شناسایی کمی و کیفی آنتوسیانین ها در عصاره پوست انار

رحمت اله زارع زاده مهریزی[۱*]، زهرا امام جمعه[۲]، محمد شاهدی باغ خندان[۳]، الهه لونی[۴]، حمیدرضا اخوان[۵]، جواد بیابانی[۶]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه صنعتی اصفهان
۲- استاد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران
۳-استاد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان
۴- دانش‌آموخته کارشناسی گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران
۵- استادیار بخش علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان
۶- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد شیمی تجزیه، دانشگاه پیام نور

(تاریخ دریافت: ۹۱/۱۰/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۲/۴/۸)

چکیده

در تحقیق حاضر از پوست خشک سه رقم انار ایرانی توسط چهار حلال آلی و به روش سوکسله عصاره‌گیری شد. از عصاره‌ها پنج آنتوسیانین، توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا جفت شده با آشکارساز مرئی-فرابنفش، از طریق مقایسه زمان بازداری استانداردهای متناظرشان و به روش تزریق استاندارد خارجی، شناسایی و اندازه‌گیری شدند. نتایج نشان داد در میان حلال‌ها اتانول و در بین ارقام انار، پوست سیاه اردستان با سطح اطمینان بالاتر از ۹۵٪ بیشترین میانگین راندمان استخراج را داشته‌اند. نتایج آزمایشات کروماتوگرافی بیانگر این است که پوست انار، آنتوسیانین‌های منو-گلوکوزید بیشتری نسبت به آنتوسیانین‌های دی‌گلوکوزید دارد و بیشترین میزان آنتوسیانین‌ها به ویژه آنتوسیانین‌های منوگلوکوزید شامل دلفینیدین ۳ گلوکوزید (۲۰۸ mg/kg)، سیانیدین ۳ گلوکوزید (۲۲۹ mg/kg) و پلارگونیدین ۳ گلوکوزید (۱۰۵ mg/kg) در عصاره اتانولی پوست خشک رقم پوست سیاه اردستان شناسایی شدند.

کلید واژگان: کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، آنتوسیانین‌های دی‌گلوکوزید، استون، سوکسله.

* مسئول مکاتبات: rzarezadeh61@yahoo.com

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-13]

۱- مقدمه

درخت انار در نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری و در کشورهای مختلفی از جمله ایران، مصر، هند، ترکیه، کالیفرنیا، ایتالیا، اسپانیا و چین کشت میشود. تولید سالانه این میوه در دنیا تقریبا یک میلیون و پانصد هزار تن است که ایران ۴۷ درصد از این میزان تولید را به خود اختصاص داده است. صادرات انار از ایران از ۱۴۰۷۵ تن در سال ۲۰۰۳ میلادی به ۲۷۴۳۹ تن در سال ۲۰۰۷ میلادی افزایش داشته است. در سال‌های اخیر بازار انار رو به رشد بوده است که این خود به دلیل افزایش آگاهی مصرف کننده از خواص بالقوه و سلامتی‌زای میوه انار می‌باشد [۱]. در کارخانه‌های فرایند میوه انار بخش زیادی از ضایعات کارخانه که بسته به رقم آن از ۳۰ تا ۶۰٪ متغیر است را پوست میوه تشکیل می‌دهد [۲]. این نکته لزوم استفاده صنعتی و بهینه از چنین حجم وسیعی از ضایعات را روشن می‌کند. در واقع پوست انار یکی از مهمترین محصولات جانبی کارخانه‌های آب انارگیری است و به دلیل اثبات وجود ترکیبات پلی‌فنولیکی و دارویی فراوان در آن و خواص سلامتی‌زای عصاره آن در چند سال اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته است. تحقیقات زیادی، وجود ترکیبات پلی‌فنولیکی از جمله پونیکالجین و مشتقات الاجی‌تانن‌ها در پوست انار را اثبات و خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره پوست انار را بررسی نموده است[۳-۶]. امروزه مطالعات به سمت ابداع و تأمین روش‌های بسیار جدیدی در عصاره‌گیری، به منظور حفظ هر چه بیشتر فعالیت بیولوژیکی و خواص سلامتی‌زای پلی‌فنول‌های استخراج شده از پوست انار پیش‌رفته است. در یکی از این روش ها با استفاده از امواج ماوراء صوت[1] [۷] و در روش دیگری با استفاده از آب تحت فشار کنترل شده[2] [۸] از پوست انار عصاره‌گیری شده است. علاوه بر پیشرفت در طرق عصاره‌گیری، در خصوص جداسازی و شناسایی ترکیبات نیز مطالعات فراوانی صورت گرفته است. به عنوان مثال در پژوهشی به منظور جداسازی و تصفیه اجزاء اصلی پلی‌فنولی پوست انار و تعیین دقیق مقدار این اجزاء، روشی بسیار سریع و آسان معرفی شده است [۹].

