

بررسی ترکیبات پلی فنولی و خواص آنتی اکسیدانی آب انار رقم پوست سیاه ساوه (*Punica granatum*)

ثناء حسینی^۱، لادن رشیدی^۲، مسعود هماپور^۳

۱- کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده داروسازی، دانشگاه آزاد واحد علوم دارویی، تهران، ایران
۲- نویسنده مسئول: استادیار، پژوهشکده صنایع غذایی و کشاورزی، پژوهشگاه استاندارد، سازمان ملی استاندارد ایران، کرج، ایران، پست الکترونیکی: l.rashidi@standard.ac.ir
۳- استادیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه آزاد واحد صفادشت، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۷/۳/۱۷

تاریخ پذیرش: ۹۷/۷/۴

چکیده

سابقه و هدف: انار پوست سیاه یکی از ارقام بومی ایران است که تقریباً نسبت به ارقام دیگر کمیاب بوده و به عنوان داروی گیاهی از آن استفاده می‌شود. در این تحقیق هدف، بررسی ترکیبات پلی فنولی و میزان فعالیت آنتی اکسیدانی آب انار پوست سیاه ساوه و تغلیظ شده آن با استفاده از خشک کن انجمادی و خشک کن تحت خلاء و انتخاب بهترین روش تغلیظ سازی آب انار است.

مواد و روش‌ها: انارها پس از شستشو، توسط آب میوه گیری، آب گیری شدند و پس از تغلیظ سازی با دو روش خشک کن انجمادی و آون تحت خلاء، فعالیت آنتی اکسیدانی با استفاده از روش DPPH، فنول کل با استفاده از روش رنگ سنجی فولین سیوکالتو، فلاوونوئیدها با روش رنگ سنجی کلرید آلومینیوم، شناسایی و تعیین مقدار ترکیبات پلی فنولی با استفاده از دستگاه HPLC در نمونه های آب انار اندازه گیری شدند.

یافته‌ها: بیشترین ترکیب پلی فنولی در نمونه های آب انار تغلیظ شده، پونیکالاژین B بود. آب انار تغلیظ شده با خشک کن انجمادی، در مقایسه با آب انار طبیعی و تغلیظ شده آن در آون خلاء، بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی ($70.0 \pm 0.4\%$ درصد)، فنول کل (2517.0 ± 0.75 میلی گرم گالیک اسید در لیتر) و فلاوونوئید (390.50 ± 0.00 میلی گرم کوئرستین در لیتر) را داشت. بین مقادیر حاصل از تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی، فلاوونوئید کل، ترکیب درصد ترکیبات پلی فنولی و فنول کل اندازه گیری شده در نمونه های تغلیظ شده و آب انار طبیعی اختلاف معنی داری ($p < 0.05$) وجود داشت.

نتیجه گیری: آب انار پوست سیاه ساوه تغلیظ شده در خشک کن انجمادی در مقایسه با آب انار تغلیظ شده در آون تحت خلاء بیشترین میزان ترکیب پلی فنولی و خواص آنتی اکسیدانی را داشت. بنابراین تغلیظ سازی آب انار با استفاده از خشک کن انجمادی به دلیل حفظ ترکیبات بیوفنولی و فعالیت آنتی اکسیدانی آنها به منظور کاربرد در صنعت غذا پیشنهاد می‌شود.

واژگان کلیدی: آب انار، ترکیبات فنولی، فعالیت آنتی اکسیدانی

• مقدمه

رادیكال‌های آزاد در تمام موجودات زنده در مسیرهای متابولیكي طبیعی و در طول واكنش‌های اكسیداسیون تشكيل می‌شوند. آن‌ها همچنین به وسیله آلاینده‌های محیطی، پرتوهای فرابنفش و بسیاری از فرآیندهای سوخت و ساز عادی تولید می‌شوند و می‌توانند به موجودات زنده آسیب بزنند (۱).

از سوی دیگر، آنتی اكسیدان‌ها نقش مهمی در حفظ سلامت بدن در برابر فرآیندهای اكسیداسیونی و رادیكال‌های آزاد، دارند و به صورت طبیعی یا مصنوعی هستند. در برخی مطالعات سمیت آنتی اكسیدان‌های مصنوعی موجب نگرانی شده و اخیراً توجه زیادی به استفاده از منابع غنی از

آنتی اكسیدان‌های طبیعی، مانند: گیاهان و مکمل‌های غذایی شده است، زیرا آنها شامل ویتامین‌ها (ویتامین E، C و بتاکاروتن) و پلی فنول‌های گیاهی هستند (۳، ۲). آنتی اكسیدان‌ها از تخریب اكسیداسیونی مواد جلوگیری می‌کنند، و می‌توانند به عنوان مکمل‌های غذایی استفاده شوند (۴).

انار با نام علمی پونیکاگراناتوم (*Punica granatum*) میوه‌ای از خانواده پونیکاسه (*Punicace*) است و در مناطق مختلفی از دنیا به طور گسترده‌ای کشت داده می‌شود (۵). از زمان‌های قدیم، میوه انار از گیاهان مهم اقتصادی در بازار مواد

هدف از انجام این مطالعه تعیین نوع و مقدار ترکیبات پلی فنولی، فعالیت آنتی اکسیدانی، اندازه گیری فنول کل و فلاوونوئید کل موجود در آب انار طبیعی، آب انار تغلیظ شده یا خشک شده در خشک کن انجمادی و آون خلاء، در رقم انار پوست سیاه ساوه و همچنین معرفی بهترین روش تغلیظ سازی آب انار طبیعی حاصل از انار پوست سیاه ساوه است.

