمع آوری رادیکال DPPH بیشترین میزان غلظت مربوط به (متانول ۷۵ درصد) در انگور ایزابلا وکمترین مقدار مربوط به غلظت (صفر درصد متانول) در انگور ایزابلا بود.

کلمات کلیدی: فعالیت پاداکسایشی _انگور_ ترکیبات فنولی_ جاروب سازی رادیکال

مقدمه

انگور(*Vitis vinifera L*)یکی از مهمترین وقدیمی ترین گیاهان چند ساله در جهان است که از دیر باز مورد استفاده بشر قرار گرفته است وتنوع مصرف وسطح زیر کشت آن درسراسر جهان بیانگر اهمییت این محصول می باشد. میوه انگور در میان سایر میوه های درختی به واسطه داشتن متابولیتهای ثانویه و تنوع مصرف تازه خوری، خشکباری وکنسروی، آب انگور، سرکه منحصر به فرد بوده و جایگاه خاصی در تجارت جهانی دارد(۹).

هسته انگور بطور متوسط ۲/۵ درصد از وزن انگور را تشکیل می دهد و دارای ترکیبات آنتی اکسیدانی و ضدمیکروبی بسیار قوی میباشد(۲). فنل ها از ترکیبات بسیار مهم گیاه هستند چون این ترکیبات توانایی جاروب کردن رادیکال های آزاد را دارند که به علت وجود گروه هیدروکسیلی می باشد .وجود ترکیبات فنلی ممکن است مستقیما در اثر آنتی اکسیداتیو نمونه دخیل باشد(۶). 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 و به این ترتیب روند پیشرفت بیماری های ذکر شده را کند یا متوقف می سازند .امروزه استفاده از آنتی اکسیدان های مصنوعی بسیار رواج یافته است .لیکن مطالعات متعدد حاکی از سمیت این آنتی اکسیدان ها می باشد(۵).

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه:

میوه های بالغ ورسیده دو رقم انگور، شامل انگور ایزابلا که از یکی از باغات شهر وان (ترکیه)،و انگور سیاه (قره اوزوم)که در مهر ماه سال ۱۳۹۷ از منطقه ی ریکان (امامزاده ارومیه) از بوته های مختلف تهیه شد. سپس این نمونه ها برای مطالعات

IrHC2019

بیوشیمیایی در فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد گروه زیست شناسی دانشگاه ارومیه تا زمان عصاره گیری نگهداری شدند. پس از خروج نمونه ها از فریزر ،برای تهیه حلال ۱۰۰٪متانول ، ۳۰ گرم انگور توزین شد بعد میوه این ارقام (ایزابلا)در هاون با ۱۰ میلی لیتر متانول ۹۸٪ له گردید. سپس ۵۰ میلی لیتر متانول اضافه کرده ومخلوط حاصل به مدت ۳ ساعت روی شیکر مغناطیسی قرارگرفت.سپس مخلوط حاصله بااستفاده از کاغذ واتمن صاف گردید وتا رسیدن به حجم ۱۰۰ میلی لیتر به آن متانول اضافه گردید.سپس در ادامه همین کار رابرای تهیه حلال (۷۵٪متانول ،۲۵٪آب مقطر)، (۵۰ ٪متانول،۵۰٪آب مقطر) ،(٪۲۵متانول،۷۵٪ آب مقطر)،و(٪۱۰۰ آب مقطر)انجام داده شد.عصاره های بدست آمده درون بطری های قهوه ای کوچک در دمای ۴ درجه سانتی گراد به دور از نور تا زمان آزمایش های بعدی نگهداری شد.تمام مراحل ذکر شده در بالا برای انگور سیاه نیز تکرار گردید.

تعیین محتوای فنول کل

محتوای فنول کل به وسیله معرف Folin-Ciocalteu واسید گالیک به عنوان استاندارد تعیین گردید .به این منظور ۷۵ میکرولیتر از هریک عصاره ها به ا میلی لیتر شناساگر فولین سیوکالتیو و۱ میلی لیتر کربنات سدیم ۷,۵ درصد اضافه شد.در ادامه محلول حاصله بمدت ۱ ساعت در دمای اتاق وتاریکی انکوبه گردید و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (HALO XB-10) جذب محلول در طول موج ۷۵۰ نانومتر اندازه گیری شد.