همزمان با گسترش روش‌های استخراج، جداسازی و شناسایی، دامنه مطالعات در خصوص نوع ترکیبات پلی‌فنولی استخراج شده از پوست انار و نیز بررسی خواص بالقوه آنها نیز گسترش یافته است در این راستا زهین[3] و همکارانش خواص ضد-سرطانی، ضدجهش‌زایی و آنتی‌اکسیدانی تک تک اجزائی را که از پوست انار استخراج کرده بودند مورد بررسی قرار دادند [۱۰]یا در تحقیق جامعی، محتوای فنولیک کل، فلاونوئید کل، تانن، اسیدهای آلی و قند عصاره‌های تفاله و پوست انار تعیین و با یکدیگر مقایسه شدند[۱۱]. همچنین اثر آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولی پوست انار بر روغن سویا و موثر بودن آن در جلوگیری از اکسیداسیون روغن سویا توسط یعثوبی و همکاران در سال ۲۰۰۷ مورد بررسی قرار گرفت [۱۲]. بررسی منابع نشان داد علی رغم گستردگی مطالعات در زمینه استخراج و شناسایی ترکیبات دارویی از پوست انار تا به امروز تحقیق جامعی برای استخراج و شناسایی آنتوسیانین‌ها از این محصول جانبی پر-ارزش صنعت آب انارگیری انجام نشده است. آنتوسیانین‌ها در واقع مشتقات گلیکوزیله ۳و۵و۷و۳ٔ تتراهیدروکسی فلاویلیوم هستند که به عنوان گروه مهمی از رنگدانه‌های موجود در طبیعت به حساب می‌آیند. آن‌ها ترکیبات پلی‌فنولیکی و مسئول رنگ‌های قرمز، آبی و ارغوانی اکثر گل‌ها و میوه‌ها بوده و در دسته فلاونوئیدها طبقه‌بندی می‌شوند [۱۳]. این ترکیبات به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های فیتوشیمیایی عمل کرده و خواص سلامتی‌زای بالقوه فراوان دارند. اغلب اثرات درمانی مثبت آنها نیز به مکانیزم‌های آنتی‌اکسیدانی آنها مربوط می‌شود. معمولترین آنتوسیانین‌های موجود در بخش‌های خوراکی گیاهان گلیکوزیدهای سیانیدین، پلارگونیدین، پئونیدین، دلفینیدین، پتونیدین و مالویدین هستند [۱۴]. البته آنتوسیانین‌های آب انار در پژوهش‌های متعددی، شناسایی و خواص آن‌ها بررسی شده است. حتی در تحقیقی برای اولین بار در سال ۲۰۱۱ دو آنتوسیانین از گل‌های انار استخراج و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها اندازه‌گیری و با هم مقایسه شد [۱۵] مهمترین آنتوسیانین‌های موجود در آب انار که در چند کار تحقیقاتی شناسایی شده‌اند

1. ultrasonic
2. Pressurized Water
3. zahin

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-13]

عبارتند از سیانیدین ۳و۵ دی‌گلوکوزید[1]، سیانیدین ۳ گلوکوزید[2]، دلفینیدین ۳و۵ دی‌گلوکوزید[3]، دلفینیدین ۳ گلوکوزید[4]، پلارگونیدین ۳و۵ دی‌گلوکوزید[5] و پلارگونیدین ۳ گلوکوزید[6] [۱۶-۲۱] . در اکثر این پژوهش‌ها ظرفیت آنتی-اکسیدانی وابسته به وجود آنتوسیانین‌ها و ترکیبات پلی‌فنولیک دیگر موجود در آب انار نیز مورد بررسی قرار گرفته است. در تحقیق حاضر نحوه استخراج و شناسایی سه آنتوسیانین منو-گلوکوزید[7] و دو آنتوسیانین دی‌گلوکوزید[8] از عصاره‌های مختلف پوست انار مطالعه شد. در این کار سه رقم انار معروف ایرانی که از لحاظ رنگ، ضخامت و خصوصیات فیزیکی دیگر پوست تفاوت داشتند، انتخاب شده و توسط حلال‌های آلی از قبیل اتانول، اتیل‌استات، استون و مخلوط مساوی از چهار حلال آب:اتانول:استون:اتیل‌استات به روش سوکسله عصاره-گیری شدند. در نهایت عصاره‌ها از طریق دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا[9] جفت شده با شناساگر مرئی-فرابنفش[10] از نظر محتوای ۵ آنتوسیانین بررسی شدند. در انتخاب حلال‌ها سعی بر آن شد تا حلال‌ها، قطبیت و خواص فیزیکوشیمیایی متفاوتی، متناسب با نوع ترکیبات مورد استخراج، داشته باشند. ضمن آنکه در بین آن‌ها حلال‌هایی با درجه خوراکی مثل آب نیز وجود داشت. در این تحقیق سعی شد تا اهداف کلی ذیل محقق شوند:۱) استخراج عصاره پوست انار با حلال‌های آلی توسط دستگاه سوکسله و مقایسه راندمان استخراج‌ها؛ ۲) توسعه روشی مناسب برای جداسازی و شناسایی آنتوسیانین‌ها از عصاره پوست انار توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و آشکارساز مرئی-فرابنفش؛ و ۳) تعیین بهترین حلال و رقم انار جهت استخراج آنتوسیانین‌ها از پوست.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد شیمیایی

استانداردهای پنج آنتوسیانین شامل سیانیدین ۳ و ۵ دی-گلوکوزید، سیانیدین ۳ گلوکوزید، دلفینیدین ۳ گلوکوزید، پلارگونیدین ۳و۵ دی‌گلوکوزید و پلارگونیدین ۳ گلوکوزید از شرکت آپین انگلستان[11] و با درجه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا تهیه شدند. حلال‌های آلی استفاده شده در این تحقیق از قبیل متانول[12] ، اتانول[13] ، اتیل‌استات[14] ، استون[15] و آب یون زدوده[16] با درجه کروماتوگرافی از شرکت مرک آلمان[17] سفارش داده شدند. بقیه مواد شیمیایی با درجه آزمایشگاهی از شرکت مرک و گاز نیتروژن از شرکت داگا[18] در ایران تهیه شد.