• مواد و روش ها

مواد: معرف های ۲ و ۲-دی فنیل ۱-پیکرو هیدرازیل [DPPH] از شرکت سیگما-آلد ریچ (آمریکا) و معرف فولین-سیوکالتو، گالیک اسید، کوئرستین، متانول، سدیم کربنات، آلومینیوم کلرید، پتاسیم استات، اورتو فسفریک اسید و استونیتریل از شرکت مرک (آلمان) خریداری شدند. همچنین استاندارد ترکیبات پونیکالین، کاتچین، کافیک اسید، وانیلین، وانیلیک اسید، پی کوماریک اسید از شرکت سیگما - آلد ریچ خریداری شد.

جمع آوری نمونه: واریته انار پوست سیاه ساوه سالم در فصل پاییز (اواسط ماه آذر) از مرکز تحقیقات کشاورزی انار واقع در ساوه تهیه شد و همان روز به آزمایشگاه منتقل شد.

تهیه آب انار رقیق شده: به منظور انجام آزمون میوه ها شسته شده و با استفاده از آب میوه گیری دستی، آب انار گرفته شد. نمونه ها در شیشه های دربسته تیره تا زمان انجام آزمایش در فریزر نگهداری شدند. برای انجام آزمایش های مورد نظر، ۱ میلی لیتر از آب انار در بالن ۱۰۰ میلی لیتری توسط آب مقطر به حجم رسانده شد (۲).

تهیه آب انار تغلیظ شده در آون تحت خلاء: ۲۵۰ میلی لیتر از آب انار درون بشر ریخته شده و در دمای 50°C تحت خلاء نسبی و در فشار کمتر از ۱۰ میلی بار در آون خلاء (مدل UF^{55} از شرکت Memmert، آلمان)، قرار داده شد. نمونه تغلیظ شده پس از ۲۴ ساعت در ظرف پلاستیکی درب دار و غیر قابل نفوذ به هوا قرار گرفت و تا زمان انجام آزمایش در فریزر نگهداری شد. برای انجام آزمایش، ۱ گرم از آب انار تغلیظ شده، در بالن ۱۰۰ میلی لیتری با آب مقطر به حجم رسانده شد (۱۸).

تهیه پودر آب انار در خشک کن انجمادی: پس از ریختن آب انار در پلیت های یک بار مصرف، پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در فریزر قرار داده شدند و سپس از خشک کن انجمادی (مدل Christ Alpha 1-4 LD و ساخت کشور آلمان، دمای کندانسور 45°C ، فشار مطلق داخل محفظه ۲ میلی بار و در دمای محیط) برای تغلیظ سازی آب انار استفاده شد. نمونه های

غذایی و دارویی بوده است (۶). انار در حال حاضر از نظر میزان مصرف سالانه، رتبه ۱۸ را در جهان دارد (۷). میوه انار (شامل پوست و دانه و آب) و محصولات آن منابع غنی از ترکیبات فعال زیستی، مانند فلاوونوئیدها، الاژی تانن ها (*Ellagitannins*)، به طور عمده پونیکالاژین (*Punicalagin*)، الاژیک اسید (*Ellagic acid*) و پونیکالین ها (*Punicalin*) است که می توانند روی ظاهر و عطر و طعم انار تأثیر گذارند (۸، ۹). بخش خوراکی میوه انار را می توان به صورت تازه خوری، آب میوه تازه، نوشیدنی های کنسرو شده، ژله، مربا، خمیر و همچنین به صورت فرآورده های طعم دهنده و رنگ دهنده محصولات استفاده کرد (۱۰). در میان محصولات مشتق شده از انار، آب انار یکی از متداول ترین نوشیدنی ها بوده و به دلیل عطر، طعم و رنگ دلپذیری که دارد، در سراسر جهان مصرف می شود (۱۱).

آب انار حاوی مقادیر بالایی از آنتی اکسیدان ها نسبت به سایر آب میوه ها و نوشیدنی های دیگر بوده و دارای $85/4$ درصد آب، $10/6$ درصد مجموع مواد قندی، $1/4$ درصد پکتین، $0/2-1$ درصد ترکیباتی پلی فنولی و فلاوونوئید است. آب انار فعالیت های زیست شناختی مهمی، مانند فعالیت های ضد سرطانی، ضد میکروبی، ضد قارچی، تقویت سامانه ایمنی بدن، پیشگیری از بیماری های قلبی و جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدها، حتی در غلظت های پایین تر از ویتامین C را دارا است (۱۲، ۱۳). اخیراً مشتقات مختلف اسید گالیک و اسید الاژیک، با هیدرولیز قبلی یا بدون آن، در میوه و آب انار شناسایی شده اند (۸، ۱۴).

علاوه بر این، شناسایی و تعیین مقدار لیگنان های فیتواستروژن (*Phytoestrogen lignans*) در میوه های انار و محصولات مشتق شده از آن ها توسط Fischer و همکاران گزارش شده است (۱۵). با این حال، محتوای فنول و ترکیب آب انار به شدت تحت تأثیر رقم، شرایط زراعی و آب و هوایی، زمان برداشت و روش استخراج آب انار قرار می گیرد (۱۶).

آب انار را می توان به شکل های "آب از عصاره مستقیم"، "آب از کنسانتره"، "آب کنسانتره شده" و "آب از کنسانتره با طعم های طبیعی" به دست آورد (۱۷). کنسانتره باعث حذف جزئی آب می شود و ترکیبات جامد اصلی مانند قندها، مواد معدنی و ویتامین ها در کنسانتره بیشتر متمرکز می شوند. بنابراین خشک کردن از اهمیت زیادی برخوردار است، زیرا کیفیت محصول نهایی مانند طعم، رنگ و ظاهر را تعیین می کند (۱۸).

پتاسیم استات ۱ مولار و در پایان ۲/۸ میلی لیتر آب مقطر به آن اضافه شده و با ورتکس هم زده شد. نمونه‌ها در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند و سپس جذب آن‌ها در ۴۱۵ نانومتر قرائت شد. به منظور رسم نمودار استاندارد از کوثرستین استفاده شد. نتایج برحسب میلی گرم کوثرستین در لیتر بیان شد (۲۱).

