فصلنامه

شناخت و کاربرد گیاهان دارویی

سال دوم، شماره ۱، تابستان ۸۸ صفحات ۳۵- ۲۵

بررسی ترکیبات و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در میوه تمشک برگ نارونی (*Rubus anatolicus* Focke.) در طی رسیدن

مه‌لقا قربانلی *

دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان، گروه زیست‌شناسی، گرگان، ایران

آرین ساطعی

دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان، گروه زیست‌شناسی، گرگان، ایران

فصیحه لیوانی

دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان، باشگاه پژوهشگران جوان، گرگان، ایران

محل انجام پژوهش: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان، گروه زیست‌شناسی، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۰/۳/۲۸ **تاریخ پذیرش:** ۹۰/۶/۱۲

چکیده

تمشک برگ نارونی (*Rubus anatolicus* Focke.)، درختچه‌ای است چند ساله، از تیره گل سرخیان که دارای مصارف خوراکی و دارویی است و به صورت خودرو در منطقه استان گلستان، گسترش فراوانی دارد. در طب سنتی، به عنوان یک ضدالتهاب و ضدعفونی کننده قوی و دارویی، علیه عفونت‌های دهانی یا چشمی استفاده می‌شود. در این پژوهش، میوه تمشک به دو صورت رسیده (سیاه) و نرسیده (قرمز) به طور تصادفی از دو منطقه مختلف جغرافیایی در استان گلستان (روستای حسن آباد جلین و روستای لیوان غربی بندر گز) برداشت شده است. مقدار پلی‌فنل‌ها با معرف فولن- سیکالتو، آنتوسیانین‌ها با روش اختلاف pH، فلاونوئیدها با روش رنگ سنجی کلرید آلومینیوم و درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی با روش ۲ و ۲- دی فنیل-۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH)، با دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین شدند. مقدار ترکیبات فنلی سنجش شده در تمشک‌های سیاه نسبت به تمشک‌های قرمز بیشتر بود. اختلاف زیادی در میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در این دو فاز مختلف نموی مشاهده نشد. بین درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی و مقدار فنل‌های کل، ارتباط قوی (R^2= ۰/۹۶۴) و با مقدار آنتوسیانین و فلاونوئیدهای کل، ارتباط کمتر (به ترتیب R^2= ۰/۷۱۷ و R^2= ۰/۶۳۹) مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: تمشک سیاه، تمشک قرمز، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، آنتوسیانین‌های کل، پلی‌فنل‌های کل، فلاونوئیدهای کل

* مسئول مکاتبات mghorbanli@gorganiau.ir

مقدمه

بیشتر بیماری‌های مزمن مانند سرطان‌ها، ورم مفاصل، بیماری‌های قلبی- عروقی و اختلالات سیستم عصبی، تحت تاثیر تنش‌های اکسیداتیو بروز می‌کنند (۱). فراورده‌های طبیعی، منبع غنی از ترکیبات فعال بیولوژی هستند (۲) که سلسله گیاهی به عنوان دارنده محدوده وسیعی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی می‌تواند در این رده‌بندی قرار گیرد. بیشتر گیاهان و دم کرده‌های گیاهی که اغلب در طب سنتی استفاده می‌شوند، با توجه به وجود ترکیبات فنلی مخصوصا فلاونوئیدها هستند (۳).

تمشک برگ نارونی (*Rubus anatolicus*Focke.) درختچه‌ای چند ساله، نیمه برگ‌ریز از تیره گل سرخیان، با خارهای انبوه و دارای میوه‌های قرمز مایل به سیاه است که پراکنش وسیعی دارد (۴،۵). در شمال، مرکز، شرق و غرب ایران به فراوانی می‌روید (۶). این گیاه، منبع قابل توجهی از ترکیبات فنلی شامل آنتوسیانین‌ها، فلاونول‌ها، اسید کلروژنیک، فلاونوئیدها، تانن‌ها و پروسیانیدین‌ها است که فعالیت بیولوژیکی بالایی دارند و بدن را در برابر بیماری‌های قلبی-عروقی، سرطان، التهاب‌ها، چاقی و دیگر بیماری‌های مزمن، حفاظت می‌کنند (۷،۸). برگ و میوه تمشک، استفاده دارویی دارد (۹) و در طب سنتی به عنوان یک ضد التهاب قوی از آن استفاده می‌شود (۵). شانزده قرن در اروپا و شمال شرقی آمریکا از آن به عنوان دارویی در برابر عفونت‌های دهانی یا چشمی استفاده شده است (۱۰). از گل‌ها و جوانه‌های گل تمشک برگ نارونی در طب سنتی پرتغال برای درمان اختلالات معدی-روده‌ای و اسهال استفاده می‌شود (۱).

تمشک سیاه، حاوی غلظت‌های بالایی از آنتوسیانین‌ها و الاژیتانن‌ها است که فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی دارند (۸). آنتوسیانین‌ها برای اهداف درمانی متعددی از قبیل درمان بیماری‌های چشمی ناشی از دیابت، بیماری فیبروسیستیک و بیماری‌های بینایی استفاده می‌شوند (۷). همچنین از رشد سلول‌های سرطانی روده بزرگ جلوگیری می‌کنند و چربی خون را کاهش می‌دهند (۱۱). سیانیدین-۳-گلوکوزید به عنوان آنتوسیانین اصلی تمشک، بیشترین ترکیب آنتوسیانینی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی قوی را دارد و به دنبال آن، سیانیدین-۳-گزیلوزید، سیانیدین-۳-دی اکسیلاگلوکوزید، سیانیدین-۳-روتینوزید و سیانیدین-۳-مالونیل گلوکوزید مقدار کمتری را تشکیل می‌دهند (۱۲).