۲-۲- آماده‌سازی نمونه‌های پوست انار

سه رقم انار معروف ایرانی که مصرف آن‌ها متداول‌تر و پوست آن‌ها از لحاظ ظاهری بیشترین تفاوت را داشت از مجموعه انار مرکز تحقیقات کشاورزی ساوه، انتخاب شدند (انار شیرین پوست سیاه و ضخیم اردستان، انار ملس پوست گلی ساوه و انار پوست سفید راور کرمان). از هر رقم به میزان ۲۰ کیلوگرم از میوه‌های رسیده و سالم چیده شد. انارها در همان روز به آزمایشگاه منتقل و میوه‌های آفتاب سوخته، ترک خورده و آفت زده به منظور دستیابی به یکنواختی قابل قبول، حذف شدند. پوست انار از بخش خوراکی و داخلی آن جدا، شسته و در سایه خشک شد به نحوی که نمونه‌ها در یک دوره ۱۰ روزه توزین به وزن ثابت رسیده بودند. پوست خشک شده توسط آسیاب برقی، سه بار و در هر بار به مدت ۱۰ ثانیه آسیاب شد در نهایت نمونه‌های خرد شده مربوط به هر رقم، کاملا مخلوط و یکنواخت شده و تا زمان استخراج با دستگاه سوکسله در شیشه‌های در بسته نگهداری شدند.

1. Cyanidin 3,5-di Glucoside (Cy3,5)
2. Cyanidin 3 Glucoside(Cy3)
3. Delphinidin 3,5-di Glucoside(Del3,5)
4. Delphinidin 3 Glucoside(Del3)
5. Pelargonidin 3,5 di Glucoside(Pla3,5)
6. Pelargonidin 3 Glucoside(Pla3)
7. Mono Glucoside Anthocyanin (MGA)
8. Di Glucoside Anthocyanin (DGA)
9. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)
10. Ultra Violet-Visible (UV-Vis)
11. APIN chemical LTD, England
12. Methanol
13. Ethanol
14. Ethyl Acetate
15. Acetone
16. De Ionized Water
17. Merck Chemical Company
18. Daga

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-13]

۲-۳- استخراج با دستگاه سوکسله

استخراج عصاره از ۱۰ گرم پوست انار پودر شده در دستگاه استخراج کننده سوکسله توسط اتانول، استون، اتیل‌استات و مخلوط مساوی از چهار حلال آب، اتانول، استون و اتیل استات به مدت ۶ ساعت انجام شد. تمامی استخراج‌ها در سه تکرار انجام شدند. عصاره‌های بدست آمده در آون تحت خلأ و در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد تغلیظ شده و به منظور حذف ذرات ریز با کاغذ صافی وات‌من[1] شماره ۴۱ صاف و در ۴۵۰۰ دور در دقیقه به مدت سه دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس نیمی از این عصاره‌ها تا زمان استفاده برای استخراج و شناسایی ترکیبات مورد نظر با دستگاه کروماتوگرافی در ظروف شیشه‌ای کوچک قهوه‌ای رنگ و داخل فریزر ذخیره شده و نیم دیگر به منظور تعیین راندمان استخراج درون ظرف شیشه‌ای مناسب نگه داشته شدند. راندمان استخراج‌ها در سه تکرار و از طریق حذف حلال آلی از عصاره در آون تحت خلا و در دمای ۹۰ درجه سانتیگراد تا دستیابی به وزن ثابت نمونه‌ها انجام شد.

۲-۴- استخراج آنتوسیانین‌ها از عصاره‌ها

جهت استخراج حداکثر آنتوسیانین‌ها از عصاره‌های بدست آمده از دستگاه سوکسله و به منظور آماده‌سازی آن‌ها برای تزریق به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا از روش استخراج مایع-مایع استفاده شد. در این روش نمونه‌ها در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۴ دقیقه سانتریفوژ شدند و حلال آلی آن‌ها از طریق دمیدن گاز نیتروژن به داخل ظرف به طور کامل حذف شد سپس دو میلی‌لیتر آب یون زدوده به نمونه‌های خشک اضافه شد. ترکیبات مورد نظر در مرحله بعد توسط نیم میلی‌لیتر اتیل‌استات از فاز آبی در دمای اتاق، به مدت چند دقیقه و با تکان دادن نمونه‌ها استخراج شده و به فاز آلی منتقل شدند. در نهایت فاز آبی حذف و نمونه‌های آماده شده برای تزریق به دستگاه HPLC با استفاده از متانول به حجم اولیه خود بازگردانده شدند.