شناسایی و تعیین مقدار اجزاء ترکیبات پلی فنولی: تعیین مقدار و نوع ترکیبات پلی فنولی در آب انار و نمونه‌های آب انار تغلیظ شده بر اساس استاندارد ملی ایران به شماره ۱۶۳۲۳ (روش اندازه گیری بیوفنول ها به وسیله کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا HPLC) انجام شد (۲۲). ترکیبات پلی فنولی با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی با کارایی بالا، (شرکت Young Lin مدل ۹۱۰۰ ساخت کشور کره جنوبی، و ستون RP-C18 (مشخصات ستون: اندازه ذرات ۵ میکرومتر، طول ۲۵ سانتی متر، قطر داخلی ۰/۴۶ میلی متر)) تعیین شد. در این روش آزمون، فاز متحرک A آب دیونیزه + استیک اسید ۵ درصد و فاز متحرک B استونیتریل + استیک اسید ۵ درصد بود. به این منظور برای تعیین نوع و مقدار ترکیبات پلی فنولی، نمونه‌های رقیق شده (۱ درصد) از فیلتر سر سرنگی ۰/۲ میکرونی عبور داده شدند. آب انار صاف شده به میزان ۲۰ میکرولیتر توسط سرنگ ۱۰۰ میکرولیتری به دستگاه HPLC تزریق شد. لازم به ذکر است که از هریک از ترکیبات پلی فنولی غلظت یک میلی گرم بر میلی لیتر (محلول ذخیره) تهیه شده و پس از رقیق سازی (تهیه غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر)، ۲۰ میکرولیتر از ماده استاندارد رقیق شده به دستگاه HPLC تزریق شد تا مکان پیک شاخص هر آنتی اکسیدان تعیین شود.

تجزیه و تحلیل آماری: در این پژوهش تمامی آزمون‌ها با ۳ بار تکرار انجام شد و نتایج حاصل با استفاده از روش آنالیز آماری واریانس (ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال $P < 0/05$ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SPSS ۲۰ انجام و نمودارها با نرم افزار اکسل ۲۰۱۶ رسم شد.

• یافته‌ها

میزان فنول کل: میزان فنول کل در جدول ۱، نشان داده شده است. مقدار فنول کل نمونه‌ها به روش فولین سیو کالتو (۲۰) و براساس معادله خط منحنی استاندارد گالیک اسید (x) $R^2 = 0/9987$ ، $y = 0/0098$ محاسبه شد (شکل ۱). نتایج به دست آمده در این تحقیق نشان داد که بین آب انار طبیعی و نمونه‌های آب انار تغلیظ شده با روش‌های مختلف از نظر

تغلیظ شده در ظروف پلاستیکی درب دار و غیر قابل نفوذ به هوا و سپس در ظرف حاوی سیلیکاژل قرار گرفتند و تا زمان انجام آزمون‌ها در فریزر نگهداری شدند. برای انجام آزمایش، ۱ گرم از آب انار تغلیظ شده در بالن ۱۰۰ میلی لیتری با آب مقطر به حجم رسانده شد (۱۸).

اندازه گیری درصد فعالیت آنتی اکسیدانی: فعالیت آنتی اکسیدانی آب انار طبیعی و آب انار تغلیظ شده به وسیله دو روش خشک کن انجمادی و تحت خلاء، با استفاده از روش مهار رادیکال آزاد DPPH اندازه گیری شد. در این روش به ۶۰ میکرولیتر از نمونه‌های آب انار تغلیظ شده یا آب انار رقیق شده، ۳ میلی لیتر از محلول متانولی ۰/۱ میلی مولار DPPH اضافه شد و به مدت ۳۰ ثانیه با ورتکس هم زده شد.

مخلوط حاصل به مدت ۲۰ دقیقه به منظور انجام واکنش در محل تاریک قرار گرفت و سپس جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد. لازم به ذکر است که شاهد همان محلول متانولی DPPH بدون افزودن نمونه بود. در نهایت، درصد مهار رادیکال‌ها بر اساس رابطه زیر محاسبه شد.

$$\text{درصد مهار رادیکال آزاد} = (Ac - As / Ac) \times 100$$

در این رابطه As و Ac به ترتیب، جذب نمونه و جذب شاهد در طول موج ۵۱۷ نانومتر است (۱۹).

اندازه گیری محتوای فنول کل با استفاده از معرف

فولین سیو کالتو: مقدار کل ترکیبات فنولی موجود در نمونه‌های رقیق شده، با روش فولین- سیو کالتو تعیین شد. لذا حدود ۱/۵ میلی لیتر از معرف فولین سیو کالتو (۱۰ درصد)، به ۳۰۰ میکرولیتر نمونه رقیق شده اضافه شد و بعد از آن ۱/۲ میلی لیتر از محلول سدیم کربنات (۷/۵ درصد) به آن اضافه شد. مخلوط با ورتکس به مدت چند ثانیه هم زده شد و به مدت ۹۰ دقیقه در تاریکی قرار داده شده و سپس جذب نمونه‌ها با استفاده از اسپکتروفتومتر UV-Vis در طول موج ۷۶۰ نانومتر قرائت شد. نتایج بر اساس میلی گرم گالیک اسید بر لیتر بیان شد (۲۰).