فلاونوئیدهای موجود در تمشک، با غیرفعال کردن رادیکال‌های آزاد نقش اصلی را در برابر خسارت‌های ناشی از تنش‌های اکسیداتیو در سیستم‌های بیولوژیک بازی می‌کنند و در نتیجه، از بروز بیماری‌های قلبی-عروقی، سرطان و دیگر بیماری‌هایی که به این تنش‌ها مربوط است، جلوگیری به عمل می‌آورند (۱۳). گروهی تحقیقاتی در ایتالیا، خواص آنتی‌اکسیدانی برگ‌های تمشک برگ نارونی را مربوط به فعالیت کافئیک اسید، فرولیک اسید و استرهای کافئیک کوئنیک همچنین کوئرستین-۳-O-گلوکورونید، کامفرول-۳-O-گلوکورونید (۱۴) و الاژیک اسید گزارش کرد (۱۵).

ترکیبات فنلی تمشک، از اکسیداسیون LDL و لیپوزوم در بدن جلوگیری می‌کنند. این ترکیبات همچنین به صورت قابل ملاحظه‌ای، ظرفیت بالایی را در از بین بردن اکسیژن‌های یکتایی (رادیکال آزاد) نشان داده‌اند و یا به عنوان دهنده هیدروژن ایفای نقش می‌کنند (۱۱). تغلیظ و پلیمریزه شدن بعد از تخریب سلول و افزایش دمای میوه و همچنین در معرض اکسیژن قرار گرفتن ترکیبات فنلی، منجر به تجزیه آن‌ها می‌شود؛ درنتیجه، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تمشک‌های تحت تیمار گرما کاهش می‌یابد. اما احتمالا پلیمرهای آنتوسیانینی در طی مراحل گرما تشکیل می‌شوند و این امر می‌تواند کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ناشی از تجزیه ترکیبات فنلی را خنثی کند یا حتی افزایش دهد. واریته میوه، ژنوتیپ، مرحله بلوغ، محل جمع‌آوری، شرایط محیطی، تکنیک‌های کاشت، روش‌های عصاره‌گیری و حلال‌ها بر روی خاصیت‌های فیزیکی - شیمیایی و ترکیبات فعال زیستی تمشک‌های تازه اثر می‌گذارند (۷،۸).

در این تحقیق، مقدار ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، شامل پلی‌فنل‌ها، آنتوسیانین‌ها و فلاونوئیدها و همچنین درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی در تمشک درختی یا برگ نارونی (*Rubus anatolicus* Focke.) با نام عمومی

elm-leaved blackberry در دو منطقه مختلف از استان گلستان، هم به صورت رسیده (سیاه) و هم نرسیده (قرمز) تعیین شد.

مواد و روش‌ها

مواد

در این تحقیق، ازمعرف فولن-سیکالتو (Merck, Cat. 1090010100)، کربنات سدیم (Merck, 99.9%)، بافر کلرید پتاسیم (Merck, 99.0-100.5%)، بافر استات سدیم (Merck, 99.5-101.5%)، کلرید آلومینیوم (Merck, 98%)، استات پتاسیم (Fluka, 99.0%)، کوئرستین (Sigma Chemical, 98%)، اسید گالیک (Scharlau, 99.5%)، اسید کلریدریک (Merck, 37-38%)، ۲و۲-دی فنیل- ۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH، Sigma, 90%)، متانول (Pameac, 99.5%)، استفاده شده است.

آماده‌سازی نمونه

اطلاعات مربوط به تمشک‌های برداشت شده، در قالب جدول ۱ ارائه شده است. تمشک‌ها در اواخر فصل تابستان ۱۳۸۹ به صورت تصادفی از محل‌های مورد نظر، جمع‌آوری و پس از انتقال به آزمایشگاه، تا زمان انجام آزمایش، به صورت فریز نگهداری شدند. برای تعیین مقدار آنتوسیانین عصاره‌ها در ۶، پلی فنل در ۹، فلاونوئید در ۶ و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در ۳ تکرار تهیه و در همان روز، عصاره‌گیری و سنجش‌ها انجام شد. برای تعیین مقدار آنتوسیانین کل، حدود ۵ گرم میوه در ۲۰ میلی‌لیتر متانولی، با HCl (۰/۱٪) اسیدی شده به مدت ۲ دقیقه ساییده و سپس در دمای اتاق در تاریکی به مدت ۱۶ ساعت نگهداری شد. پس از آن با کاغذ صافی Whatman No. 2 صاف شد (۱۶). برای تعیین مقدار پلی‌فنل‌های کل، حدود ۵ گرم میوه در ۱۰ میلی‌لیتر متانول داغ به مدت ۲ دقیقه ساییده و محلول به دست آمده با کاغذ صافی، صاف شد. بر روی باقیمانده‌های نمونه‌های عصاره‌گیری شده، دو بار دیگر همانند مراحل بالا، عصاره‌گیری انجام شد. سرانجام هر سه عصاره، صاف و با هم ترکیب شدند (۱۶). برای تعیین مقدار فلاونوئید کل، عصاره‌گیری با کمی اصلاحات توسط همزن مگنت انجام شد. حدود ۲ گرم از میوه در ۲۰ میلی‌لیتر متانول، سائیده و سپس در دمای ۴۰°C به مدت ۱ ساعت همزده شد. در انتها با کاغذ صافی Whatman N0. 3 صاف شد (۱۷). برای تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی، عصاره میوه‌ها با ساییدن حدود ۲۰ گرم میوه تازه در ۲۰ میلی‌لیتر متانولی با HCl (۰/۱٪) اسیدی شده، تهیه و سپس بعد از ۶۰ دقیقه محلول‌ها صاف شدند. باقی‌مانده‌های میوه‌ها دوباره طبق روش ذکر شده، عصاره‌گیری و در انتها، عصاره‌های به دست آمده با هم ترکیب و با متانول اسیدی شده با HCl (۰/۱٪) با رساندن به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رقیق شدند (۱۸).