تعیین محتوای فلاونوئیدی کل

محتوای فلاونوئیدی کل براساس روش Bonvehi و همکاران (2001) با اندکی تغییر سنجش شد (۳) .در این کار در ابتدا۳۰۰ میکرولیتر ازهر یک از عصاره ها با ۱میلی لیتر کلرید آلومینیوم(Alcl3)۲درصد در محلول متانول (۵درصد اسید استیک در متانول) مخلوط شد. در ادامه کار اجازه داده شد تا مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه واکنش انجام دهد وجذب آن در طول موج ۴۳۰ نانومتر در برابر یک نمونه شاهد بدون واکنش دهنده خوانده شد.

تعیین ظرفیت جمع آوری رادیکال DPPH

تعیین میزان جمع آوری رادیکال آزاد DPPH عصاره های گیاهی براساس احیای محلولی متانولی DPPH مطابق با روش Zhang وهمکاران (۲۰۱۰) بااندکی تغییر انجام گرفت . در ابتدا حجمی معادل ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره با۲ میلی لیتر از محلول متانولی DPPH (۰/۰۰۴) در لوله آزمایش مخلوط شد وپس از گذشت یک ساعت در شرایط تاریکی ، میزان بی رنگ شدن DPPH با اندازه گیری مقدار جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر تعیین گردید.

درصد فعالیت جاروب کنندگی عصاره ها براساس معادله ی زیر محاسبه شد.

$$\text{درصد مهار رادیکال DPPH} = 1-(A1/A0)*100$$

A1 نشان دهندهی میزان جذب محلول حاوی عصاره وA0 نماینده ی میزان جذب محلول فاقد عصاره است.

تجزیه آماری

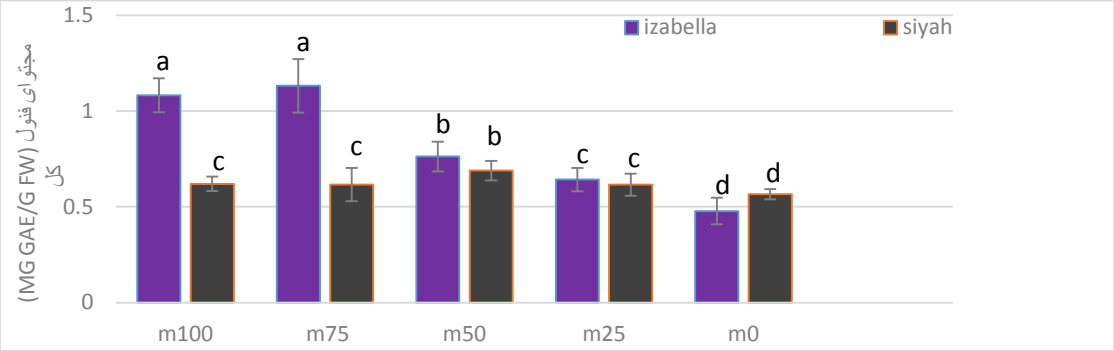
به منظور بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره های متانولی وآبی دو رقم انگور ،آزمایش در قالب ۳ تکرار انجام شد. تحلیل آماری و مقایسه آماری و مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون SPSS در سطح احتمال ۵درصد ورسم نمودار با نرم افزار اکسل صورت گرفت.