اندازه گیری محتوای فلاوونوئید کل: میزان کل

فلاوونوئیدها به روش رنگ سنجی آلومینیوم کلرید اندازه گیری شد. در این روش ۰/۵ میلی لیتر از نمونه‌های رقیق شده (آب انار یا نمونه‌های آب انار تغلیظ شده، که با آب رقیق شده (۱ درصد) است) در ۱/۵ میلی لیتر متانول حل شد. سپس ۰/۱ میلی لیتر از آلومینیوم کلرید ۱۰ درصد، ۰/۱ میلی لیتر از

میزان فنول کل اختلاف معنی داری وجود داشت ($P < 0/05$). بیشترین مقدار فنول کل مربوط به نمونه تغلیظ شده در خشک کن انجمادی به میزان $2517/0 \pm 0/75$ میلی گرم گالیک اسید در لیتر، و کمترین مقدار فنول کل مربوط به آب انار طبیعی به میزان $1544/0 \pm 0/80$ میلی گرم گالیک اسید در لیتر بود. بررسی بین سه نمونه آب انار طبیعی و نمونه‌های آب انار تغلیظ شده در خشک کن انجمادی یا آون خلاء نشان داد که آب انار تغلیظ شده در دستگاه خشک کن انجمادی در مقایسه با دو مورد دیگر حاوی مقادیر بیشتری از ترکیبات فنولی است.

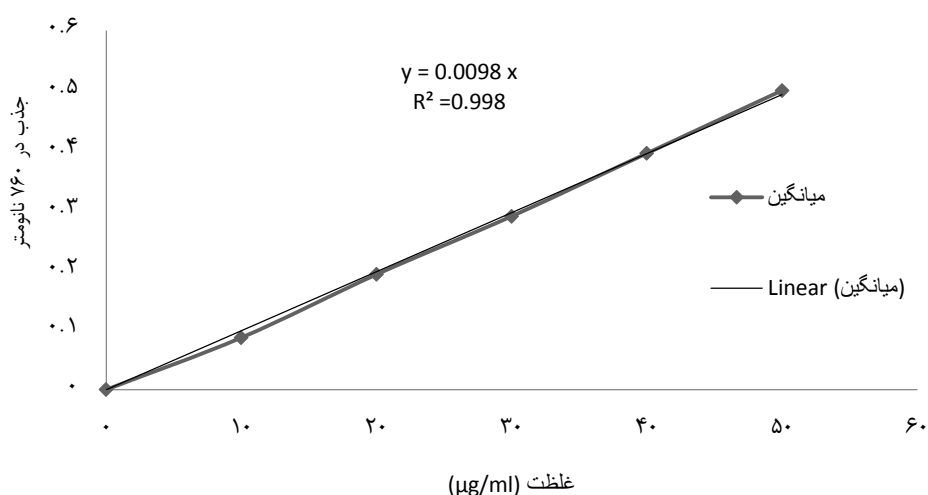
محتوای فلاوونوئید کل: مقدار محاسبه شده فلاوونوئید کل در جدول ۱ نشان داده شده است. میزان کل ترکیبات فلاوونوئیدی آب انار و نمونه‌های آب انار تغلیظ شده به روش رنگ سنجی آلومینیوم کلراید (۲۱) و بر اساس معادله‌ی خط منحنی استاندارد کوئرتستین مطابق با شکل ۲ اندازه‌گیری شد. بیشترین مقدار کل ترکیبات فلاوونوئیدی $390/00 \pm 0/00$ میلی گرم کوئرتستین در لیتر، به نمونه آب انار تغلیظ شده با خشک کن انجمادی تعلق داشت. مقدار کل ترکیبات فلاوونوئیدی موجود در نمونه‌های تغلیظ شده، در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معناداری داشت.

جدول ۱. میزان فنول کل و فلاوونوئید کل در آب انار رقیق شده، و نمونه‌های آب انار تغلیظ شده در آون خلاء و خشک کن انجمادی

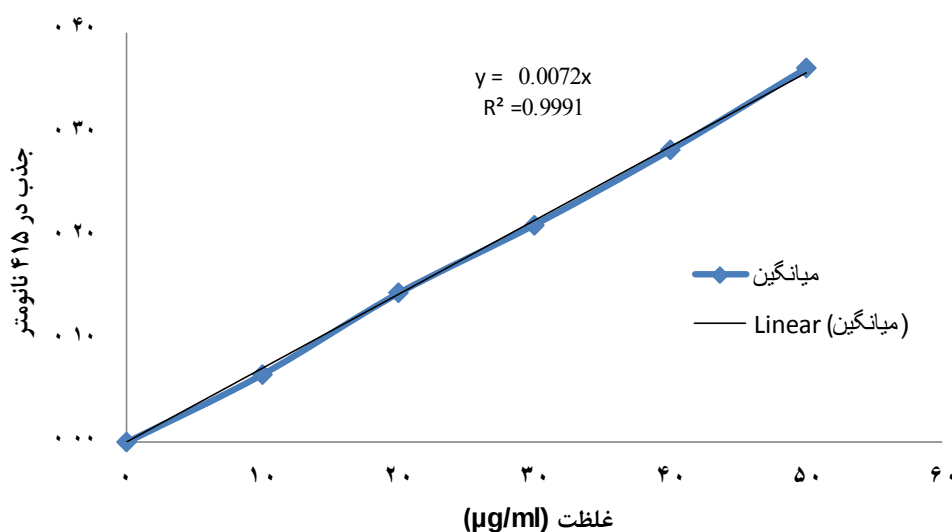
تیمارها	محتوای فنول کل (میلی گرم گالیک اسید در لیتر)	محتوای فلاوونوئید کل (میلی گرم کوئرتستین در لیتر)
آب انار تغلیظ شده در خشک کن انجمادی	$2517/0 \pm 0/75$ a	$390/00 \pm 0/00$ a
آب انار تغلیظ شده در آون خلاء	$2223/0 \pm 0/98$ b	$320/0 \pm 0/13$ b
آب انار طبیعی	$1544/0 \pm 0/80$ c	$300/0 \pm 0/92$ c

حروف متجانس بیانگر آن است که اختلاف معنی دار دیده نشد ($P > 0/05$).

حروف نامتجانس مثل a و b یا c در هر ستون، بیانگر اختلاف معنی دار بین نتایج است ($P < 0/05$).



