هفتمین کنگره علوم باغبانی ایران، ۱٤ تا ۱۷ شهریور ماه ۱۳۹۰، دانشگاه صنعتی اصفهان

ارزیابی و مقایسه میزان فنول و کوئرستین در اندامهای رویشی چهار رقم انگور ایرانی

ملیحه افتخاری (۱)، مهدی علیزاده (۱)، پونه ابراهیمی (۲)

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیارگروه باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،

۲- استادیار مجتمع آموزش عالی گنبد

فلاونوئیدها به خاطر دارا بودن فعالیت آنتی اکسیدانی نقش برجسته ای در جلوگیری از بیماری های قلبی عروقی و سرطان داشته و به همین دلیل تمایل روزافزونی به بررسی ترکیبات فنولی وجود دارد. در این تحقیق به مطالعه محتوای فنول کل (به روش فولین سیوکالتئو) و فلاونوئید اصلی انگور، کوئرستین (توسط HPLC) در چهار رقم انگور (عسگری، خلیلی، کشمشی و شاهرودی) و محتوای آن ها در اندام های برگ، شاخه و ریشه پرداخته شد. نتایج نشان داد که در شرایط یکسان، میزان فنول کل در برگ و ریشه ارقام مختلف، تفاوت معنی داری نداشت اما فلاونوئید کوئرستین در برگ و شاخه ارقام مختلف اختلاف معنی دار ($P<۰/۰۵$) نشان داد. در رقم عسگری و پس از آن خلیلی بیشترین میزان کوئرستین در برگ نسبت به دو رقم دیگر اندازه گیری شد. با وجود این که در رقم شاهرودی کمترین میزان کوئرستین برگ تخمین زده شد ولی در ساقه بیشترین میزان مربوط به این رقم بود. نتایج این بررسی نقش عوامل ژنتیکی را برجسته می سازد. باتوجه به مقدار زیاد کوئرستین تخمین زده شده در برگ و ساقه ارقام انگور مطالعه شده و تولید وسیع انگور در جهان به نظر می رسد که استخراج کوئرستین از برگ و ساقه این گیاه بتواند در تولید این متابولیت ثانویه گرانبها سود اقتصادی زیادی به همراه داشته باشد.

کلمات کلیدی: انگور، فنول، کوئرستین، HPLC

مقدمه

نقش میوه ها درحفظ سلامتی انسان‌ها، اساساً به فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولی موجود در آنها مربوط می‌شود. این آنتی-اکسیدان‌ها به عنوان عوامل کاهنده با دادن هیدروژن، دفع کردن اکسیژن تک، ایجاد کلات و به تله انداختن رادیکال‌های آزاد عمل می‌کنند که در غیر این صورت این مولکول‌های بسیار فعال که در سیستم‌های بیولوژیکی وجود دارند ممکن است اسیدهای نوکلئیک، پروتئین‌ها و لیپیدها را اکسید کردهو بیماری‌هایی مانند سرطان، بیماری‌های قلبی عروقی، ناهنجاری‌ها و پیری پوست را موجب شوند (هاربورن و ویلیامز، ۲۰۰۰؛ هیم و همکاران، ۲۰۰۲). در چند سال اخیر تمایل درحال افزایشی به تعیین منابع غذایی حاویمواد فنولی آنتی‌اکسیدان به‌وجود آمده است (یاکوپینی و همکاران، ۲۰۰۸).

انگور[17]از میوه‌هایی است که بیشترین محتوای این ترکیبات را داراست. مقدار زیادی از ترکیبات فنولی مختلف در پوست، گوشت و بذر انگور وجود دارد. این مولکول‌ها نقش مهمی در برخی خصوصیات حسی انگور مثل طعم و رنگ ایفاء می‌کنند (ریویلا و ریان، ۲۰۰۰). فنول‌ها به دو گروه اصلی تقسیم می‌شوند: ترکیبات فلاونوئیدی و غیرفلاونوئیدی. هر خانواده پلی-فنول مستقیماً مسئول خصوصیات ویژه ارقام مختلف انگور است.کوئرستین فلاونوئید اصلی انگور (ونگ و هوانگ، ۲۰۰٤)، از فلاونول‌های دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی موجود در پوست و بذر انگور است و ثابت شده است که آنتی‌اکسیدان قوی بوده و خصوصیات بیولوژیکی، داروشناسی و درمانی مهمی دارد. این ترکیب نشان داده شده است که از اکسیداسیون کلسترول خوب[18] خون، تجمع پلاکت‌های خون و درنتیجه تصلب شرایین جلوگیری کرده و خصوصیات ضدسرطانی نشان می‌دهد. کوئرستین از نظر کمی مهم‌ترین فلاونوئید در رژیم غذایی ماست (آیگورا و همکاران، ۲۰۰۱).

علی‌رغم وجود گزارش‌های زیاد درمورد ترکیبات فنولی و فعالیت ضد رادیکالی نمونه‌های بذر و میوه و محصولات جانبی این میوه، در مورد محتوای فنولی ارقام انگور بومی ایران (ویتیس وینیفرا) و مقایسه آن‌ها با ارقام مشهور بین‌المللی تحقیق

---

17. *Vitisvinifera*
18. Low Density Lipoprotein

زیادی صورت نگرفته است. به‌علاوه مقالات بسیار کمی درمورد محتوای فنولاندام‌های دیگر بوته انگور ازقبیل برگ و ساقه وجود دارد.ازاین‌رو در این تحقیق محتوایفنول کل و کوئرستین موجود در برگ و ساقه هریک از چهار رقم انگور عسگری، خلیلی، کشمشی و شاهرودیکه از ارقام مهم تازه‌خوری و تجاری ایران به‌شمار می‌روند و مقایسه میزان کوئرستین در شاخه و برگ هریک از ارقام مورد ارزیابی قرارگرفت.

مواد و روش‌ها

استخراج عصاره فنولی جهت تعیین فنول کل

برای استخراج عصاره فنولی نمونه‌های برگ و ریشه از روش فولین‌سیوکالتیوبا کمی تغییرات استفاده شد.نتایج به صورت میلی‌گرم هم ارز اسید گالیک بر گرم وزن خشک گزارش گردید.

تهیه مواد گیاهی و استخراج کوئرستین

استخراج ترکیبات فنولی به روش اثنی‌عشری و همکاران (۲۰۰۸) با کمی تغییرات به شرح زیر انجام شد. برگ‌ها و شاخه‌های خشک‌شده به وسیله آسیاب کاملاً پودر شده و ۲ گرم از آن در داخل یک ارلن مایر ۵۰ میلی‌لیتری با ۱۲/۵ میلی‌لیتر متانول ۹۰٪ مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه روی همزن مغناطیسی قرار داده شد. محلول حاصل به مدت ۲ دقیقه با چرخشیمعادل ٤۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید و عصاره موجود در بالای لوله فالکون، در ظروف شیشه‌ای تیره رنگ تخلیه شد. مواد تجمع یافته در ته لوله توسط اسکالپل خارج و مجدداً پس از مخلوط نمودن با ۱۲/۵ میلی‌لیتر متانول ۹۰٪ به مدت ۳۰ دقیقه با همزن مغناطیسی به هم زده شد و به مدت ۲ دقیقه با همان چرخش سانتریفوژ گردید. عمل فوق عیناً برای بار سوم نیز تکرار شد، به طوری‌که از هر ۲ گرم برگ تازه انگور سه بار با روش مشابه عصاره‌گیری به‌عمل آمد تا با اطمینان بیشتری کوئرستین موجود در برگ‌های مورد آزمایش از آن‌ها خارج و در حلال حل شود. عصاره نهاییاز فیلتر ۰/۲ میکرومتر قبل از آنالیز گذرانده شد و سپس ۲۰ میکرولیتر از هریک از نمونه‌ها توسط نمونه‌گیر به دستگاه کروماتوگراف مایع با عملکرد بالا (HPLC) محصول مرک-هیتاچی(آلمان-ژاپن)تزریق شد. فاز متحرک ایزوکراتیک[19] شامل ٤۹/۹٪ متانول، ۰/۱٪ اسید استیک و ۵۰٪ آب یون‌زدایی شده بود. حداکثر طول موج برای آشکارسازی ۳٦۰ نانومتر، سرعت جریان ۱ میلی‌متر در دقیقه بود که باتوجه به زمان بازداری ۱۵ دقیقه‌ای سطح زیر پیک کروماتوگرام مربوط به کوئرستین تعیین شد.

ارزیابی کمی کوئرستین

ابتدا محلول‌های کار استاندارد خالص کوئرستین (خلوص ۹۵٪ ، شرکت سیگما[20]) با حل کردن در متانول ۹۰٪ در محدوده غلظت‌های ۷-۱ میلی‌گرم در لیتر تهیه و به دستگاه تزریق شد. تشخیص پیک مربوط به هر نمونه در کروماتوگرام حاصل، با مقایسه زمان بازداری ظاهر شدن پیک کوئرستین خالص تزریق شده با غلظت‌های مختلف و پیک‌های حاصل از عصاره‌های تزریقی انجام شد و برای تعیین میزان کوئرستین هریک از نمونه‌ها، سطح زیر پیک مربوطه در زمان موردنظر اندازه‌گیری شد.
تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از طرح بلوک‌های کامل تصادفی (با سه تکرار) و نرم‌افزار SASو مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون حداقل اختلافات معنی‌دار (LSD) در سطح ۵ درصد صورت گرفت و نتایج به صورت میانگین ± خطای استاندارد سه عصاره مستقل ارائه شد.

نتایج و بحث

محتوای فنول کل برگ و ریشه و کوئرستین موجود در برگ و ساقه چهار رقم انگوردر جدول ۱ نشان داده شده است. در تحقیق حاضر تفاوت آماری معنی‌داری بین میزان فنول کل برگ و نیز ریشه چهار رقم انگور مورد مطالعه مشاهده نشد (جدول

[19]. Isocratic
[20]. Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA)

۱) لیکن از لحاظ میزان فلاونوئید کوئرستین در دو اندام ساقه و برگ اختلاف آماری معنی‌دار بین ارقام وجود داشت (شکل ۱). یاکوپینی و همکاران (۲۰۰۸) با مقایسه ۱۰ رقم مختلف انگور اروپایی،دریافتند که محتوای فنول کل در تمام ارقام کاملاً متغیر است، هر رقم انگور ترکیب متفاوتی از پلی‌فنول‌ها دارد و همراه با تشکیل میوه، رشد و رسیدن آن، این ترکیب تکامل می‌یابد. ترکیبات فنولی مختلف موجود در عصاره فنولی می‌توانند همسو[۲۱]یا ضد[۲۲] هم عمل کرده و به طور مستقل بر فعالیت کل مخلوط تأثیر گذارند (یاکوپینی و همکاران، ۲۰۰۸). از این روست که با وجود بالا بودن میزان کوئرستین در برگ رقم عسگری و به دنبال آن خلیلی، میزان فنول کل در ریشه یا برگ این ارقام بالاترین مقدار نبوده و در رقم شاهرودی علی‌رغم زیاد بودن محتوای کوئرستین ساقه، میزان آن در برگ به کمترین مقدار می‌رسد (جدول ۱).

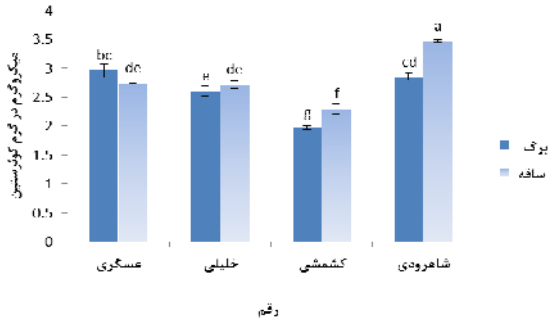
جدول۱. مقایسه میانگین محتوای فنول کل در برگ و ریشه و کوئرستین در برگ و ساقه چهار رقم انگور

رقم	فنول کل برگ (میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک)	فنول کل ریشه (میلی‌گرم در ۱۰۰گرم وزن خشک)	کوئرستین برگ (میکروگرم در گرم وزن خشک)	کوئرستین ساقه (میکروگرم در گرم وزن خشک)
عسگری	۵/۵۷± ۰/۹۹ ^{a*}	٤/٤۳ ± ۰/۷۸ ^{a}	۲/۹٦ ±۰/۱۱^{a}	۲/۷٤ ± ۰/۰۱^{b}
خلیلی	٤/۹۷ ± ۰/۵۲^{a**}	۵/۳۲ ± ۰/۸۳^{a}	۲/٦۰±۰/۰۹^{ab}	۲/۷۱ ± ۰/۰٦^{b}
کشمشی	٦/۷٦ ± ۱/۱۵^{a}	٤/۰۷ ± ۰/٤۲ ^{a}	۱/۹۷ ±۰/۰۳^{b}	۲/۲۹ ±۰/۰۹^{c}
شاهرودی	۵/۰۱ ± ۰/۵۵ ^{a}	۵/٦۹ ± ۰/٤۲^{a}	۲/۸۵ ± ۰/۰٦^{c}	۳/٤۷ ±۰/۰۱^{a}
LSD۰/۰۵	۳/۲۲	۲/۲۸	۰/۳۲	۰/۱٤

*اعداد دارای حروف مشترک در هر ستون اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ ندارند. ** اعداد دو ستون اول جذر اعداد اصلی به‌علاوه ۰/۵ و اعداد ستون سوم و چهارم Arc sin اعداد اصلی هستند.

ماسا و همکاران (۲۰۰۷) در بررسی پروفیل فلاونوئیدی (به عنوان نشانگر بیوشیمیایی) ده رقم انگور سفید[۲۳]، کوئرستین را به عنوان فلاونوئید اصلی در پوست میوه (به صورت گلیکوزید) اکثر ارقام مورد مطالعه (به جز دو رقم) تشخیص دادند. ترکیب فلاونوئیدها در ابتدا توسط عوامل ژنتیکی تعیین می‌شود، لیکن محتوای فلاونوئیدها در انگور درطول بلوغ تغییر می‌کند و شرایط فصلی و خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک نیز بر توزیع فلاونوئیدها در بوته تأثیر می‌گذارند. اکثر منابع (زوتو و فرانجی، ۲۰۰۸) این واقعیت را تأیید می‌کنند که عوامل غیرژنتیکی (شرایط محیطی، مدیریت تاکستان و غیره)نیز بر غلظت فلاونوئیدها تا حدودی تأثیرگذارند(ماسا و همکاران، ۲۰۰۷)ولی چون مواد گیاهی استفاده شده در مطالعهحاضر در شرایط محیطی و مراقبت های زراعییکسان قرار داشتند، بنابراین از تجزیه آماری می‌توان نتیجه گرفت که اختلافات در میزان کوئرستین می‌تواند تنها به علت رقم باشد. در این تحقیق بررسی اندام‌های برگ و ساقه در هریک از چهار رقم انگور از نظر میزان کوئرستین نشان داد که در رقم شاهرودی و کشمشی محتوای کوئرستین ساقه، در رقم عسگری برگ و در رقم خلیلی اختلاف آماری معنی‌داری با اندام دیگر داشت. در بین کلیه ارقام و دو اندام مورد مطالعه، اندام ساقه رقم شاهرودی بیشترین میزان کوئرستین را با اختلاف معنی‌دار نسبت به باقی تیمارها نشان داد.

[21]. Synergism
[22]. Antagonism
[23]. Albarino, Caino, Dona Branca, Godello, Lado, Loureiro, Ratino, Torrontes, Treixadura, Xerez



شکل ۱. مقایسه میزان کوئرستین در ساقه و برگ چهار رقم مختلف انگور

فلاونول‌ها در پوست میوه انگور منحصراً به شکل ۳–او–گلیکوزید وجود دارند که مشتقات گلیکوزید کوئرستین به عنوان فراوان‌ترین ترکیبات از این زیرگروه فلاونوئیدها هستند (نواک و همکاران، ۲۰۰۸). میزان کوئرستین تخمین زده شده در این آزمایش (در هردو برگ و ساقه) در مقایسه با میزان گزارش‌شده در میوه انگور یک رقم ایتالیایی[۲٤]، آب انگور و کشمش[۲۵] (۰/۵ تا ۱۹/۰ در مقایسه با ۰/۱۷ تا ٤/۵۸ میلی‌گرم در لیتر) بسیار بیشتر است که می‌تواند احتمالاً به نوع رقم نسبت داده شود و این‌که کوئرستین در میوه گلیکوزیده می‌شود. در عصاره پوست میوه شش رقم انگوربرزیلی، مقدار کوئرستین از ۱۵/۱۹ تا ٤۰/۰۳ و در عصاره بذر انگور از صفر تا ۳/٦۸ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم گزارش گردیده است (روکنباک و همکاران، ۲۰۱۱) که در مقایسه با میزان اندازه‌گیری شدهدر تحقیق حاضر (۰/۹ تا ۳٤/۲ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم) می‌توان دریافت که برگ و ساقه منبع مهم با محتوای خوب کوئرستین هستند و درنتیجه برگ و شاخه‌های حاصل از هرس بوته‌های مو می‌توانند منبع ارزان استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدان به‌ویژه کوئرستین باشند.

منابع

Esna-Ashari, M., Gholami, M., Zolfigol, M., Shiri, M., Mahmoodi-Pour, A., & Hesari, M. (2008). *Chromatographia, 67*, 1017–1020.
Harborne, J., & Williams, C. (2000). *Phytochemistry, 55*, 481-504.
Heim, K., Tagliaferro, A., & Bobilya, D. (2002). *Journal of Nutritional Biochemistry, 13*, 572-584.
Iacopini, P., Baldi, M., Storchi, P., & Sebastiani, L. (2008). *Journal of Food Composition and Analysis, 21*, 589– 598.
Igura, k., Ohta, T., Kuroda, Y., & Kaji, K. (2001). *Cancer Letters, 171*, 11-16.
Masa, A., Vilanova, M., & Pomar, F. (2007). *J. Chromatogr. A, 1164*, 291–297.
Novak, I., Janeiro, P., Seruga, M., & Oliveira-Brett, A. (2008). *Analytica Chimica Acta, 630*, 107–115.
Revilla, E., & Ryan, J. (2000). *Journal of Chromatography A, 881*, 461–469.
Rockenbach, I., Gonzaga, L., Rizelio, V., Schmidt Gonçalves, A., Genovese, M., & Fett, R. (2011).in press.
Stecher, G., Huck, C., Popp, M., & Bonn, G. (2001). *Fresenius J Anal Chem, 371*, 73–80.
Wang, S., & Huang, K. (2004). *J. Chromatogr. A, 1032*, 273–279.
Zotou, A., & Frangi, E. (2008). *Chromatographia, 67*, 789–793.

[24]. Chianti
[25]. Sultanas

Evaluation and comparison of total phenols and quercetin in vegetative parts of four Iranian grape varieties

Maliheh Eftekhari[1*], Mahdi Alizadeh[1], Pouneh Ebrahimi[2]
1.M.Sc. student and assistant professor,GorganUniversity of Agricultural Sciences and Natural Resources 2. Assistant professor, Gonbad Institute of Higher Education
(*email: mlheftekhari@gmail.com)

Abstract
There is considerable interest in the analysis of phenolic compounds due to their involvement in their contribution to protection against cardiovascular diseases and cancers through their antioxidant activity. This work describes studies of the polyphenol content, both total (by Folin–Ciocalteu method) andflavonoidquercetin (byHPLC) in four varieties of grape (Asgari, Khalili, Keshmeshi and Shahroudi) and their contents in different parts of vine (leaf, cane and root). The results showed that at the same conditions total phenol concentrations did not show significant differences ($p< 0.05$)neither in root nor leaf butquercetinwas found to be greatly variable both in leaf and cane of various grape varieties. Significant higher ($p< 0.05$) concentrations of leaf quercetine were observed in Asgari variety leaves followed by Khalili and the least was found in Shahroudi while it showed the highest amount of quercetin in cane samples. The results emphasize on the great role of genetic factors on plyphenols production.

In regard to extensive estimated amounts of quercetin in leaves and canes of studied grapes and at present levels of worldwide grape production, the extraction of quercetin from grape leaf and cane may have a great economical profit.

Keywords: Grapevine, Phenols, Quercetin, HPLC