تعیین مقدار پلی‌فنل‌های کل

مقدار پلی‌فنل‌های کل، با روش فولن- سیکالتو تعیین شد (۱۹). مقدار مساوی از هر عصاره (۲۰ μL) با ۱۵۸۰ μL آب مقطر و ۱۰۰ μL معرف فولن-سیکالتو مخلوط شد. ۳۰۰ μL کربنات سدیم (۲۰۰ g L^{-1}) به این ترکیب اضافه شد. بعد از قرار دادن در حمام آب گرم در ۴۰°C به مدت ۳۰ دقیقه، جذب این ترکیب در مقابل بلانک آماده شده در ۷۶۵ nm با دستگاه اسپکتروفتومتر (Spectro UV-Vis Double Beam PC, Made in U.S.A) خوانده شد. منحنی استاندارد توسط غلظت‌های مختلفی (۱۵۰-۱۰۰۰ μg mL^{-1}) از گالیک اسید تهیه شد. مقادیر فنل کل معادل اسید گالیک (mg $100g^{-1}$ وزن تر) بیان شد.

تعیین مقدار آنتوسیانین‌های کل

آنتوسیانین‌های کل، با روش اختلاف pH ارزیابی شد (۲۰). دو محلول رقیق از عصاره ها تهیه شد؛ یکی با بافر کلرید پتاسیم (pH 1.0، M ۰/۰۲۵) (گرم مورد نیاز کلرید پتاسیم در ۱ لیتر آب مقطر، مقدار pH آن به وسیله HCl غلیظ به روی ۱ تنظیم شد) و دیگری؛ بافر استات سدیم (pH 4.5، M ۰/۴) (گرم مورد نیاز استات سدیم در ۱ لیتر از آب مقطر، مقدار pH با HCl غلیظ به روی ۴/۵ تنظیم شد)، قبلا رقت هر کدام به وسیله فاکتور

رقت (تمشک‌های سیاه ۱:۴۰ حجمی و تمشک‌های قرمز ۱:۵ حجمی) تعیین شد. پس از گذشت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق، جذب همزمان در دو طول موج ۵۱۰nm و ۷۰۰nm با دستگاه اسپکتروفتومترخوانده شد. مقدار آنتوسیانین کل به عنوان $mg\ 100g^{-1}$ وزن تر معادل سیانیدین-۳-گلوکوزید با ضریب جذب مولی $L\ mol^{-1}$ ۲۶۹۰۰ Cm^{-1} و وزن ملکولی $g\ mol^{-1}$ ۴۴۹/۲ بیان شد.

جدول ۱: مشخصات مربوط به محل نمونه‌برداری گیاه تمشک

محل نمونه برداری	ارتفاع محل (متر از سطح دریا)	موقعیت جغرافیایی	اندام مورد مطالعه
روستای لیوان غربی (بندرگز)	~۱۵	N۸۹.۵۷′ ۴۳° ۳۶ " E۱۱.۲۶′ ۵۲° ۵۳ "	میوه رسیده (تمشک سیاه) و نرسیده (تمشک قرمز)
روستای حسن آباد (جلین)	~۱۲۸	N۸.۱۱′ ۵۱° ۳۶ " E۴.۰۲′ ۳۲° ۵۴ "	میوه رسیده (تمشک سیاه) و نرسیده (تمشک قرمز)

تعیین مقدار فلاونوئیدهای کل

از روش رنگ سنجی کلرید آلومینیوم برای تعیین مقدار فلاونوئیدها استفاده شد (۲۱). هر کدام از عصاره‌های متانولی گیاهی (۰/۵ mL از عصاره $g\ mL^{-1}$ ۱:۱۰) به صورت جداگانه با ۱/۵ mL متانول، ۰/۱ mL کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد، ۰/۱ mL استات پتاسیم (۱ M) و ۲/۸ mL آب مقطر ترکیب شد. سپس در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند. جذب هر ترکیب واکنشی در ۴۱۵ nm با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. منحنی استاندارد با محلول‌های کوئرستین در غلظت‌های $\mu g\ mL^{-1}$ ۱۲/۵-۱۰۰۰ تهیه شد. مقادیر فلاونوئید کل معادل کوئرستین ($mg\ 100g^{-1}$ وزن تر) بیان شد.

تعیین درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی

فعالیت آنتی‌اکسیدانی، با استفاده از روش 2,2- diphenyl- 1- picrylhydrazyl (DPPH) تعیین شد (۲۲). شش غلظت (۴۰، ۵۰، ۷۰، ۹۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) از هر عصاره تهیه شد. محلول‌های آزمایش با ترکیب ۵۰ µL از عصاره رقیق شده میوه با ۳۰۰ µL محلول DPPH متانولی (۱ mM) آماده شد و سپس با متانول به حجم ۳ mL رسانده شدند. محلول‌ها در تاریکی و در دمای اتاق به مدت ۱۵ دقیقه نگهداری شدند. جذب ($A_{extract}$) در مقابل بلانک مناسب شامل ۵۰ µL عصاره رقیق شده میوه به اضافه ۲۹۵۰ µL متانول در طول موج ۵۱۷ nm خوانده شد. محلول شاهد DPPH (۳۰۰ µL از محلول ۱ mM DPPH متانولی، ۲/۷ mL متانول) هر روز در مقابل متانول اندازه‌گیری شد. درصد بازدارندگی از رادیکال DPPH برای هر غلظت از عصاره میوه‌ها مطابق فرمول $\%\ inhibition= [(A_{DPPH}-A_{extract})/A_{DPPH}]\times100$ به دست آمد؛ که A_{DPPH} مقدار جذب محلول شاهد DPPH و $A_{extract}$ مقدار جذب محلول نمونه است. برای محاسبه مقدار IC_{50} (معادل مقدار میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره که قادر است ۵۰ درصد فعالیت رادیکال آزاد DPPH را خنثی کند)، نمودار درصد فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی در غلظت‌های مختلف برای هر نمونه، رسم و سپس با توجه به معادله خط به دست آمده، IC_{50} هر نمونه مشخص گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