شکل ۱. نمودار کالیبراسیون گالیک اسید



شکل ۲. نمودار کالیبراسیون کوئرستین

تیروزول، تیروزول، اسید گالیک، اسید الازیک، اسید کافئیک و وانیلین بیشترین مقدار را در نمونه آب انار تغلیظ شده در آون نیز خلاء به خود اختصاص دادند. همچنین پونیکالازین A و B نیز در آب انار طبیعی بیشترین مقدار را داشت، ولی مقدار آن‌ها در نمونه‌های آب انار تغلیظ شده کمتر از مقدار آب انار طبیعی شده بود.

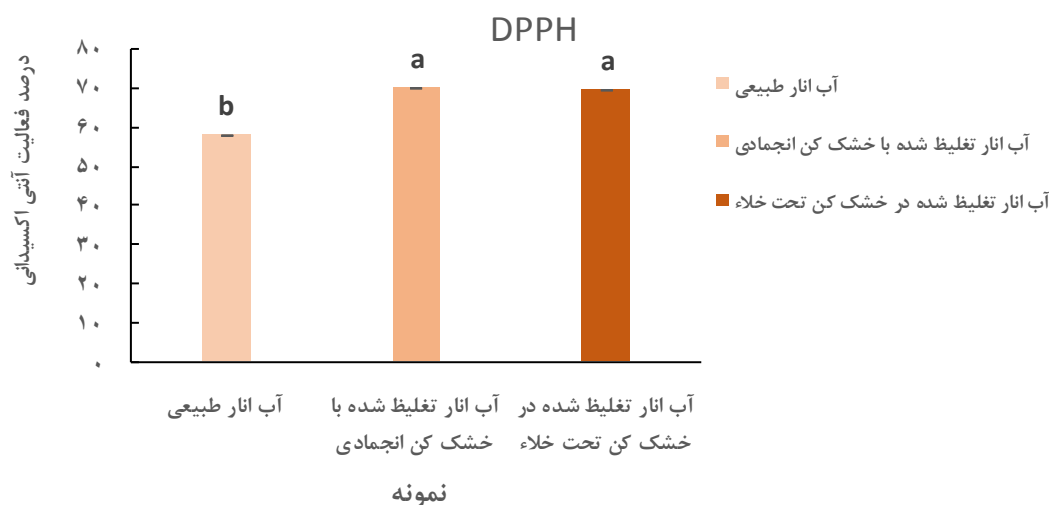
ترکیبات پلی فنولی موجود در نمونه‌های رقیق شده (۱ درصد) توسط HPLC: در این مطالعه، ترکیبات فنولی شناسایی شده در جدول ۲ آورده شده‌اند. تفاوت معنی‌داری در نتایج حاصل از اندازه‌گیری ترکیبات پلی فنولی موجود در نمونه‌ها مشاهده شد ($P < 0.05$). ترکیبات پلی فنولی مانند پونیکالین، کاتچین، و پی‌کوماریک بیشترین مقدار را در آب انار تغلیظ شده در خشک‌کن انجمادی داشته و هیدروکسی

جدول ۲. ترکیب درصد ترکیبات پلی فنولی موجود در آب انار طبیعی، نمونه‌های آب انار تغلیظ شده در آون خلاء و خشک‌کن انجمادی

ترکیب پلی فنولی	آب انار طبیعی (%)	آب انار تغلیظ شده در خشک کن انجمادی (%)	آب انار تغلیظ شده در آون تحت خلأ (%)
هیدروکسی تیروزول	0.5 ± 0.1^c	4.6 ± 0.1^b	7.0 ± 9.3^a
تیروزول	2.7 ± 0.2^b	1.8 ± 0.1^c	5.3 ± 0.1^a
گالیک اسید	5.1 ± 0.1^b	2.5 ± 0.1^c	9.8 ± 0.3^a
پونیکالین	4.9 ± 0.1^b	1.0 ± 0.1^a	1.0 ± 0.1^a
پونیکالازین A	2.0 ± 0.4^a	1.0 ± 0.3^b	5.4 ± 0.1^c
پونیکالازین B	2.7 ± 0.5^a	1.9 ± 0.3^b	1.0 ± 0.1^c
کاتچین	1.4 ± 0.3^b	1.6 ± 0.3^a	7.2 ± 0.1^c
وانیلین	1.6 ± 0.1^b	7.0 ± 0.1^a	7.8 ± 0.1^a
وانیلین	2.8 ± 0.1^b	2.2 ± 0.1^b	9.4 ± 0.1^a
پی‌کوماریک اسید	3.6 ± 0.1^b	7.2 ± 0.3^a	2.2 ± 0.1^c
فرولیک اسید	2.3 ± 0.1^a	0.8 ± 0.1^b	0.7 ± 0.1^b
الازیک اسید	3.2 ± 0.1^c	9.4 ± 0.1^b	7.4 ± 0.3^a
کوئرستین	0.1 ± 0.1^b	0.1 ± 0.1^b	1.0 ± 0.1^a
اپی ژنین	0.1 ± 0.1^c	1.8 ± 0.1^b	2.8 ± 0.1^a
روتین	3.5 ± 0.1^a	0.7 ± 0.1^b	0.8 ± 0.1^b
ناشناخته	6.3 ± 0.1^b	4.6 ± 0.2^c	1.2 ± 0.5^a

حروف متجانس در یک ردیف بیانگر آن است که اختلاف معنی‌دار دیده نشد ($P > 0.05$).

حروف نامتجانس مثل a و b یا c در یک ردیف بیانگر اختلاف معنی‌دار بین نتایج است ($P < 0.05$).



حروف متجانس بیانگر آن است که اختلاف معنی دار دیده نشد ($P > 0.05$).
حروف نامتجانس مثل a و b یا c بیانگر اختلاف معنی دار بین نتایج است ($P < 0.05$).