نتایج و بحث

نتایج به دست آمده نشان دهنده فعالیت بالای آنتی اکسیدانی عصاره استخراج شده از ارقام انگور مورد بررسی می باشد. در اندازه گیری فنول کل نشان داده شد که بیشترین غلظت مربوط به حلال (۷۵ ٪ متانول) در انگور ایزابلا بود وکمترین غلظت مربوط به حلال(۰درصد متانول) در انگو ایزابلا بود .در مقایسه بین دو ارقام مشاهده شدکه از نظر محتوای فنولی اختلاف معنی دار وجود داشت که در این بین بیشترین محتوای فنولی در حلال ۷۵ درصد متانول در انگور ایزابلا (۱۳۹۹۵ /۰ ± ۱/۱۳۱۳ میلی گرم اکی والانهای گالیک اسید بر صد گرم وزن تر) و کمترین میزان در حلال ۰ درصد متانول در انگور ایزابلا(0/0265 ± 0/566 میلی گرم اکی والانهای گالیک اسید برصد گرم وزن تر) مشاهده شد. در سال (۲۰۰۷) مطالعه ای

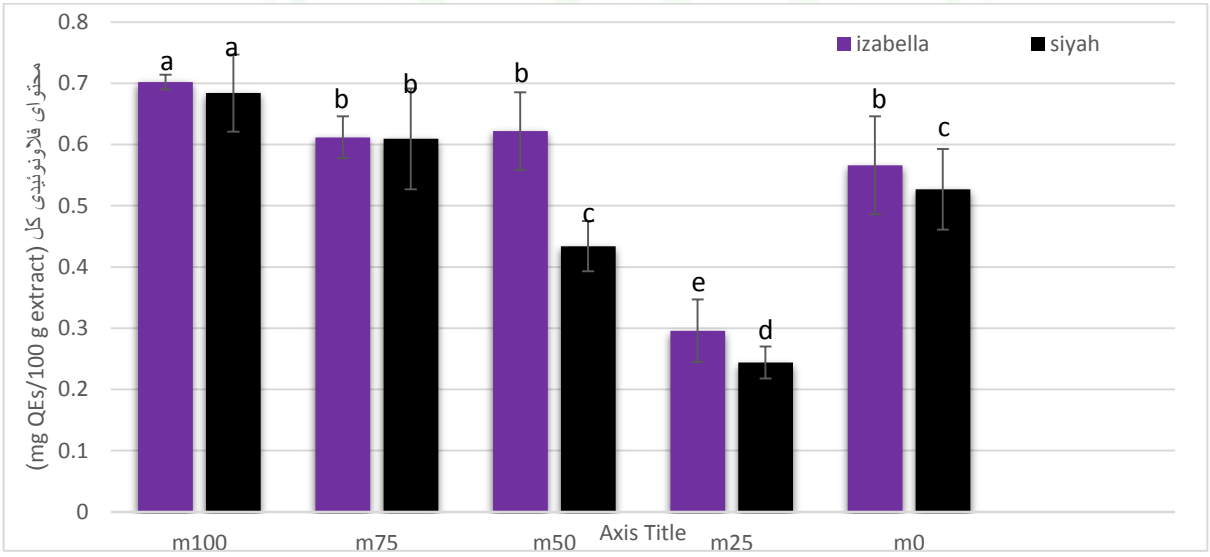
IrHC2019

توسط chiou و همکاران برروی محتوای فنلی و فعالیت پاداکسایشی سه زیر رقم انگور که هر کدام از سه منطقه مختلف یونان جمع آوری شده بوده صورت گرفته است. مقدار فنل کل بین زیر ارقام مختلف ومناطق مختلف متفاوت بود وبا مقادیر فنول بدست آمده از پوست انگور تازه مشابه بود (۴).



شکل۱ :محتوای فنول کل (حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف و حروف غیر مشابه نشان دهنده وجوداختلاف بین دو گروه است)

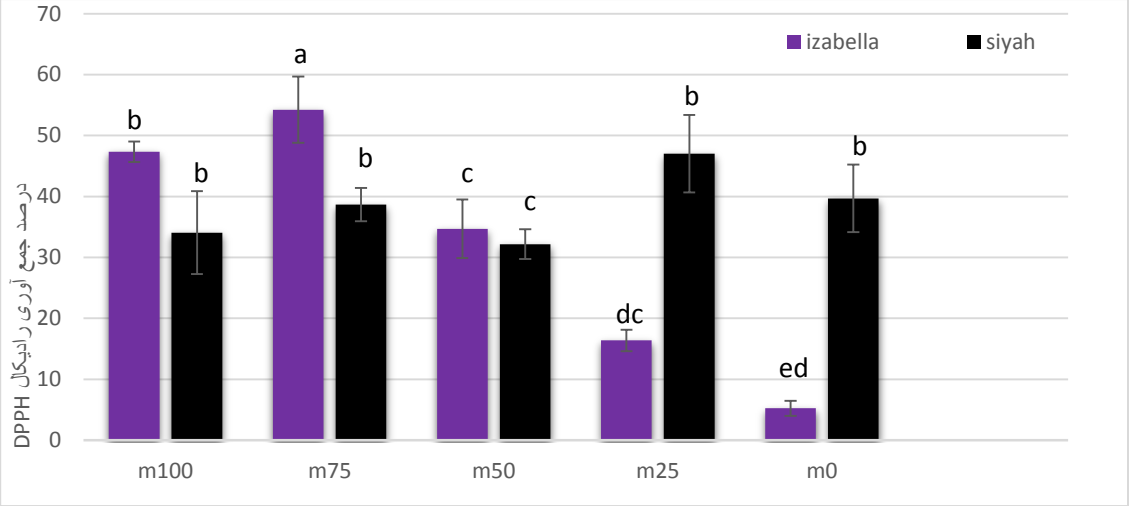
در اندازه گیری فلاونوئید کل مشاهده شد که بالاترین محتوای فلاونوئیدی مربوط به حلال ۱۰۰درصد متانول در انگور ایزابلا (0/01222 ± 0/702 میلی گرم اکی والانهای کوئرستین بر ۱۰۰ گرم وزن تر) وکمترین میزان در حلال ۲۵ درصد متانول در انگور سیاه (۰/۰۲۶۰۸ ± ۰/۲۴۴ میلی گرم اکی والانهای کوئرستین بر ۱۰۰ گرم وزن تر) می باشد. در تحقیقی که توسط katalinicو همکاران (۲۰۱۰) انجام شده محتوای فلاونوئیدی کل عصاره ی پوست میوه ی ۱۴ رقم انگور سفید و قرمز (۷رقم سفید و۷ رقم قرمز) مورد بررسی قرار گرفته است که میزان میانگین فلاونوئید کل در ارقام قرمز بیشتر از سفید گزارش شد (۷)



شکل۲: محتوای فلاونوئیدی کل(حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف و حروف غیر مشابه نشان دهنده وجود اختلاف بین دو گروه است)

آزمون DPPH بطورگسترده ای به منظور تعیین فعالیت بازدارندگی رادیکالهای آزاد ترکیبات خالص یا گیاهی مختلف به کار می رود (۸). در سنجش ظرفیت جمع آوری رادیکال DPPH مشاهده شد که بیشترین مقدار مربوط به حلال ۷۵ درصد متانول در انگور ایزابلا (۵/۴۴۱۱۱ ± ۵۴/۲۳۳۲درصد) وکمترین مقدار ، حلال ۰درصد متانول در انگورایزابلا(۱/۶۹۷۴۲ ± ۹/۷۴۱۲ درصد) بود. در تحقیقی فعالیت های پاداکسایشی و ترکیبات فنولی عصاره های دانه و پوست میوه انگور قرمز *Vitis vinifera* و *Vitis labrusca* در برزیل توسط Rockenbach و همکاران (۲۰۱۱) بررسی شد. بیشترین فعالیت پاداکسایشی بر اساس ازمون DPPH برای عصاره دانه های رقم Pinot noir و عصاره پوست Isabel گزارش شد (۱۰).

IrHC2019



شکل۳:درصد جمع آوری رادیکال DPPH (حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف و حروف غیر مشابه نشان دهنده وجود اختلاف بین دو گروه است)

نتایج بدست آمده بیانگر فعالیت بالای آنتی اکسیدانی عصاره استخراج شده در رقم انگور ایزابلا را نشان می دهد. طبق مطالعات انجام گرفته این آنتی اکسیدان های طبیعی می توانند بدن را در برابر آسیب اکسیداتیو ناشی از رادیکال های آزاد محافظت نمایند. اختلاف در قدرت آنتی اکسیدانی ترکیبات فنولیک گیاهان مختلف به اختلاف در ساختمان شیمیایی آن ها بر میگردد(۱)

منابع

۱) آقاسی، م.، اطهاری نیک اعظم، س. و موسوی، ع.(۱۳۷۸). اثر ترکیبات عصاره هسته انگور بر بیماری های قلبی-عروقی نشریه رازی. سال نوزدهم. شمارعه ۶. صفحات ۵۷۶-۵۸۶.