۲-۵- دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

برای انجام این تحقیق از یک دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا ساخت شرکت هولت پاکارد آمریکا[2] مدل ۱۱۰۰مجهز به یک ایزو پمپ[3] مدل جی ۱۳۱۰ آ ، نمونه‌بردار خودکار[4] مدل جی ۱۳۱۳ آ و یک آشکارساز مرئی-فرابنفش هولت پاکارد[5]، استفاده شد.

۲-۶- شناسایی آنتوسیانین‌ها

قبل از تزریق به دستگاه، نمونه‌ها از یک میکروفیلتر با مش ۰/۴۵ میکرون ساخت شرکت کرومافیل آلمان[6] عبور داده شدند تمامی نمونه‌ها در حجم ۲۰ میکرولیتر و در دمای اتاق به دستگاه تزریق شدند. برای استخراج و جداسازی پنج آنتوسیانین، از یکدیگر، ترکیب متنوعی از فازهای متحرک مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت مخلوط آب و استونیتریل انتخاب شد. برای جداسازی آنتوسیانین‌ها از یک ستون فاز معکوس سی ۱۸ ساخت شرکت واترز[7] آمریکا با مشخصات ۴,۶ میلی‌متر قطر و ۲۰۰ میلی‌متر طول با قطر ذرات ۱۰ میکرون از نوع میکرو بنداپک[8] استفاده شد. آنتوسیانین‌ها در این تحقیق در یک تزریق به روش ایزوکراتیک[9] به مدت ۱۰ دقیقه توسط فاز متحرکی متشکل از ۸۳٪ آب و ۱۷٪ استونیتریل همراه با بافر فسفات در یک پ هاش معادل ۲/۵ و با شدت جریان یک میلی‌لیتر بر دقیقه جدا شده و از طریق یک آشکارساز مرئی-فرابنفش و در طول موج ۵۱۰ نانومتر شناسایی شدند [17]. در این کار اسید فسفریک نقش مؤثری در وضوح و جداسازی پیک‌ها داشت. برای نمونه کروماتوگرام آنتوسیانین‌های شناسایی شده در عصاره اتانولی رقم پوست سیاه اردستان (شکل ۱) آورده شده است. همچنین برای شناسایی و تعیین مقدار آنتوسیانین‌ها، ابتدا به روش استانداد خارجی منحنی درجه‌بندی رسم گردید و سپس پیک نمونه بر اساس مقایسه زمان بازداری آن با استاندارد متناظرش شناسایی شده و در نهایت بر اساس معادله خطی حاصل از منحنی درجه‌بندی استاندارد مربوطه تعیین مقدار گردید. در جدول شماره ۱ زمان بازداری پیک ترکیبات، معادله خط منحنی کالیبراسیون آن‌ها، محدوده خطی هریک، ضریب همبستگی، حد تشخیص دستگاه[10] و انحراف معیار وابسته[11] نشان داده شده است.

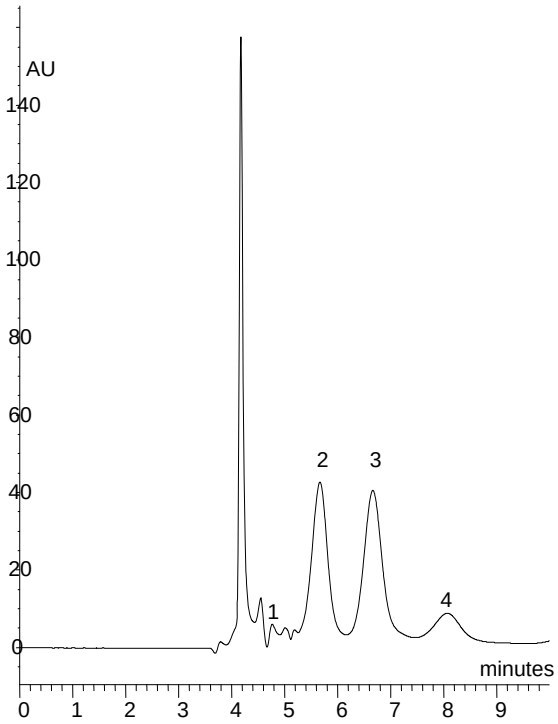
1. Whatman No.41
2. Hewlett Packard 1100 Series HPLC system
3. HP-1200 Iso Pump G1310A
4. HP Auto Sampler G1313A
5. HP UV–Vis Detector
6. Chromafil CA-45/25 S, Duren, Germany
7. Waters
8. μBondapack™ C18
9. Isocratic
10 . Limit of Detection
11 . Relative Standard Deviation

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-13]

جدول ۱ معادلات کالیبراسیون و برخی فاکتورهای کروماتوگرام استاندارد آنتوسیانین‌ها

ترکیبات	زمان بازداری (دقیقه)	محدوده خطی (میلی‌گرم بر لیتر)	معادله خط	ضریب همبستگی (r)	LOD (mg/lit)	RSD%
سیانیدین ۳و۵-دی گلوکوزید	۴/۷۴۵	۱/۰-۱۰/۰	۱۹/۶۶ *C – ۰/۴۷	۰/۹۹۹	۰/۱۰	۲/۷
پلارگونیدین ۳و۵-دی گلوکوزید	۵/۱۱۰	۰/۵-۱۰/۰	۱۹/۰۰ C + ۰/۷۰	۰/۹۹۹	۰/۱۰	۱/۸
دلفینیدین ۳-گلوکوزید	۵/۵۴۶	۱/۰-۱۰/۰	۵۸/۲۶ C + ۰/۷۹	۰/۹۹۹	۰/۰۲	۱/۵
سیانیدین ۳-گلوکوزید	۶/۴۹۱	۱/۰-۱۰/۰	۶۰/۴۵ C + ۰/۱۰	۱/۰۰۰	۰/۰۲	۱/۷
پلارگونیدین ۳-گلوکوزید	۷/۸۱۶	۱/۰-۱۰/۰	۵۴/۳۶ C + ۰/۳۰	۰/۹۹۹	۰/۰۲	۲/۵

*در جدول فوق حرف لاتین C معادل غلظت بر حسب میلی‌گرم در لیتر می‌باشد.



شکل ۱ کروماتوگرام آنتوسیانین‌های شناسایی شده در عصاره اتانولی رقم پوست سیاه اردستان. پیک‌ها: ۱. سیانیدین۳و۵-دی گلوکوزید; ۲. دلفینیدین۳-گلوکوزید; ۳. سیانیدین۳-گلوکوزید و ۴. پلارگونیدین۳-گلوکوزید)

۲- ۷- تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های مربوط به راندمان استخراج در این تحقیق در سه تکرار توسط نرم افزار آماری سس[1] ۹,۱ به روش آنالیز واریانس (ANOVA) تجزیه و تحلیل شد و برای نشان دادن حداقل تفاوت معنی‌داری در سطح اطمینان بالاتر از ۹۵ درصد ($P_{value}\leq 0.05$) از روش دانکن[2] استفاده شد. ارزش‌ها در قالب میانگین با دامنه خطای استاندارد نشان داده شدند.

۳- نتایج وبحث

۳-۱- راندمان استخراج

استخراج عصاره‌ها از پوست سه رقم انار بوسیله چهار حلال در سه تکرار انجام شد و در نهایت بعد از مراحل صاف کردن و سانتریفوژ، با حذف حلال از عصاره‌ها در آون تحت خلأ در دمای ۹۰ درجه سانتیگراد و رسیدن به وزن ثابت، راندمان استخراج‌ها محاسبه شد. نتایج راندمان استخراج از پوست سه رقم انار (جدول ۲) و چهار حلال (جدول ۳) همراه با تفاوت-های معنی‌داری در سطح اطمینان بالاتر از ۹۵ درصد جهت مقایسه آورده شده است. نتایج نشان می‌دهد بین ارقام انار در

1. SAS 9.1
2. Duncan Test

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-13]

میزان استخراج عصاره تفاوت چشمگیری نبوده و بر خلاف انتظار از رقم پوست ضخیم اردستان عصاره کمتری استحصال شده است حال آنکه در بین حلال‌ها تفاوت فوق العاده چشمگیری مخصوصا بین اتانول (۰/۷۷ ± ۱۸/۵۵) و اتیل-استات (۰/۰۱ ± ۰/۹۸) دیده می‌شود. نتایج روشن می‌کند در سطح اطمینان بالاتر از ۹۵ درصد بین هر چهار حلال، تفاوت معنی‌داری وجود دارد (جدول ۳). با نگاهی به جدول نقش و اهمیت قطبیت و ترکیب حلال‌ها در راندمان استخراج از پوست خشک انار مشخص می‌شود. به نحوی که اتانول به عنوان قطبی‌ترین حلال بالاترین راندمان استخراج را به خود اختصاص داده است و اتیل‌استات با کمترین قطبیت در مقام آخر قرار گرفته است. در این بین مخلوط مساوی از چهار حلال با قطبیت‌های مختلف در رتبه دوم و از نظر میزان استخراج عصاره از پوست، بعد از اتانول قرار دارد. برای مقایسه می‌توان به تحقیقی اشاره کرد که در آن راندمان استخراج از پوست انار با استفاده از حلال‌های مختلف تعیین شده و نتایج آن نشان می‌دهد در بین متانول، اتیل‌استات، کلروفورم و هگزان، حلال قطبی‌تر (متانول) استخراج فوق‌العاده بیشتری (۲۴۸ گرم عصاره در ۵۰۰ گرم پوست خشک انار) از پوست انار داشته است[۲۲].