شکل ۳. میزان فعالیت آنتی اکسیدانی در آب انار طبیعی، و نمونه‌های آب انار تغلیظ شده در آون خلاء و خشک کن انجمادی

گزارش شد (۱۲). Hmid و همکاران در سال ۲۰۱۷، میزان فنول کل ۱۸ رقم آب انار در مراکش را بررسی کرده و گزارش کردند که مقدار فنول کل در ارقام محلی در محدوده ۱۳۸۵ تا ۹۴۷۶ میلی گرم گالیک اسید در لیتر و در ارقام خارجی در محدوده ۸۹۵ تا ۱۲۸۴ میلی گرم گالیک اسید در لیتر بود (۲۳). این در حالی است که آب انار طبیعی تحت بررسی حاوی 1544.0 ± 0.80 میلی گرم گالیک اسید در لیتر است که مقدار فنول کل آن در مقایسه با ارقام خارجی و برخی از ارقام محلی گزارش شده توسط Hmid و همکاران در سال ۲۰۱۷، بیشتر بود. همچنین در مقایسه با سایر گزارشات نیز مقدار فنول کل در این نمونه حائز اهمیت است.

بررسی میزان فعالیت آنتی اکسیدانی: اقدامی و همکاران در سال ۲۰۱۲ ویژگی‌های آنتی اکسیدانی آب میوه انار و عصاره پوست آن را در سه نوع مختلف بررسی کردند. آب انار ملس بیشترین آنتی اکسیدان را در مقایسه با آب انار ساوه و انار وحشی شمال داشت و فعالیت آنتی اکسیدانی آن‌ها در محدوده 32 ± 0.52 تا 48.3 ± 0.15 درصد قرار داشت (۲۴). در این پژوهش، فعالیت آنتی اکسیدانی اندازه‌گیری شده برای آب انار تغلیظ شده در خشک کن انجمادی (70.4 ± 0.40 درصد) و آب انار طبیعی (58.3 ± 0.00 درصد) از محدوده گزارش شده بیشتر بود. در پژوهش دیگر، هفت نوع آب انار مختلف تهیه شده از بازارهای محلی ترکیه که ادعا شده بود ۱۰ درصد آب انار خالص بدون افزودنی هستند، مورد بررسی

میزان فعالیت آنتی اکسیدانی: با توجه به شکل ۳ میزان فعالیت آنتی اکسیدانی برای آب انارهای تغلیظ شده در مقایسه با آب انار طبیعی، به طور معناداری افزایش داشته است ($P < 0.05$). مقدار فعالیت آنتی اکسیدانی در آب انار تغلیظ شده در خشک کن انجمادی (70.4 ± 0.40 درصد)، بیشترین مقدار فعالیت آنتی اکسیدانی و در آب انار طبیعی (58.3 ± 0.00 درصد)، کمترین مقدار فعالیت آنتی اکسیدانی بود.

• بحث

بررسی ترکیبات فنول کل: یکی از علت‌های اصلی بیشتر بودن میزان ترکیبات فنولی کل در نمونه‌های آب انار تغلیظ شده نسبت به آب انار طبیعی، پایداری کم ترکیبات فنولی در محیط‌های آبی است. خشک کن انجمادی منجر به حفظ ترکیبات فنولی دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بالا در نمونه طبیعی آب انار شد. در خشک کن انجمادی به علت عدم استفاده از درجه حرارت‌های بالا، کیفیت ترکیبات فنولی موجود در نمونه‌های تغلیظ شده حفظ شد. در یک بررسی، محتوای فنول کل آب انار قرمز شیرین اسپانیا در محدوده ۲۵۰۲ میلی گرم گالیک اسید در لیتر گزارش شد (۲۰). محققین دیگر نیز میزان ترکیبات فنولی موجود در ۴ نوع آب انار (آب انار تازه، آب انار ارگانیک، آب انار تجاری، آب انار تجاری ارگانیک) را بررسی کردند و میزان فنول کل در محدوده ۲۲۸۵ تا ۲۴۵۷ میلی گرم گالیک اسید در لیتر

استخراج آب میوه، مدت زمان استخراج آب میوه و نوع فرآورده‌های به کار رفته پس از استخراج آب میوه مانند خشک کردن آب میوه‌ها و رقم مورد آزمون و روش‌های انجام آزمون بستگی دارد (۳۰).