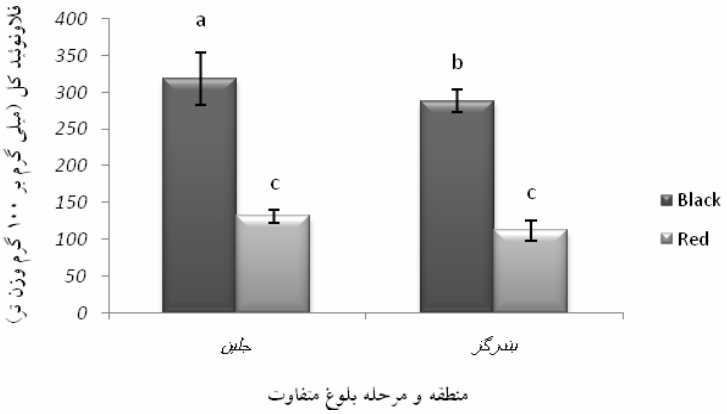
آنالیز آماری داده‌ها تحت ANOVA و توسط نرم افزار SPSS (ver.16) انجام گردید و مقایسه میانگین داده‌ها به وسیله تست دانکن و با ضریب اطمینان ۹۵ درصد ($P<0.05$) انجام شد. نمودارها به وسیله نرم افزار Excel رسم شدند. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار (SD) ارائه شد.

نتایج

مقادیر فلاونوئید کل در عصاره‌ها

مقدار فلاونوئید کل عصاره‌ها بر اساس کوئرستین (منحنی استاندارد: $y=0.001x+0.050,\ R^2=0.999$) بر حسب وزن تر به دست آمد. بیشترین مقدار، به تمشک

سیاه جلین (۳۶/۱۲±۳۱۹/۱۷ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم) و کمترین مقدار، به تمشک قرمز بندرگز (۳/۴۱±۱۱۲/۵۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم) تعلق داشت (شکل ۱).



شکل ۱: مقدار فلاونوئید کل در بین تمشک‌های مورد آزمایش معادل کوئرستین (mg QUE $100g^{-1}$ FW)، مقایسه میانگین داده‌ها با تست دانکن، $P<0.05$

مقادیر پلی‌فنل‌های کل در عصاره‌ها

مقدار پلی‌فنل‌های کل، به وسیله معرف فولن- سیکالتو بر اساس اسید گالیک اندازه‌گیری شد (منحنی استاندارد: $y=0.0004x+0.201$, $R^2=0.974$) که مقدار پلی‌فنل کل محلول عصاره‌ها از ۱۸/۳۹±۳۳۵/۵۶ تا ۵۱/۹۱±۴۵۷/۰۵ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم بر حسب وزن تر، متغیر بود. نتایج مقدار پلی‌فنل‌های کل در جدول ۲ ارائه شده است. همچنین آنالیز آماری تحت ANOVA در سطح ۵٪ مشخص کرد که اختلاف مکانی اثر معنی‌دار روی مقدار این ترکیبات نداشت اما بلوغ اثر معنی‌داری روی این ترکیبات داشت. نسبت پلی‌فنل به فلاونوئیدهای کل در جدول ۳ ارائه شده است.

مقادیر آنتوسیانین‌های کل در عصاره‌ها

مقدار آنتوسیانین‌های کل، با روش اختلاف pH تعیین شد. نتایج مقدار آنتوسیانین کل، در شکل ۲ و نسبت آنتوسیانین به فنل‌های کل، در جدول ۳ ارائه شده است. مقدار آنتوسیانین بیشتری در تمشک‌های سیاه نسبت به تمشک‌های قرمز مشاهده شد. تمشک سیاه جلین با بیشترین مقدار (۶/۰۵±۲۱۸/۸۸ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم) و تمشک‌های قرمز بندر گز با کمترین مقدار (۱/۲۹±۳/۵۱ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم) دارای اختلاف معنی‌دار با سطح اطمینان ۹۵ درصد هستند.

جدول ۲: مقدار پلی‌فنل‌های کل، به وسیله معرف فولن- سیکالتو بر اساس اسید گالیک

رنگ گیاه تمشک	پلی‌فنل‌های کل (mg GAE $100g^{-1}$ FW)
سیاه[1]	۴۱/۲۹ ± ۴۲۷/۳۴ a
سیاه[2]	۵۱/۹۱ ± ۴۵۷/۰۵ a
قرمز[1]	۱۸/۳۹ ± ۳۳۵/۵۶ b
قرمز[2]	۴۳/۲۳ ± ۳۷۲/۴۳ b

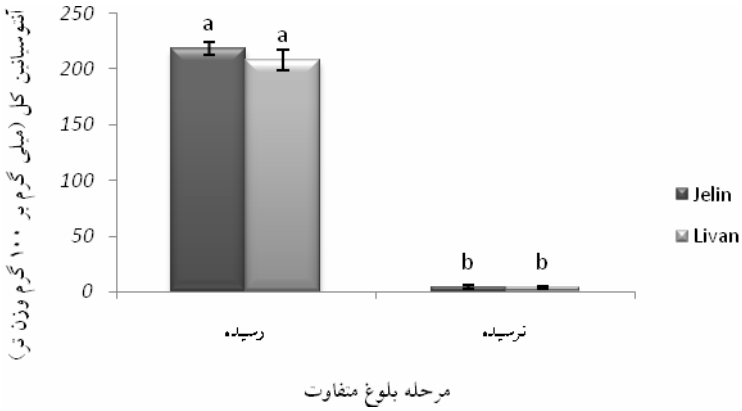
[1]حسن آباد جلین، [2]لیوان غربی بندرگز

نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شد. حروف غیرمشابه در هر ستون، نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها در سطح احتمال ۵ درصد است (تست دانکن).

درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی

درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از روش DPPH در غلظت‌های ۴۰، ۵۰، ۷۰، ۹۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. میوه‌های تمشک سیاه لیوان در کمترین غلظت تهیه شده، ۶/۷۰±۳۸/۲۶ درصد و بیشترین غلظت ۲/۷۱±۹۰/۴۵ درصد، تمشک سیاه جلین در کمترین غلظت ۸/۲۵±۳۵/۲۴ درصد و بیشترین غلظت ۱/۱۹±۹۱/۹۱ درصد، تمشک قرمز لیوان در کمترین غلظت ۲/۶۴±۳۳/۱۶ درصد و بیشترین غلظت ۶/۷۹±۸۸/۲۲ درصد و در تمشک قرمز جلین در کمترین غلظت ۳/۸۱±۳۰/۷۱ درصد و بیشترین غلظت

۹۰/۳۴±۲/۲۴ درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی را از خود نشان دادند (شکل۴). IC_{50} تمشک سیاه لیوان و جلین و قرمز لیوان و جلین با توجه به معادلات خط (به ترتیب $y=0.323x+27.52$, $R^2=0.985$، $y=0.358x+24.74$, $R^2=0.923$، $y=0.334x+25.81$, $R^2=0.925$ و $y=0.358x+24.74$, $R^2=0.0.923$) به ترتیب ۶۹/۶، ۷۰/۶، ۷۲/۴ و ۷۹/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. با توجه به نتایج، IC_{50} در غلظت پایین‌تر در تمشک سیاه لیوان (۶۹/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و در بالاترین غلظت در تمشک قرمز جلین (۷۹/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) یافت شد.

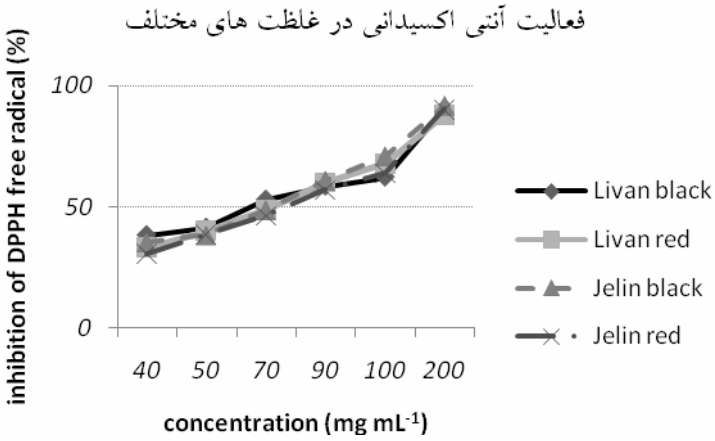


شکل ۲: مقدار آنتوسیانین کل در بین تمشک‌های مورد آزمایش که بر اساس سیانیدین-۳-گلوکوزید (mg Cyanidin-3-glucoside $100g^{-1}$ FW)، مقایسه میانگین داده‌ها با تست ANOVA، $P<0.05$

جدول۳: نسبت پلی‌فنل به فلاونوئید کل و نسبت آنتوسیانین‌های کل به پلی‌فنل کل

رنگ گیاه تمشک	پلی‌فنل کل/ فلاونوئید کل	آنتوسیانین کل/ پلی‌فنل کل
سیاه[۱]	۱/۳۴	۰/۵۱۲
سیاه[۲]	۱/۵۸	۰/۴۵۵
قرمز[۱]	۲/۵۵	۰/۰۱۲
قرمز[۲]	۳/۳۱	۰/۰۰۹

[۱]حسن آباد جلین، [۲]لیوان غربی بندرگز



شکل۴: درصد فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی تمشک‌های رسیده (سیاه) و نرسیده (قرمز) در مناطق مورد مطالعه

ظرفیت مهار کنندگی رادیکال آزاد DPPH در غلظت ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره‌های تمشک، با فنل کل همبستگی قوی با سطح اطمینان ۹۵ درصد (R^2=0.964) و همبستگی کمتری با آنتوسیانین کل (R^2=0.717) و فلاونوئید کل (R^2=0.639) دارد.

بحث

اسیدهای آلی، ترکیبات فنلی، کاروتنوئیدها و آنتی‌اکسیدان‌هایی مثل ویتامین‌های C و E به عنوان ترکیبات طبیعی بسیاری از میوه‌ها و سبزیجات، نقش مهمی در کیفیت ماندگاری میوه و تشخیص ارزش غذایی و دارویی آن‌ها ایفا می‌کنند (۲۳). فلاونوئیدها به عنوان آنتی‌اکسیدان شناخته شده‌اند که بر روی سلامت و تقویت انسان اثر مثبت می‌گذارند. این ترکیبات، حاوی گروه‌های هیدروکسیلی هستند که عامل غیرفعال کردن رادیکال‌های آزاد در گیاهان به شمار می‌آیند. مکانیسم عمل فلاونوئیدها از طریق فرایند کلاته کردن و یا غیرفعال کردن رادیکال‌های آزاد است (۲۴). همان‌طور که بیان شد بیشترین مقدار فلاونوئید کل، مربوط به تمشک سیاه جلین است. میزان فلاونوئید در *Rubus coesinus* و *Rubus ideaus* بر اساس کاتشین بر حسب وزن تر میوه، به ترتیب ۵۵/۵ و ۲۶/۶ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم (۲۵) و در *Rubus sanctus*، ۴/۶۶ میلی‌گرم بر گرم معادل روتین در وزن خشک است (۲۶) و در *Rosa canina*، ۳۱/۰۵ میلی‌گرم در گرم وزن خشک، در *Prunus spinosa*، ۸/۶۸ میلی‌گرم بر گرم در وزن خشک و در *Arbutus unedo*، ۳۴/۹۹ میلی‌گرم بر گرم معادل کاتشین بیان شد (۲۷) که می‌توان نتیجه گرفت فلاونوئید کل در *R. anatolicus*، از گونه‌های *Rosa canina* و *Arbutus unedo* کمتر و از باقی گیاهان نام برده شده، بیشتر است.