۳-۲- آنتوسیانین‌ها

در جدول ۴ آنتوسیانین‌های شناسایی شده در نمونه‌های مختلف و مقدار آنها (بر حسب میلی‌گرم در هر ۱۰۰ گرم پوست خشک) برای مقایسه آورده شده است. همانطور که مشخص است بالاترین میزان آنتوسیانین‌ها بویژه منوگلوکوزید-های دلفینیدین ۳ گلوکوزید (۲۰۸ mg/kg)، سیانیدین ۳ گلوکوزید (۲۲۹ mg/kg) و پلارگونیدین ۳ گلوکوزید (۱۰۵ mg/kg) در عصاره اتانولی رقم پوست سیاه اردستان شناسایی شده‌اند. به عبارتی قطبی‌ترین حلال، از پوست خشک رقم اناری با تیره‌ترین رنگ، بیشترین میزان آنتوسیانین‌ها را استخراج نموده است. البته آب نیز به تنهایی می توانست برای عصاره گیری از پوست انار و استخراج آنتوسیانین ها استفاده شود اما به دلیل اینکه استخراج به روش سوکسله انجام شده و دمای جوش آب نسبت به حلال های آلی دیگر بالا بود ترجیح داده شد از آب در ترکیب با سه حلال دیگر استفاده شود. در مقایسه محتوای آنتوسیانین‌های منو و دی‌گلوکوزید، همانطور که نتایج آزمایشات HPLC نشان می‌دهد در تمام عصاره‌های حاصل از پوست سه رقم انار، آنتوسیانین‌های منوگلوکوزید بیشتری نسبت به دی‌گلوکوزید وجود دارد (جدول ۴). در خصوص تأثیر حلال، تحقیقی وجود دارد که در آن توسط حلال‌های مختلف همچون متانول، اتانول، استون و اتیل‌استات اجزاء پلی‌فنولی و آنتی‌اکسیدانی از پوست انار استخراج شده است. با معیار قرار دادن میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها، مشخص می‌شود قطبیت حلال‌ها، مهمترین نقش را در استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از پوست به عهده دارد و عصاره متانولی با بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشترین میزان آنتی‌اکسیدان‌ها و ترکیبات پلی‌فنولیکی از پوست را استخراج نموده است و به دنبال آن به ترتیب میزان قطبیت، اتانول، استون و اتیل‌استات قرار دارند [10]. در بررسی نتایج پژوهش حاضر تنها می‌توان آن‌ها را با نتایج تحقیقاتی که آنتوسیانین‌ها را در آب انار شناسایی و اندازه‌گیری نموده‌اند مقایسه کرد. به عنوان مثال فیشر در سال ۲۰۱۱ در تحقیقی از آب انار علاوه بر شش آنتوسیانین عمده‌ای که در بسیاری تحقیقات قبلی شناسایی شده‌اند و در مقدمه این مقاله از آن‌ها نام برده‌ایم، سه آنتوسیانین دیگر از جمله سیانیدین ۳ روتینوزید[1]، سیانیدین-پنتوزید[2] و سیانیدین-پنتوزید-هگزوسید[3] را نیز استخراج و شناسایی کرد[۱]. علی‌قورچی و همکاران در سال ۲۰۰۸ میزان کل شش آنتوسیانین آب ۱۵ رقم انار ایرانی را دامنه‌ای از ۱۵ تا ۲۵۲ میلی‌گرم در هر لیتر آب انار [۱۹]،کم و همکاران در سال ۲۰۰۹ محتوای کل آنتوسیانین‌های موجود در آب ۸ رقم انار ترکیه را دامنه‌ای از ۸۱ تا ۳۶۹ معادل میلی‌گرم سیانیدین ۳ گلوکوزید در هر لیتر آب انار[۷] و وارسته و همکاران در سال ۲۰۱۲ آنتوسیانین کل را در زمان برداشت محصول در انار رباب نیریز[4] ۹۳۵ میلی‌گرم در هر لیتر آب انار[۲۱] گزارش کردند. در تحقیق‌های علی‌قورچی و همکاران[۱۹].و وارسته و همکاران[۲۱] آنتوسیانین‌های دی‌گلوکوزید بخش عمده و اصلی محتوای آنتوسیانین کل را در آب انار شامل می‌شدند در صورتیکه در تحقیق حاضر به نظر می‌آید آنتوسیانین‌های منوگلوکوزید بخش عمده محتوای آنتوسیانین‌های عصاره پوست انار را تشکیل می‌دهند.

1. Cyanidin 3-rutinoside
2. Cyanidin-pentoside
3. Cyanidin–pentoside-hexoside
4. Rabbab-e-Neyriz

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-13]

جدول ۲ میانگین راندمان استخراج عصاره از پوست سه رقم انار ایرانی

رقم	تعداد داده	میانگین راندمان استخراج*
ملس پوست گلی ساوه	۱۲	۱۲/۸۷ ± ۲/۱۸ [a]
شیرین پوست سیاه اردستان	۱۲	۱۱/۵۹ ± ۱/۸۹ [b]
ترش پوست سفید راور	۱۲	۱۱/۴۸ ± ۲/۱۴ [b]

*ارزش‌های ذکر شده، میانگین‌ها با دامنه خطای استاندارد (means ± standard error) حاصل از ۱۲ آنالیز هستند
ضمن اینکه تفاوت‌های معنی‌داری در سطح اطمینان بالاتر از ۹۵ درصد در هر ستون از جدول با حروف لاتین مختلف نشان داده شده‌اند.

جدول ۳ میانگین راندمان استخراج عصاره توسط چهار حلال آلی از پوست انار

حلال آلی	تعداد داده	میانگین راندمان استخراج
اتانول	۹	۱۸/۵۵ ± ۰/۷۷ [a]
مخلوط مساوی از چهار حلال	۹	۱۶/۲۱ ± ۰/۳۹ [b]
استون	۹	۱۲/۱۹ ± ۰/۶۵ [c]
اتیل استات	۹	۰/۹۸ ± ۰/۰۱ [d]

*ارزش‌های ذکر شده، میانگین‌ها با دامنه خطای استاندارد (means ± standard error) حاصل از ۹ آنالیز هستند.

جدول ۴ ترکیبات شناسایی شده و مقدار آن‌ها (بر حسب میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم پوست خشک) در عصاره‌های استخراجی توسط چهار حلال آلی از پوست خشک سه رقم انار

رقم	شیرین پوست سیاه اردستان				ملس پوست گلی ساوه				ترش پوست سفید راور			
حلال*	۱	۲	۳	۴	۱	۲	۳	۴	۱	۲	۳	۴
سیانیدین ۳و۵-دی گلوکوزید	۰/۸۲	۳/۶۰	–	–	–	۲/۰۷	۰/۶۷	۲/۴۰	–	۲/۰۸	۰/۵۶	–
پلارگونیدین ۳و۵-دی گلوکوزید	۰/۲۴	–	–	–	۰/۱۳	۰/۵۵	–	۰/۴۹	–	–	۱/۲۴	۰/۱۳
دلفینیدین ۳-گلوکوزید	۲/۰۳	۲۰/۹	–	–	۰/۳۰	–	۰/۰۵	–	–	۰/۰۳	–	۰/۰۵
سیانیدین ۳-گلوکوزید	۲/۶۰	۲۲/۹	–	۱/۳۶	۱/۷۴	۲/۹۸	۰/۲۷	–	۰/۰۹	۰/۳۴	۰/۰۱	۰/۲۷
پلارگونیدین ۳-گلوکوزید	۲/۰۹	۱۰/۶	–	۰/۳۹	۲/۴۵	۲/۷۴	–	–	–	۰/۰۶	–	–

* حلال‌ها: ۱. استون، ۲. اتانول، ۳. اتیل استات و ۴. مخلوط مساوی از چهار حلال آب، اتانول، استون و اتیل‌استات است.

۴- نتیجه‌گیری کلی

در مطالعه حاضر توسط دستگاه سوکسله و چهار حلال آلی از پوست خشک سه رقم انار ایرانی عصاره‌گیری شد و نمونه‌ها از نظر راندمان استخراج با هم مقایسه شدند. همچنین عصاره های پوست انار جهت شناسایی و تعیین مقدار پنج آنتوسیانین به دستگاه HPLC تزریق شدند. نتایج آزمایشات ثابت کردند اتانول به عنوان قطبی‌ترین حلال مورد استفاده در این تحقیق علاوه بر اینکه سبب بیشترین راندمان استخراج (۰/۷۷ ± ۱۸/۵۵) بوده بالاترین میزان آنتوسیانین‌ها را از پوست خشک انار استخراج نموده است. با نتایج بدست آمده و مقایسه تاثیر قطبیت حلال ها در راندمان استخراج و بالاخص استخراج آنتوسیانین ها می توان گفت بهتر بود آب نیز به صورت جداگانه نتایج نشان دادند استخراج آنتوسیانین‌های منوگلوکوزید از دی‌گلوکوزیدها بیشتربوده به طوریکه در عصاره رقم پوست سیاه اردستان سهم آنتوسیانین‌های منو-گلوکوزید استخراج شده با اتانول به ۵۴۴ میلی‌گرم در هر کیلوگرم پوست خشک انار (دلفینیدین ۳ گلوکوزید (mg/kg

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-13]

۲۰۸)، سیانیدین ۳ گلوکوزید (mg/kg ۲۲۹) و پلارگونیدین ۳ گلوکوزید (mg/kg ۱۰۵)) می‌رسد. این نتایج با تأیید تحقیقات دیگر نقش پر اهمیت قطبیت حلال‌ها در استخراج ترکیبات پلی‌فنولیکی از پوست انار را نشان می‌دهد که البته آنتوسیانین‌ها نیز جزئی از همین ترکیبات است. همچنین تحلیل داده‌های راندمان استخراج نشان داد وزن عصاره استخراج شده از پوست ضخیم انار اردستان، با تفاوتی معنی دار در سطح اطمینان بیش از ۹۵ درصد کمتر از دو رقم دیگر بوده است.

۵- سپاسگزاری

از مدیریت مرکز تحقیقات انار جهاد کشاورزی ساوه جهت تأمین انار مورد نیاز تحقیق تقدیر و تشکر می‌گردد.

۶- منابع

[1] Fisher, U. A., Carle, R. & Kammerer, D. A. (2011). Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (Punica granatum L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juiced by HPLC-DAD-ESI/MS. *Food Chemistry*, 127, 807-821.

[2] Zarezadeh, M, R. (2008). *Extraction and identification of nutritional and pharmaceutical compounds from pomegranate peel of three dominant Iranian varieties*. M. D. dissertation, Isfahan University of Technology, Isfahan.

[3] Singh, R. P., Murthy, K. N. C. & Jayakrapasha, G. H. (2002). Studies on the antioxidant activity of pomegranate (punica granatum) peel and seed extraction using in vitro model. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 81-86.

[4] Guo, C., Yang,J., Wie, J. & Jiang, Y. (2003). Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. *Nutrition Research*, 23, 1719-1726.

[5] Negi, P. S., Jayaprakasha, G. K. & Jena, B. S. (2003). Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. *Food Chemistry*, 80, 393-397.

[6] Seeram. N. P., Lee, R., Hardy, M. & Heber, D. (2005). Rapid large scale purification of ellagitannin from pomegranate husk by-product of the commercial juice industry. *Separation and Purification Technology,* 41, 49-55.

[7] Cam, M. & (2010). Pressurised water extraction of polyphenols from pomegranate peels. *Food chemistry*. 123, 878- 885.