۲) موحد، س. و قوامی، م. (۱۳۸۶) .مقایسه و تعیین ترکیب اسیدهای چرب روغن هسته انگور ایرانی و وارداتی. پژوهش و سازندگی در منابع طبیعی .شماره ۷۵. صفحات ۱۶-۹.

۳) Bonvehi,J.S., Torrento , M.S .and Lorente,E .C .2001 .Evaluation of polyphenolic and flavonoid compound in honeybee-collected pollen Produed in Spain .Journal of Agricultural and Food Chemistry49.(4):1848-1853 .

۴)Chiou, A., Karathanos, V.T., Mylona, A., Satlta, F.N., Preventi , F. and Andrikopoulos, N.K.2007. Currants (*Vitis vinifera L.*) content of simple phenolics and antioxidant activity. Food Chemistry. 102:516-522.

۵) 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.

۶)Gulcin I., Oktay M., Kufrevioglu I.Ö., an Aslan A(2002). Determination of antioxidant activity of Ethnopharmacology, 79:325-329.

۷)Katalinic, V., Mozina, S.S., Skroza, D., Generalic , I., Abramovie, H.,Milos, M., Ljubenkov, I., Piskernik,S., Pezo,I.,Terpine, D. and Boban, M.2010. Polyphnolic profile, antioxidant propreties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia(Croatia). Food Chemistry.119:715-723.

۸)Mayachiew, P. and Devahastin, S. (2008). Antimicrobial and antioxidant activities of Indian gooseberry and galangal extracts. LWT.41: 1153-1159.

۹)Rasoli, V., Farshadfar, E., and Ahmadi, J. 2014, Genetic diversity and path analysis of grapevine *(Vitis vinifera* L.) yield components in different environmental conditions. Plant Ecophysiol. 19: 58-68.

۱۰)Rockenbach, I.I., Gonzaga, L.V., Rizelio, V.m., Goncalves, A.E.S.S. , Genovese .M.I.and Fett, R.2011.phenolic compounds and antioxidant activity of seed and skin extracts of red grape(*Vitis vinifera and Vitis labrusca*)Pomace from Brazilian winemaking .Food Research Intrenational. 44:897-901.

IrHC2019

Comparative study of antioxidant activity of methanolic and aqueous extracts of two cultivars of grapes

Nasrin Hoseinzadeh
Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran
Author: nasrinnhoseinzadeh@gmail.com

Abstract
Grape (*Vitis vinifera* L.) is one of the most important and most endemic plants in the world that has been used for a long time. The variety of cultures used throughout the world represents the importance of this product. This study was carried out to prepare extracts of methanol and water from fruits of two grape varieties (French isabella and Black Uromieh), which was prepared in different concentrations (methanol 100, 75, 50, 25.0%), preparation and extraction of phenolic and flavonoids. The antioxidant activity of methanolic and water extracts of the two cultivars was performed by three different experiments such as total phenol, flavonoids content, DPPH radical capture capacity with three replications. The results were analyzed statistically. The results of analysis of variance of both experiments showed that their main effects and their interaction were significant for all measured characteristics. The total phenol concentration (75% methanol) in Isabella grapes was higher than the other concentrations of the two grapes, and the lowest was the concentration (zero percent of methanol) in the grape juice. In measuring the total flavonoid content, the concentration (100% methanol) in Isabella grapes had the highest concentrations compared to other concentrations and the lowest was the concentration (25% methanol) in black grapes. DPPH radical collection capacity was the highest concentration (75% methanol) in Isabella grapes and the lowest concentration (0% methanol) in isabella grapes.

Key words: antioxidant activity-gang-phenolic compounds-radical sweeping

IrHC2019