پلی‌فنل‌ها دارای ساختار کامل شیمیایی برای غیرفعال کردن رادیکال‌های آزاد هستند که تحقیقات *in vitro* نشان داده است این ترکیبات نسبت به ویتامین‌های E و C نیز فعال‌تر هستند. ترکیبات فنلی در واکنش‌های غیرفعال کردن رادیکال‌های آزاد، به عنوان دهنده الکترون از گروه‌های هیدروکسیل شرکت دارند و آن‌ها را به شکل رادیکال‌های پایدار در می‌آورند. سپس یک الکترون غیر جفت آن‌ها به وسیله واکنش دادن با آنتی‌اکسیدان‌های دیگر یا با اتصال به فلزات، از این حالت خود خارج می‌شود (۲۸). در پژوهش حاضر، مقدار این ترکیب در تمشک‌های سیاه نسبت به قرمز، بیشتر بود، یعنی با رسیدگی میوه، مقدار ترکیبات فنلی آن بالا رفت. اما در ترکیه، بر روی میوه‌های تمشک‌های سیاه (*Rubus* L.) همین آزمایش انجام شد که خلاف نتیجه ما، مقدار این ترکیب در زمان رسیدگی میوه، کاهش یافت (۲۹). در تحقیقی دیگر، مقدار این ترکیبات در *R. sanctus* بر حسب وزن خشک ۴/۵۲ میلی‌گرم در گرم (۲۶) در *Rosa canina*، ۱۴۳/۱۷ میلی‌گرم در گرم، در *Prunus spinosa*، ۸۳/۴۰ میلی‌گرم در گرم و در *Arbutus unedo*، ۱۲۶/۸۳ میلی‌گرم در گرم معادل اسید گالیک بیان شد (۱). همچنین، مقدار ترکیبات فنلی کمتری در توت فرنگی و *Rubus sanctus* نسبت به تمشک مورد مطالعه، گزارش شده است (۱۸). طی تحقیقی، فنل کل تمشک سیاه ۱۵۴۰/۹۳ میلی‌گرم در لیتر گزارش شد (۱۲). در تحقیقی، مقدار فنل کل در تمشک قرمز (red raspberry) ۱۲۵/۶۱±۱۳/۳ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن تر و در تمشک سیاه (blackberry) ۲۴۸/۴۸±۲۳/۴ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن تر گزارش شد (در تمشک سیاه، بیشتر از تمشک قرمز) (۱۸) که با نتایج ما مطابقت داشت.

آنتوسیانین‌ها بخشی از گروه فنل‌ها هستند که موجب ایجاد رنگ‌های قرمز، آبی و بنفش در میوه‌ها می‌شوند و همچنین عامل ایجاد رنگ‌های تمشک سیاه نیز هستند (۲۹). در تحقیق حاضر، با بلوغ میوه، مقدار آنتوسیانین‌ها بیشتر شد. تغییرات غلظت آنتوسیانین‌ها موافق با گزارش‌های موجود در باره انار (۳۰) و نیز تمشک‌های سیاه (۲۹) بود. در مورگان ایالت میشیگان در نیوجرسی بر روی زغال اخته که در دو زمان مختلف از لحاظ بلوغ برداشت شده بود مشاهده شد که در هنگام بلوغ ORAC (ظرفیت جذب رادیکال اکسیژن)، مقدار آنتوسیانین و فنل کل افزایش یافت، اما تفاوت در محل جمع‌آوری در رقم

highbush زغال اخته بر روی این ترکیبات، اثر معنی‌داری نداشت که نتایج ما با آن مطابقت داشت (۳۱). مقدار آنتوسیانین در توت فرنگی (Strawberry) کمتر از مقدار آن در تمشک‌های مورد آزمایش ما بود. همچنین در raspberry مقدار آن کمتر از blackberry است که با نتایج ما مطابقت داشت. این محققین همچنین مقدار آنتوسیانین کل را در گیاه aronia اندازه‌گیری کردند که نتیجه به دست آمده نشان دهنده بالاتر بودن مقدار آن از مقدار آنتوسیانین کل در تمشک‌های مورد مطالعه ما بود (۱۸). براساس نتایج به دست آمده و با توجه به تفاوت معنی‌دار گزارش شده در محتوای آنتوسیانین‌ها می‌توان اظهار داشت که این رنگدانه‌ها پاسخگویی برای به وجود آمدن رنگ‌های قرمز تا سیاه در میوه‌ها و سبزیجات هستند (۲۹،۳۲).

بسیاری از گیاهان دارویی، حاوی مقادیر بالایی از آنتی‌اکسیدان‌ها به غیر از ویتامین C، E و کاروتنوئیدها هستند (۳۳). آنتوسیانین‌ها و پلی‌فنل‌ها در میوه گونه‌های جنس‌های *Ribes*، *Rubus* و *Vaccinium* در *in vitro* به صورت شیمیایی بر روی رادیکال‌های آزاد سوپراکسید تولید شده، فعالیت ضد رادیکالی نشان دادند. عصاره‌های خام هر سه جنس، فعالیت بسیار قوی روی رادیکال‌های سوپر اکسید داشتند (۳۴). در تحقیق حاضر، بین تمشک‌های رسیده و نرسیده، اختلاف قابل توجهی نبود و فعالیت آنتی‌اکسیدانی با فنل‌های کل، رابطه قوی‌تری نسبت به فلاونوئید و آنتوسیانین داشت. طبق تحقیقاتی، بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فلاونوئید ارتباط گزارش شد (۳۵،۳۶). طی تحقیقی، میوه‌ها و سبزیجات غنی از آنتوسیانین مانند توت فرنگی، تمشک و آلوی قرمز، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی را نشان دادند (۳۷). در تحقیقی دیگر، همبستگی معنی‌دار بین آنتوسیانین و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گزارش شد ($P<0.05$) (۳۸). اما در تحقیق دیگر، همبستگی بین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی با آنتوسیانین مشاهده نشد (۳۹)، ولی بین آنتی‌اکسیدان و فنل‌های کل، این ارتباط ثابت شد (۳۱) که همانند نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر، اما با روش DPPH است. در تحقیقی که بر روی ۶ گیاه از تیره آکانتاسه انجام شد، بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و مقدار فنل کل، ارتباط معنی‌داری یافت شد، اما بین مقدار فلاونوئید با فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ارتباطی مشاهده نگردید (۴۰).

برخی ترکیبات با اثرات آنتی‌اکسیدانی در مقادیر متفاوت در میوه‌ها، اثرات منفی رادیکال‌های آزاد را که عامل ایجاد بسیاری از بیماری‌ها هستند، کاهش می‌دهند. میوه‌های رسیده (سیاه) تمشک نسبت به نرسیده (قرمز) دارای مقادیر بالایی از ترکیبات فنلی سنجش شده بودند. با توجه به اختلاف معنی‌دار و قابل توجه در مقدار آنتوسیانین‌های کل بین تمشک‌های سیاه و قرمز می‌توان این ترکیبات را عامل پیدایش رنگ‌های قرمز، آبی تا بنفش در میوه‌ها دانست. در اندازه‌گیری درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی در هر دو فاز نموی و در هر دو مکان مورد مطالعه، اختلاف قابل توجهی مشاهده نشد. همچنین با افزایش غلظت عصاره‌ها، قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH عصاره‌ها افزایش یافت. ارتباط قوی بین ترکیبات فنلی مخصوصا پلی‌فنل‌های کل با خاصیت آنتی‌اکسیدانی مشاهده شد.

منابع

1- Barros, L., Oliveira, S., Carvalho, A. M., Ferreira, I.C.F.R. 2010. *In vitro* antioxidant properties and phytochemicals of six medicinal plants from the Portuguese folk medicine. Journal of Industrial Crops and Products, 32(3), 572-579.

2- Mishra, K. P., Ganju, L., Sairam, M., Banerjee, P. K., Sawhney, R. C. 2008. A review of high throughput technology for the screening of natural products. Biomedicine and Pharmacotherapy, 62(2): 94-98.

3- Dawidowicza, A. L., Wianowska, D., Baraniak, B. 2006. The antioxidant properties of alcoholic extracts from *sambacus nigra* L. (antioxidant properties of extracts). Journal of LWT-Food Science and Technology, 39(3): 308-315.

4- Dehaan, R., Louis, J., Wilson, A., Hall, A., Rumbachs, R. 2007. Discrimination of blackberry (*Rubus fruticosus* sp. agg.) using hyperspectral imagery in Kosciuszko National Park. NSW, Australia. ISPRS, Photogrammetry & Remote Sensing, 62(1): 12-24.

5- Marquina, M. A., Corao, G. M., Araujo, L., Buitrago, D., Sosa, M. 2002. Hyaluronidase inhibitory activity from the polyphenols in the fruit of blackberry (*Rubus fruticosus* B.). Journal of Fitoterapia, 73(7-8): 727-729.

۶-خاتمساز، م.، ۱۳۷۱. فلور ایران، تیره گل سرخ. نشر موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، تهران، ۳۵۲ صفحه.

7- Koca, I., Karadeniz, B. 2009. Antioxidant properties of blackberry and blueberry fruits grown in the Black Sea region of Turkey. Journal of Scientia Horticulture, 121(4): 447-450.

8- Wu, R., Feri, B., Kennedy, A. J., Zhao, Y. 2010. Effect of refrigerated storage and processing technologies on the bioactive compounds and antioxidant capacities of 'Marion' and 'Evergreen' blackberries. LWT-Food Science and Technology, 43(8): 1253-1264.

۹-میرداودی، ح. ر.، ۱۳۸۶. شناسایی گیاهان دارویی استان مرکزی. فصلنامه علمی-پژوهشی گیاهان دارویی و معطر ایران، ۲۳(۴): ۵۵۹-۵۵۴.

10- Schawarz, M., Hillebrand, S., Habben, S., Degenhardt, A., Winterhalter, P. 2003. Application of high-speed countercurrent chromatography to the large-scale isolation of anthocyanins. Biochemical Engineering, 14(3): 179-189.

11- Dai, J., Gupte, A., Gates, L., Mumper, R. J. 2009. A comprehensive study of anthocyanin-containing extracts from selected blackberry cultivars: extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms. Journal of Food and Chemical Toxicology, 47(4): 837-847.

12- Wang, W. D., Xu, Sh. Y. 2007. Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate. Journal of Food Engineering, 82(3): 271-275.

13- Cho, M. J., Howard, L. R., Prior, R. L., Clark J. R. 2004. Flavonol glycosides and antioxidat capacity of various blackberry and blueberry genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. Journal of the Science of Food and Agriculture, 84, 1771-1782.

14- Dall'Acqua, S., Cervellati, R., Loi, M. C., Innocenti, G. 2008. Evaluation of *in vitro* antioxidant properties of some traditional Sardinian medicinal plants. Investigation of the high antioxidant capacity of *Rubus ulmifolius*. Journal of Food Chemistry, 106(2): 745-749.

15- Martini, S., D'Addario, C., Colacevich, A., Focardi, S., Borghini, F., Santucci, A., Figura, N., Rossi, C. 2009. Antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* strains and antioxidant properties of blackberry leaves (*Rubus ulmifolius*) and isolated compounds. International Journal of Antimicrob Agents, 34(1): 50-59.

16- Kalt, W., Forney, C. F., Martin, A., Prior, R. L. 1999. Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics and anthocyanins after fresh storage of small fruits. Agricultur and Food Chemistry, 47(11): 4638-4644.

17- Cam, M., Hisil, Y. 2010. Pressurized water extraction of polyphenols from pomegranate peels. Journal of Food Chemistry, 123(3): 878-885.

18- Jakobek, L., Seruga, M., Medvinović-Kosanović, M., Novak,

I. 2007. Antioxidant activity and polyphenols of aronia in comparison to other berry. Journal of Agriculture Conspectus Scientifics, 72(4): 301-306.

19- Waterhouse A.L. 2001. Determination of total phenolics, in current protocols in food analytical chemistry, 11.1.1-11.1.8, Wrolstad, R.E., Wiley.

20- Giusti, M. M., Wrolstad, R. E. 2001. Anthocyanins, Characterization and measurement with UV-visible Spectroscopy. Current protocols in food analytical chemistry (R.E. Wrolstaded), Wiley, New York F1.2.1-F1.1.13.

21- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., Chern, J. G. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of Food and Drug Analysis, 10(3): 178-182.

22- Benvenuti, S., Pellati, F., Melegari, M. and Bertelli, D. 2004. Polyphenols, anthocyanins, ascorbic acid, and radical scavenging activity of *Rubus*, *Ribes*, and *Aronia*. Journal of Food Science, 69(3): 164-169.

23- Ozcan, T. 2008. Some vitamin and organic acid contents in the fruits of *Prunus spinosa* L. subsp. *Dasyphylla* (Schur) domain from Europe-in-Turkey. IUFS journal of Biology, 67(2): 105-114.

24- Pourmorad, F., Hosseini Mehr, S. J., Shahabimajd, N. 2006. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. African Journal of Biotechnology, 5(11): 1142-1145.

25- Marinova, D., Ribarova, F. 2007. HPLC determination of carotenoids in Bulgarian berries. Journal of Food Composition and Analysis, 20(5): 370-374.

26- Mohammadi Motamed, S., Naghibi, F. 2010. Antioxidant activity of some edible plants of the Turkmen sahra region in northern Iran. Journal of Food Chemistry, 119(4): 1637-1642.

27- Barros, L., Carvalho, A.M., Morais, J. S., Ferreira, I.C.F.R. 2010. Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: detailed characterization in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. Journal of Food Chemistry, 120, 247-254.

28- Sokol-letowska, A., Oszmianski, J., Wojdylo, A. 2007. Antioxidant activity of the phenolic compounds of hawthorn, pine and skullcap. Food Chemistry, 103: 853–859.

29- Tosun, I., Ustun, N. S., Tekguler, B. 2008. Physical and chemical changes during ripening of blackberry fruits. Science Agricultur, 65(1): 87-90.

30- Hernandez, F., Melgarejo, P., Tomas-Barberan, F. A., Artés, F. 2000. Evolution of juice anthocyanins during ripening of new selected pomegranate (*Punica granatum*) colonies. European Food Research and Technology, 210(1): 39-42.

31- Prior, R. L., Cao, G., Martin, A., Sofic, E., McEwen, J., O'Brien, C., Lischner, N., Ehlenfeldt, M., Kalt, W., Krewer, G., Mainland, C.M. 1998. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity and variety of *Vaccinium* species. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46(7): 2686-2693.

32- Pantelidis, G. E., Vasilakakis, M., Manganaris, G. A., Diamantidis, Gr. 2007. Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and carnelian cherries. Journal of Food Chemistry, 102(3): 777-783.

33- Javanmardi, J., Stushnoff, C., Locke, E., Vivanco, M. 2003. Antioxidant activity and total

phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. Food Chemisry, 83: 547-550.

34- Duke, J. A., Bogenschutz-Godwin, M. J., Cellier, J. D., Duke, P. A. K. 2002. Medicinal herbs. CRC Press LLC, Boca Raton, London, New York, Washington, D.C., 2nd edition, 893p.

35- Padmaja, M., Sravanthi, M., Hemalatha, K.P.J. 2011. Evaluation of antioxidant activity of two Indian medicinal plants. Journal of Phytology, 3(3): 86-91.

36- Sharma, P. K., Chatterji, S., Rai, D. K., Mehta, S., Rai, P. K., Singh, R. K., Watal, G., Sharma, B. 2009. Antioxidant activities and phenolic contents of the aqueous extracts of some Indian medicinal plants. Journal of Medicinal Plants Research, 3(11): 944-948.

37- Boudet, A. M. 2007. Evolution and current status of research in phenolic compounds. Phytochemistry, 68: 2722-2735.

38- Olszewska, M. A., Nowak, S., Michel, P., Banaszcak, P., Kicel, A. 2010. Assessment of the content of phenolics and antioxidant action of inflorescences and leaves of selected species from the genus sorbus sensu stricto. Molecules, 15: 8769-8783.

39- Moyer, R. A., Hummer, K. E., Finn. C. E. Frei, B., Wrolstad, R. E. 2002. Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diver's small fruits: vaccinium, rubus, and ribes. Journal of Agricultural and Food and Chemistry, 50(3): 519-525.

40- Sawdogo, W. R., Meda, A., Lamien, C. E., Kiendrebeogo, M., Guissou, I., Nacoulma, O. G. 2006. Phenolic content and antioxidant activity if six Acanthaceae from Burkina Faso. Journal of Biological Sciences, 6(2): 249-252.