[8] Pan, Z., Qu, W., Ma, H., Atungulu, G. G. & Mchugh, T. H. (2012). Continuous and pulsed ultrasound-assisted extractions of antioxidants from pomegranate peel. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19, 365-372.

[9] Qu, W., Breksa, A. P., Pan, Z. & Ma, H. (2012). Quantitative determination of major polyphenol constituents in pomegranate products. *Food Chemistry*, 132, 1585-1591.

[10] Zahin, M., Aqil, F. & Ahmad, I. (2010). Broad spectrum antimutagenic activity of antioxidant active fraction of *Punica granatum L.* peel extracts. *Mutation research*, 703, 99-107.

[11] Martos, M. V., Navajas, Y. R., Lopez, J. F., Sendra, E., Barbera, E. S. & Alvarez, J. P. (2011). Antioxidant properties of pomegranate (*Punica granatum L.*) bagasses obtained as co-product in the juice extraction. *Food Research International*, 44, 1217-1223.

[12] Yasoubi, P., Barzegar, M., Sahari, M. A. and Azizi, M. H. (2007). Total phenolic contents and antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel extracts. *Journal of Agriculture Science and Technology*, 9: 35–42.

[13] Da Costa, C. T., Horton, D. & Margolis, S. A. (2000). Analysis of anthocyanins in foods by liquid chromatography, liquid chrom atography-mass spectrometry and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 881, 403-410.

[14] Kong, J. M., Chia, L. S., Goh, N. K., Chia, T. F. & Brouillard, R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64, 923-933.

[15] Zhang, L., Fu, Q. & Zhang, Y. (2011). Composition of anthocyanins in pomegranate flowers and their antioxidant activity. *Food Chemistry*, 127, 1444-1449.

[16] Du, C. T., Wang, P. L. & Francis, F. J. (1975). Anthocyanins of pomegranate. *Journal of Food Science*, 40, 417-418.

[17] Gil, M. I., Tomas-Barberan, F. A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D. M. & Kader, A. A. (2000). Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food chemistry,* 48, 4581-4589.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-13]

[18] Miguel, G., Dundlen, S., Antunes, D., Neves, A., Martins, D. (2004). The Effect of Two Methods of Pomegranate (Punica granatum L) Juice Extraction on Quality During Storage at 4°C. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 5, 332-337.

[19] Alighourchi, H. Barzegar, M. & Abbasi, S. (2008). Anthocyanins characterization of 15 Iranian pomegranate (*Punica granatum L.*) varieties and their variation after cold storage and pasteurization. *European Food Research and Technology*, 227, 881-887.

[20] Mousavinejad, G., Emam-Djomeh, Z., Rezaei, K. and Haddad Khodaparast, M. H. (2009). Identification and quantification of phenolic compounds and their effects on antioxidant activity in pomegranate juices of eight Iranian cultivar. *Food Chemistry*, 115: 1274–1278.

[21] Varaste, F., Arzani, K., Barzegar, M. & Zamani, Z. (2012). Changes in anthocyanins in arils of chitosan-coated pomegranate (*Punica granatum L.* cv. Rabbab-e-Neyriz) fruit during cold storage. *Food Chemistry*, 130, 267-272.

[22] Kulkarni, A. P. & Aradhya, S. M. (2004). Isolation and identification of a radical scavenging antioxidant punicalagin from pith and capillary membrane of pomegranate fruit. *Food Chemistry*, 87, 551-557.

[23] Cam, M., Hisil, Y. & Durmaz, G. (2009). Classification of eight pomegranate juices based on antioxidant capacity Measured by four methods. *Food Chemistry*, 112, 721-726.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-13]

Identification and quantification of anthocyanins in pomegranate peel extract.

Zarezadeh Mehrizi, R. A. [1 *], Emam-Djomeh, Z. [2], Shahedi Bagh Khandan, M. [3], Loni, E. [4], Akhavan, H. R. [5], Biabani, J. [6]

1. Former M.Sc. Student of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.
2. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Biosystems Engineering, University of Tehran, Karaj, Iran.
3. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.
4. Former B.Sc. Student of Food Science and Technology, Faculty of Biosystems Engineering, University of Tehran, Karaj, Iran.
5. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.
6. Former M.Sc. Student of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Payame Noor University, Yazd, Iran.

(Received: 91/10/23 Accepted: 92/4/8)

In present study, dried pomegranate peel of three dominant Iranian varieties was extracted by soxhlet extraction (SE) method via four solvents. In this study Five anthocyanins were identified and quantified in the extracts by high performance liquid chromatography (HPLC) coupled with ultraviolet-visible (UV-Vis) spectrometric detector at wavelength of 517 nm according to their retention times and external standard method. According to the results extraction yield of Poost Siyahe Shirine Ardestan (PSSA) variety is more than other two varieties and extraction yield of ethanolic extracts is more than other solvents in $p \leq 0.05$. HPLC analysis was indicated pomegranate peel include of more mono glucoside anthocyanins than di glucoside anthocyanins also the most of anthocyanins particularly mono glucoside anthocyanins were detected in ethanolic extract obtained from dried peel of PSSA variety.

Keywords: HPLC, Diglucoside Anthocyanin, Acetone, Soxhelt.

* Corresponding Author E-Mail Address: rzarezadeh61@yahoo.com

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-13]