شناسایی ترکیبات پلی فنولی موجود در آب انار توسط HPLC: محققین میزان ترکیبات موجود در آب انار تازه، آب انار تجاری و آب انار تغلیظ شده را بررسی کردند، نتایج نشان داد که میزان ترکیبات پلی فنولی موجود در آب انار تازه، شامل: کافئیک اسید ($0/01$ درصد)، پی‌کوماریک اسید ($0/46$ درصد)، فرولیک اسید ($0/17$ درصد)، گالیک اسید ($0/04$ درصد) و کلروژنیک اسید ($0/8$ درصد)، همچنین در آب انار تجاری، کافئیک اسید ($0/08$ درصد)، پی‌کوماریک اسید ($0/32$ درصد)، فرولیک اسید ($0/21$ درصد)، گالیک اسید ($0/08$ درصد) و کلروژنیک اسید ($0/38$ درصد)، و ترکیبات پلی فنولی موجود در آب انار تغلیظ شده، کافئیک اسید ($0/78$ درصد)، پی‌کوماریک اسید ($0/25$ درصد)، فرولیک اسید ($0/49$ درصد)، گالیک اسید ($0/36$ درصد) و کلروژنیک اسید ($0/17$ درصد) بود که بیشترین میزان کافئیک اسید، فرولیک اسید و گالیک اسید را آب انار تغلیظ شده نسبت به آب انار تازه و تجاری داشت (۳۱). دیگر پژوهشگران ترکیبات فنولیک موجود در ۱۸ رقم انار مراکش را شناسایی کردند. ترکیبات فنولیک در این ارقام شامل گالیک اسید، کاتچین، اپی‌کاتچین، الازیک اسید، کلروژنیک اسید، کافئیک اسید، فرولیک اسید، کوئرستین، فلوریدزین، روتین بود (۲۳). در این پژوهش میزان ترکیب درصد برخی از ترکیبات بیوفنولی و نوع ترکیبات بیوفنولی گزارش شده بیش از مقادیر و انواع گزارش شده در ۱۸ رقم مراکشی و/یا آب انار تازه بود. Roygazoglu و همکاران در سال ۲۰۰۲، مقادیر ترکیبات فنولی موجود در آب انار، شامل: گالیک اسید ($4/55$)، کاتچین ($3/72$)، کلروژنیک اسید ($1/24$)، کافئیک اسید ($0/78$)، فرولیک اسید ($0/01$)، فلوریدزین ($0/99$) و کوئرستین ($2/50$) را بر حسب میلی گرم در لیتر گزارش کردند (۳۲). در بیشتر پژوهش‌های مربوط به آب انار، مقدار پونیکالائین گزارش نشده است، این درحالی است که در این پژوهش پونیکالائین بیشترین مقدار را در آب انار به خود اختصاص داده است. کاهش مقدار پونیکالائین در نمونه‌های خشک شده در خشک کن انجمادی یا آون تحت خلاء می‌تواند به دلیل ناپایداری این ماده طی فرآیند خشک کردن و نیاز به محیط آبی برای این ترکیب بیوفنولی باشد و در حقیقت زمان خشک کردن و دما می‌تواند از عوامل موثر بر کاهش میزان این ترکیب پلی فنلی در نمونه‌های خشک شده

قرار گرفت. میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها بین $10/37$ تا $67/46$ درصد گزارش شد (۲۵). همچنین در بررسی دیگر فعالیت آنتی‌اکسیدانی در هشت رقم آب انار در ایران بین $18/6$ تا $42/8$ درصد گزارش شد (۱۰). تفاوت مقادیر فعالیت آنتی‌اکسیدانی در نمونه‌های آب انار طبیعی و تغلیظ شده این پژوهش با سایر پژوهش‌های گزارش شده می‌تواند به دلیل عواملی مانند ارقام مختلف انار و روش تغلیظ‌سازی باشد. بر اساس نتایج جدول ۱، نمونه‌های آب انار تغلیظ شده در خشک‌کن انجمادی بیشترین ($70/44 \pm 0/40$ درصد) و آب انار طبیعی کمترین مقدار ($58/33 \pm 0/00$ درصد) فعالیت آنتی‌اکسیدانی را داشتند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که بین مقدار فنول کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی ارتباط نزدیک وجود دارد. آنتی‌اکسیدان‌ها از اکسیداسیون زنجیره‌ای رادیکال‌های آزاد، از اهداء کردن هیدروژن از گروه هیدروکسیل ترکیبات فنولی، جلوگیری می‌کنند (۲۶). بنابراین هر چقدر میزان ترکیبات فنولی بیشتر باشد، هیدروژن بیشتری به رادیکال‌های آزاد می‌دهد و مانع اکسید شدن می‌شود.

بررسی محتوای فلاوونوئید کل: زمانی که آب انار منجمد در خشک کن انجمادی قرار می‌گیرد، با فرآیند تصعید آب خود را از دست داده و همین امر سبب خلوص بیشتر ترکیبات فلاوونوئیدی موجود در آن می‌شود. فلاوونوئیدها یکی از مهم‌ترین فنول‌های طبیعی محسوب می‌شوند و دارای خاصیت مهار رادیکال آزاد هستند. پژوهش‌های انجام شده بیانگر آن است که پوست انار پوست سیاه بیشترین مقدار ترکیبات فلاوونوئیدی را نسبت به سایر ارقام انار دارد (۲۷). احمدی و همکاران در سال ۱۳۹۴ گزارش کردند که میزان کل فلاوونوئید در آب انار ارگانیک 307 میلی گرم در لیتر است (۲۸). در پژوهش دیگر، آب انار از بازارهای محلی تهیه شده و مقدار فلاوونوئید کل در نمونه‌های خریداری شده در محدوده $1/76$ میلی گرم کاتچین در میلی لیتر بود (۲۹). در بررسی دیگر، میزان فلاوونوئید در ۹ رقم انار در تونس بررسی شد که بیشترین مقدار فلاوونوئید کل در حدود 636 میلی گرم کوئرستین در لیتر و کمترین مقدار آن حدود 135 میلی گرم کوئرستین در لیتر بود (۳۰). مقدار فلاوونوئید کل آب انار طبیعی در این بررسی $300/0 \pm 0/92$ میلی گرم گالیک اسید در لیتر بود که در محدوده گزارش شده توسط احمدی و همکاران (۲۸) و Mahmoud و همکاران در سال ۲۰۱۵ بود (۲۹). لازم به ذکر است که اختلاف در مقدار فلاوونوئید کل، می‌تواند به عوامل مختلفی از قبیل، منطقه جغرافیایی محل رویش گیاه، روش

با آب انار تغلیظ شده در آون تحت خلاء و آب انار طبیعی بود. همچنین نمونه تغلیظ شده در خشک کن انجمادی دارای طعم و بو و رنگ مناسبی بود. بنابراین تغلیظ سازی آب انار با استفاده از خشک کن انجمادی به دلیل حفظ و نگهداری ترکیبات بیوفنولی و فعالیت آنتی اکسیدانی آنها به منظور کاربرد در صنعت غذا پیشنهاد می شود. "از سوی دیگر، بر اساس نتایج فوق می توان نتیجه گرفت که آب انار پوست سیاه ساوه منبع سرشاری از مواد فعال زیستی است که می تواند به عنوان نوشیدنی مفیدی برای سلامت انسان در نظر گرفته شود.

باشد. همچنین مقادیر سایر ترکیبات پلی فنولی شناسایی شده در آب انار پوست سیاه ساوه نسبت به سایر ارقام گزارش شده بیشتر بود.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج به دست آمده، نوع روش تغلیظ سازی مهم ترین عامل در حفظ و نگهداری ترکیبات پلی فنولی، فنول کل، فعالیت آنتی اکسیدانی و فلاوونوئید کل در آب انار پوست سیاه ساوه شناخته شد. نتایج نشان داد، که بین آب انار طبیعی، و نمونه های آب انار تغلیظ شده (در آون تحت خلاء، و در خشک کن انجمادی)، نمونه آب انار تغلیظ شده در خشک کن انجمادی دارای بیشترین مقدار فعالیت آنتی اکسیدانی، محتوای فنول کل و فلاوونوئید کل در مقایسه

References

1. Negi PS, Jayaprakasha GK, Jena BS. Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. J Food Chem 2003; 80: 393-397.
2. Aloqbi A, Omar U, Youss M, Grace M, Ann Lila M, Howell N. Antioxidant activity of pomegranate juice and punicalagin. J Natural Sci 2016; 8: 235-246.
3. Heshmati, M. Y Alikhani, M. T. Godarzi, M. R. Sadeghimanesh. The Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oil and Aqueous, Methanol, Ethanol, Ethyl Acetate and Acetone Extract of *Hypericum scabrum*. World Academy of Science, Engineering and Technology International Science, Nutrition and Food Engineering 2018, 12 (2): 37-41.
4. Gulcin I. Antioxidant Activity of Food Constituents. J Toxicol 2012; 86: 345-391.
5. Mphahlele RR, Fawole OA, Mokwena LM., Linus Opara. U. Effect of extraction method on chemical, volatile composition and antioxidant properties of pomegranate juice. J Botany 2016; 103: 135-144.
6. Teixeira da Silva JA, Rana TS, Narzary D, Verma N, Meshram DT, Ranade SA. Pomegranate biology and biotechnology. J Sci. Hortic 2013; 160: 85-107.
7. Fawole OA, Opara UL. Developmental changes in maturity indices of pomegranate fruit. J Sci. Hortic 2013; 159: 152-161.
8. Fischer UA, Carle R, Kammerer DR. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MSn. J Food Chem 2011; 127: 2807-821.
9. Zarezadeh Mehrizi R, Emam-Djomeh Z, Shahedi M, Keramat J, Rezaei K, Loni E. Phenolic compounds and antioxidant activity of dried peel of Iranian pomegranate. J Food Qual Hazards Control 2017; 4(4): 103-108.
10. Mousavinejad G, Eman-Djomeh Z, Rezaei K, Khodaparast MHH. Identification and quantification of phenolic compounds and their effects on antioxidant activity in pomegranate juices of eight Iranian cultivars. J Food Chem 2009; 115: 1274-1278.
11. Al-Maiman SA, Ahmad D. Changes in physical and chemical properties during pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit maturation. J Food Chem 2002; 76: 437-441.
12. Nuncio-Jauregui N, Cano-Lamadrid M, Hernandez F, Carbonell-Barrachina AA, Calin-Sanchez A. Comparison of fresh and commercial pomegranate juices from Mollar de Elche cultivar grown under conventional or organic farming practices. J Beverages 2015; 1: 34-44.
13. Mirjalili S. A Review on biochemical constituents and medicinal properties of pomegranate (*Punica granatum* L.). J MP 2015; 4(56): 1-22[in Persian].
14. Mena P, Calani L, Dall Asta C, Galaverna G, García-Viguera C, Bruni R, Crozier A, Del Río D. Rapid and comprehensive evaluation of (poly) phenolic compounds in pomegranate (*Punica granatum* L.) juice by UHPLC-MSn. J Molecules 2012; 17: 14821-14840.
15. Fischer UA, Jaksch AV, Carle R, Kammerer DR. Determination of lignans in edible and nonedible parts of pomegranate (*Punica granatum* L.) and products derived therefrom, particularly focusing on the quantitation of isolariciresinol using HPLC-DAD-ESI/ MSn. J Agric Food Chem 2012; 60: 283-292.
16. Gomez-Caravaca AM, Verardo V, Toselli M, Segura-Carretero A, Fernandez-Gutierrez A, Fiorenza Caboni M. Determination of the major phenolic compounds in pomegranate juices by HPLC-DAD-ESI-MS. J Agri Food Chem 2013; 61: 5328-5337.
17. Vazquez-Araujo L, Koppel K, Chambers E, Adhikari K, Carbonell-Barrachina AA. Instrumental and sensory aroma profile of pomegranate juices from the USA: difference between fresh and commercial juice. J Flavour Fragr 2010; 26: 129-138.
18. Maskan F. Production of pomegranate (*Punica granatum* L.) juice concentrate by various heating methods: colour degradation and kinetics. J Food Eng 2006; 72: 218-224.

19. QuW, Pan Z, Ma H. Extraction modeling and activities of antioxidants from pomegranate marc. J Food Eng 2010; 99: 16-23.
20. Aboonabi A, Rahmat A, Othman F. Evaluation of total phenolic content, total antioxidant activity, and antioxidant vitamin composition of pomegranate seed and juice. J Food Res Int 2015; 22: 1212-1217.
21. Mazandarani M, KhojamLi Z, Bayat H, Daneshvar A. The investigation of secondary metabolites content of *Punicagranatum* L. in two natural regions of Golestan province, North of Iran. J on Plant Sci Res 2010; 2(18): 63-70 [in Persian].
22. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Determination of biophenols in olive oils by HPLC. no16323. 1st. Edition, Karaj: ISIRI; 2013 [in Persian].
23. Hmid I, Elothmani D, Hanine H, