ارزیابی برخی ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در میوه، برگ و دانه ازگیل

جواد عرفانی مقدم*[۱]، زینب صادقی نژاد[۲]
[۱]دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران
[۲]دانشجوی دکتری گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران
*نویسنده مسئول: j.erfani@ilam.ac.ir

چکیده

ازگیل (*Mespilus* spp.) متعلق به خانواده رزاسه (Rosaceae) یکی از مهم‌ترین میوه‌های جنگلی که دو گونه آن در ایران وجود دارد. در این پژوهش برخی از ترکیبات فیتوشیمیایی دو گونه ازگیل شامل *M. canescens* و *M. germanica* ارزیابی شده است. بدین منظور، میوه، برگ و دانه دو گونه ازگیل جمع‌آوری و توسط متانول ۷۰٪ عصاره‌گیری و با استفاده از اسپکترفتومتر و HPLC آنالیز شدند. نتایج اولیه نشان داد بیشترین میزان فنل کل (۱۴/۷۳ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک) و فلاونویید کل (۰/۹۰ میلی‌گرم کوئرسیتین بر گرم وزن خشک) به ترتیب در برگ *M. canescens* و میوه *M. germanica* شناسایی شد. بیشترین ضریب تغییرات مربوط به فرولیک اسید (۱۹۶٪/۸۱) و بعد از آن سینامیک اسید (۱۷۴٪/۵۹) و کامپفرول (۱۱۲٪/۴۲) بود. کمترین ضریب تغییرات مربوط به کوئرستین (۴۴٪/۷۸) و سپس کافئیک اسید (۵۲٪/۵۳) و فنل کل (۵۹٪/۷۴) بود. نتایج همبستگی ساده نشان داد همبستگی مثبتی بین برخی از ترکیبات فیتوشیمیایی وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: ازگیل، ترکیبات فیتوشیمیایی، فنل، کوئرسیتین

مقدمه

ازگیل با نام علمی .*Mespilus* spp میوه‌ای است از خانواده Rosasea از سرده ازگیل‌ها (*Mespilus*) هم خانواده با سیب و گلابی که از طرف گیاه‌شناسان مختلف نامگذاری شده است. جنس ازگیل دو گونه دارد که اولی همان ازگیل معمولی با نام علمی *M. germanica* است. این گونه بومی جنوب غربی آسیا و احتمالا جنوب شرق اروپا است اما منشاء آن را ایران می‌دانند. گونه دیگر *M. canescens*، اخیرا در آمریکای بابلی کشف شده است. ازگیل یک درخت خاردار متعلق به منطقه‌ی مدیترانه‌ای است (Peto *et al*., 2016). چندین واریته از این میوه در اروپا و آسیا شناخته شده است (Hacıseferogulları *et al*., 2005). ازگیل خاردار که به حالت وحشی در جنگل‌های اروپای مرکزی و نواحی معتدل آسیا می‌روید و در اواخر پاییز و اوایل زمستان می‌رسد. ازگیل در تمام جنگل‌های بابل ایران و همه ارتفاعات سواحل دریا و در دامنه‌های البرز، دره کرج و ... نیز به طور خودرو عمل می‌آید و با نام محلی هر منطقه شناخته می‌شود. ازگیل حاوی ویتامین‌های ب و ث، تانن، سلولز و سیتریک اسید می‌باشد. در درمان عفونت‌های روده بزرگ نقش داشته و ویتامین ب موجود در ازگیل تقویت کننده اعصاب بوده و از نظر تغذیه‌ای میوه اهمیت دارد. ازگیل هم‌چنین حاوی قند، اسیدهای آلی و آمینواسیدها می‌باشد (Ayaz *et al*., 2008). در پژوهشی، مشخص شد میوه‌های ازگیل (*M. germanica*) منبع غنی از فلاونوئیدها و آنتی‌اکسیدان‌ها می‌باشد و داده‌ها نشان دادند که میوه ازگیل غنی از آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند کافئیک اسید و فرولیک اسید، الارجیک اسید، کوئرستین، آلفا توکوفرول، پیروگالول، پی‌کوماریک اسید، آسکوربیک اسید است. در میوه ازگیل مقدار فنل کل و فلانوئیدها به عنوان هم ارز و معادل کوئرستین و گالیک اسید برآورد شدند و اثرات مهار رادیکالی آن‌ها روی رایکال های DPPH، $DMPD^{+}$، سوپراکسید، O_2^{-} و H_2O_2 بررسی شد. هم‌چنین مقداری کافئیک اسید، فرولیک اسید، سینرژیک اسید، کوئرستین و آلفاتوکوفرول، پیروگالول و هیدوروکسی‌بنزوییک اسید، وانیلین، پی‌کوماریک‌اسید، گالیک‌اسید و آسکوربیک اسید در ازگیل شناسایی شدند که می‌تواند به عنوان پارامترهای کیفی در میوه ازگیل مطرح شود (Gülçin *et al*., 2011). مقدار فنولیک اسید و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در میوه ازگیل و نتایج نشان داد این میوه سرشار از ترکیبات مذکور می‌باشد (Ercisli *et al*., 2012).

آنتی‌اکسیدان‌های فعال در پوست ساقه، برگ و میوه ازگیل وحشی وجود دارند، و میزان این متابولیت‌ها در برگ و پوست بیشتر از میوه می‌باشند (Nabavi *et al*., 2011). با در نظرگرفتن تحقیقات انجام شده در زمینه ترکیبات فنولیک و خواص آنتی‌اکسیدانی، هدف این تحقیق بررسی حضور این ترکیبات در میوه ازگیل می‌باشد.

مواد و روش‌ها

برای انجام آزمایشات مربوط به این تحقیق برگ، میوه و دانه دو گونه‌ی ازگیل با نام *M. germanica* (ازگیل اهلی) *M. canescens* (ازگیل وحشی) از دو منطقه‌ی ایلام و بابل جمع‌آوری گردید (جدول ۱، شکل ۱). نمونه‌های گرفته شده بطور تصادفی در مرحله بلوغ میوه از قسمت‌های مختلف گیاه تهیه شد. نمونه‌های گیاهی خشک شده به منظور استخراج عصاره، توسط آسیاب برقی خانگی آسیاب شدند و از الک با مش ۴۰ گذرانده شدند. به منظور استخراج عصاره خام، یک گرم از نمونه‌های خرد شده گیاهی را به‌صورت جداگانه در یک بالن ژوژه ۲۵ میلی‌لیتر حاوی ۱۵ میلی‌لیتر متانول ۷۰ درصد انتقال داده شد. مخلوط برای افزایش حلالیت ترکیبات فنلی در محلول به‌مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه التراسونیک قرار داده شد و سپس برای جداکردن بخش جامد، عصاره بدست آمده از کاغذ صافی عبور داده شد. در نهایت از متانول ۷۰ درصد برای رساندن حجم محلول به ۲۵ میلی‌لیتر استفاده شد و به طور کامل مخلوط گردید. سپس یک میلی‌لیتر از عصاره خام با ۹ میلی‌لیتر متانول ۷۰ درصد رقیق شد که به منظور تعیین میزان فنل و فلاونوئید و خاصیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها ازعصاره رقیق شده استفاده شد. همه عصاره‌ها تا زمان آنالیز در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در ظروف تیره در دار نگه‌داری شدند (Liu *et al*., 2011). میزان کل ترکیبات فنلی در عصاره‌های رقیق شده، با استفاده از معرف فولین سیو کالتیو اندازه‌گیری شد. میزان جذب محلول حاصل در طول موج ۶۸۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید و میزان کل ترکیبات فنلی بصورت میلی‌گرم گالیک اسید در گرم وزن خشک (mg GAE/ g DW) بیان گردید (Singleton and Rossi, 1965). میزان کل ترکیبات فلاونوئیدی موجود در عصاره رقیق شده مطابق روش Zhishen و همکاران (۱۹۹۹) با استفاده از آزمون رنگ‌سنجی آلومینیوم کلرید اندازه‌گیری شد. میزان کل ترکیبات فلاونوئیدی برحسب میلی‌گرم کوئرستین در گرم وزن خشک (mg QUE/ g DW) بیان شد. به منظور تعیین نوع و میزان ترکیبات فنلی موجود در عصاره‌ها، از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) استفاده شد. شناسایی ترکیبات با دستگاه HPLC ساخت شرکت KNAUER کشور آلمان مدل PLATIN blue مجهز به آشکار ساز آرایه دیودی (DAD) و سیستم تزریق خودکار (PLATINblue) با نرم‌افزار EZChrom Elite و ستون ODS-2 C18 انجام شد. در این پژوهش، میزان کلروژنیک اسید، کافئیک اسید، پی‌کوماریک‌اسید، فرولیک اسید، روتین، کوئرستین، کامپفرول و سینامیک اسید در نمونه‌های سه قسمت ازگیل با هم مقایسه شدند. این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار صورت گرفت و تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS نسخه ۹/۱ و SPSS نسخه ۱۸ انجام شد.

جدول ۱- نمونه های جمع‌آوری شده از بخش‌های مختلف ازگیل.

ردیف	نام نمونه	محل جمع-آوری	گونه	علامت اختصاری	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	ارتفاع (متر)
۱	برگ ازگیل (وحشی)	بابل	*M. canescens*	LMC	″۶۶ ′۶۵ °۵۲	″۷۱ ′۴۹ °۳۶	۵
۲	میوه ازگیل (وحشی)	بابل	*M. canescens*	FMC	″۶۶ ′۶۵ °۵۲	″۷۱ ′۴۹ °۳۶	۵
۳	دانه ازگیل (وحشی)	بابل	*M. canescens*	SMC	″۶۶ ′۶۵ °۵۲	″۷۱ ′۴۹ °۳۶	۵
۴	برگ ازگیل (اهلی)	بابل	*M. germanica*	LMG-N	″۶۶ ′۶۵ °۵۲	″۷۱ ′۴۹ °۳۶	۵
۵	برگ ازگیل (اهلی)	ایلام	*M. germanica*	LMG-I	″۹۱ ′۳۷ °۴۶	″۴۱ ′۶۵ °۳۳	۱۴۵۰
۶	میوه ازگیل (اهلی)	بابل	*M. germanica*	FMG-N	″۶۶ ′۶۵ °۵۲	″۷۱ ′۴۹ °۳۶	۵
۷	میوه ازگیل (اهلی)	ایلام	*M. germanica*	FMG-I	″۹۱ ′۳۷ °۴۶	″۴۱ ′۶۵ °۳۳	۱۴۵۰
۸	دانه ازگیل (اهلی)	بابل	*M. germanica*	SMG-N	″۶۶ ′۶۵ °۵۲	″۷۱ ′۴۹ °۳۶	۵
۹	دانه ازگیل (اهلی)	ایلام	*M. germanica*	SMG-I	″۹۱ ′۳۷ °۴۶	″۴۱ ′۶۵ °۳۳	۱۴۵۰

نتایج و بحث

مقادیر کمینه، بیشینه، میانگین، انحراف معیار و ضریب تغییرات در جدول ۲ ارائه شده است. بیشترین ضریب تغییرات (٪) مربوط به فرولیک اسید (۱۹۶/۸۱) و بعد از آن سینامیک اسید (۱۷۴/۵۹) و کامپفرول (۱۱۲/۴۲) بود. کمترین ضریب تغییرات مربوط به کوئرستین (۴۴/۷۸) و سپس کافئیک اسید (۵۲/۵۳) و فنل کل(۵۹/۷۴) بود. در بین عصاره‌های مورد تحقیق برگ ازگیل ایلام (*M. germanica*) بیشترین میزان فرولیک اسید، سینامیک اسید و پی‌کوماریک اسید را دارا بود. میزان فرولیک اسید در دانه ازگیل وحشی بابل و ازگیل اهلی بابل صفر بود و هم‌چنین سینامیک‌اسید در برگ و دانه دو گونه ازگیل وحشی و اهلی بابل صفر بود. کمترین میزان روتین در برگ ازگیل وحشی و ازگیل اهلی بابل مشاهده شد. نتایج حاصل از بررسی عصاره‌های گرفته شده بوسیله اسپکتوفتومتر برای فنل کل و فلاونوئید کل به ترتیب در نمودار ۱ و ۲ آمده است. براساس غلظت‌های تعیین شده از دستگاه اسپکتوفتومتر، مشخص شد که میزان فنول در برگ ازگیل وحشی بابل دارای بیشترین مقدار (۱۴/۷۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در بین نمونه‌ها بود و پس از آن نمونه برگ ازگیل اهلی (*M. germanica*) جمع‌آوری شده از منطقه ایلام (۱۳/۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) بیشترین میزان فنل را داشت. کمترین میزان فنل مربوط به نمونه های گرفته شده از میوه بود که به ترتیب کمترین مقدار مربوط به میوه ازگیل اهلی بابل، میوه ازگیل وحشی بابل و میوه ازگیل اهلی ایلام با مقادیر ۱/۷۷، ۱/۹۱، ۲/۴ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک بودند. نمونه‌های مربوط به قسمت دانه از نظر میزان فنل بالا بودند و با نمونه‌های برگ اختلاف کمی در حد دو الی سه واحد داشتند (نمودار ۱). میزان فلاونوئید در دانه‌ی ازگیل اهلی (*M. germanica*) و ازگیل وحشی (*M. canescens*) صفر بود در صورتی که نمونه دانه ازگیل اهلی ایلام دارای میزان ۰/۳۹ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برآورد شده بود (نمودار ۲) و بیشترین میزان این ترکیب در میوه ازگیل اهلی ایلام تعیین شد (۰/۹۰ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) بود و بعد از آن بالاترین مقدار مربوط به نمونه برگ ازگیل اهلی ایلام (۰/۶۴ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) و سپس نمونه برگ ازگیل وحشی بابل (۰/۵۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) بود (نمودار ۲).

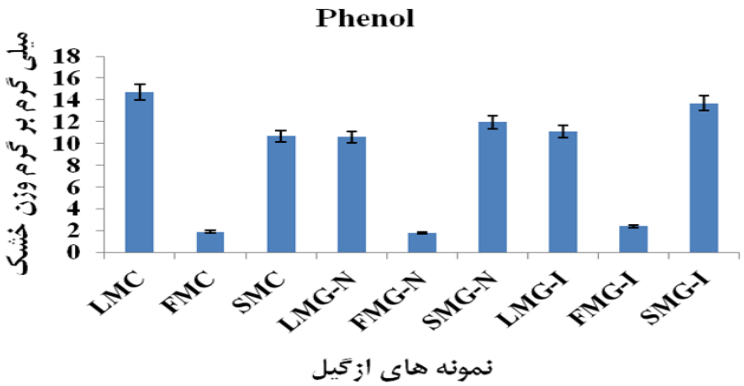
شکل ۱- نمونه ازگیل گونه *M. germanica* (بالا)،چپ-ایلام، راست-بابل؛ گونه *M. canescens* (پایین)، بابل.

جدول ۲-کمینه، بیشینه، میانگین، انحراف معیار و ضریب تغییرات ترکیبات اندازه گیری شده در ازگیل.

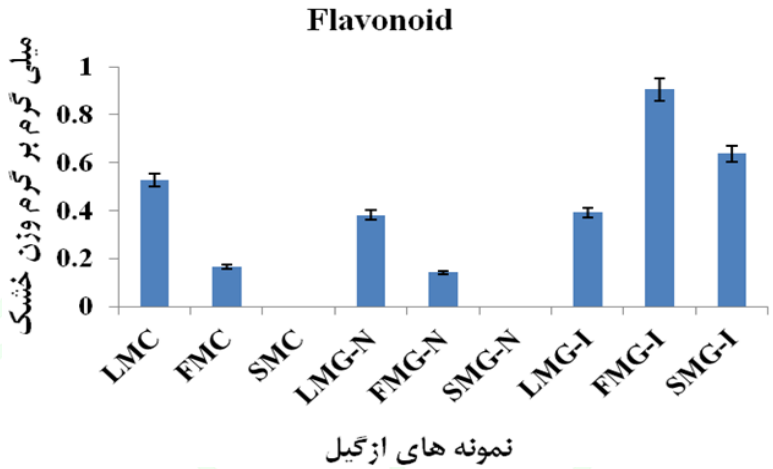
صفات	کمینه	بیشینه	میانگین	انحراف معیار	ضریب تغییرات
فنل	۱/۷۷	۱۴/۷۳	۸/۷۵۹	۵/۲۴	۵۹/۷۴
فلاونوئید	۰۰	۰/۹۰	۰/۳۵	۰/۳۱	۸۷/۲۳
کلروژنیک اسید	۰/۰۵	۱۱/۷۶	۴/۶۲	۳/۵۰	۷۵/۸۱

کافئیک اسید	۰/۳۲	۲۰/۷۴	۱۱/۸۲	۶/۲۱	۵۲/۵۳
پی‌کوماریک اسید	۰۰	۸/۷۵	۳/۶۰	۳/۴۳	۹۵/۱۱
فرولیک اسید	۰۰	۲۵/۶۹	۴/۱۶	۸/۱۹	۱۹۶/۸۱
روتین	۱/۳۰	۳۸/۷۵	۱۳/۵۳	۱۲/۶۰	۰/۹۳
کوئرستین	۰/۵۴	۲/۵۰	۱/۴۸	۰/۶۶	۴۴/۷۸
کامپفرول	۰۰	۲/۳۷	۰/۷۵	۰/۸۵	۱۱۲/۴۲
سینامیک اسید	۰۰	۳/۰۰	۰/۵۹	۱/۰۴	۱۷۴/۵۹

جدول ۳ همبستگی بین ترکیبات فیتوشیمیایی عصاره‌های مورد تحقیق را نشان می‌دهد. براساس این جدول بین روتین با پی‌کوماریک اسید (در سطح ۰/۰۵) و با فرولیک اسید (در سطح ۰/۰۱) همبستگی مثبت وجود داشت. بدین معنا که با افزایش میزان روتین، میزان پی‌کوماریک‌اسید و فرولیک اسید افزایش می‌یابد. بین کوئرستین و کلروژنیک اسید (در سطح۰/۰۵) نیز همبستگی مثبت وجود داشت و با افزایش کوئرستین میزان کلروژنیک اسید نیز افزایش یافت. بین کامپفرول با کلروژنیک اسید (در سطح ۰/۰۵) و بین سینامیک اسید با فرولیک اسید و روتین همبستگی مثبت وجود داشت وجود داشت. با توجه به اینکه در حال حاضر مواد اولیه دارویی در ایران کمتر ساخته می‌شود و در صنعت داروسازی به طور ریشه‌ای نیازمند این مواد است، استفاده از منابع گیاهان دارویی داخلی که از دیرباز در ایران به صورت وسیع و سنتی رواج داشته است، یکی از راه‌های کاهش این نیاز می‌باشد (آزاد بخت، ۱۳۷۸). امروزه اثرات آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فیتوشیمیایی گیاهی، که به درمان بسیاری از امراض و بیماری‌ها منجر می‌گردد به اثبات رسیده است که پلی‌فنل‌ها بخاطر خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی مهم‌ترین گروه از این متابولیت‌ها را شامل می‌شوند. نتایج حاصل از تحقیق حاظر نشان دادکه تمامی عصاره‌های مورد بررسی گیاه ازگیل دارای مقادیری از ترکیبات فیتوشمیایی و آنتی‌اکسیدانی بودند. اما بین این عصاره‌ها از نظر مقادیر اختلافاتی وجود داشت.



نمودار ۱- میزان فنل برآورد شده در نمونه های مختلف ازگیل (میلی‌گرم بر گرم وزن خشک).



نمودار ۲- میزان فلاونویید برآورد شده در نمونه های مختلف ازگیل (میلی‌گرم بر گرم وزن خشک).

جدول ۳- ضرایب همبستگی بین ترکیبات مختلف ازگیل.

ترکیبات	فنل	فلاونوئید	کلروژنیک اسید	کافئیک اسید	پی-کوماریک اسید	فرولیک اسید	روتین	کوئرستین	کامپفرول	سینامیک اسید
فنل	۱									
فلاونوئید	۰/۰۰۳	۱								
کلروژنیک اسید	۰/۶۵۷	۰/۳۱۷	۱							
کافئیک اسید	۰/۵۹۱	۰/۱۹۹	۰/۵۸۴	۱						
پی‌کوماریک اسید	۰/۰۲۳	۰/۰۴۲	-۰/۳۱۱	۰/۵۶۹	۱					
فرولیک اسید	۰/۴۱۸	۰/۴۳۳	۰/۰۷۲	۰/۳۷۶	۰/۴۶۴	۱				
روتین	۰/۲۸۴	۰/۲۶۰	-۰/۱۵۷	۰/۴۹۰	۰/۷۹۱*	۰/۹۰۱**	۱			
کوئرستین	۰/۳۶۰	۰/۵۳۹	۰/۶۸۴*	۰/۰۶۵۴	۰/۲۰۸	۰/۲۵۷	۰/۱۷۴	۱		
کامپفرول	۰/۱۷۳	۰/۴۱۵	۰/۶۹۹*	-۰/۰۱۵	-۰/۶۱۱	-۰/۱۷۹	-۰/۴۹۶	۰/۶۳۳	۱	
سینامیک اسید	۰/۲۸۹	۰/۵۳۱	۰/۰۳۲	۰/۲۸۹	۰/۴۷۶	۰/۸۹۷**	۰/۸۰۰**	۰/۴۷۲	۰/۰۳۹	۱

(*) ضریب اطمینان در سطح ۰/۰۵ و (**) ضریب اطمینان در سطح ۰/۰۱ است.

منابع

آزاد بخت، م. ۱۳۷۸. رده‌بندی گیاهان دارویی. چاپ اول، انتشارات تیمورزاده، تهران.

Ayaz, F.A., Demir, O., Torun, H., Kolcuoglu, Y. and Colak, A. 2008. Characterization of polyphenoloxidase (PPO) and total phenolic contents in medlar (*Mespilus germanica* L.) fruit during ripening and over ripening. Food Chem. 106: 291-298.

Ercisli, S., Sengul, M., Yildiz, H., Sener, D., Duralija, B., Voća, S. and Purgar, D. D. 2012. Phytochemical and antioxidant characteristics of medlar fruits (*Mespilus germanica* L.). Journal of applied botany and food quality, 85(1): 86-90.

Gülçin, İ., Topal, F., Sarikaya, S. B. Ö., Bursal, E., Bilsel, G. and Gören, A. C. 2011. Polyphenol Contents and Antioxidant Properties of Medlar (*Mespilus germanica*) L. Records of Natural Products, 5(3): 158.

Hacıseferogulları, H., Ozcan, M., Sonmete, M.H., Ozbek, O. 2005. Some physical and chemical parameters of wild medlar (*Mespilus germanica*) fruit grown in Turkey J. Food Eng. 69: 1-7.

Liu, P., Kallio, H., Lu, D., Zhou, C. and Yang, B. 2011. Quantitative analysis of phenolic compounds in Chinese hawthorn (*Crataegus* spp.) fruits by high performance liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. Food Chemistry, 127: 1370-1377.

Nabavi, S. F., Nabavi, S. M., Ebrahimzadeh, M. A. and Asgarirad, H. 2011. The antioxidant activity of wild medlar (*Mespilus germanica* L.) fruit, stem bark and leaf. African Journal of Biotechnology, 10(2): 283-289.

Peto, J., Cserni, I. and Hüvely, A. 2016. Some beneficial Nutrient and mineral content of medlar fruits. Gradus, 3: 258-262.

Singleton, V.L. and Rossi, J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enologyand Viticulture, 16: 144-158.

Zhishen, J., Mengcheng, T. and Jianming, W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food chemistry, 64: 555-559.

Evaluation and comparison of some phenolic and flavonoid compounds in fruit, leaves and seeds of medlar

Javad Erfani-Moghadam[1]*, Zeinab Sadeghinejad[2]
[1]Associate Prof. Department of Horticultural Science, College of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran
[2]Ph.D. student, Department of Horticultural Science, College of Agriculture, Malayer University, Malayer, Iran
**Corresponding Author: j.erfani@ilam.ac.ir*

Abstract

Medlar (*Mespilus* spp.), from Rosaceae family, is one of the important forest fruits of which there are two different species in Iran. In this study, some phytochemicals compounds of two species in medlar including *M. germanica* and *M. canescens* were investigated. Therefore, the fruit, leaves and seed of two medlar species were selected and were extracted with methanol (70%) and analyzed by spectophotometry and HPLC. Preliminary results illustrated that the highest total phenolic content (14.73 mg of gallic acid equivalents/g dry weight) and total flavonoid (0.90 mg of quercetin equivalents/g dry weight) were identified in leaves of *M. canescens and* fruits of *M. germanica.* The highest coefficient of variation was related to ferulic acid (1961/81%) followed by cinnamic acid (174.59%) and campferol (112.42%). The lowest coefficients of change were related to quercetin (44.78%) and then caffeic acid (52.53%) and total phenol (59.74%). Simple correlation analysis showed that positive correlations were detected among some phytochemicals compounds.

***Keywords*:** Medlar, Phenol, Phytochemical compounds, Quercetin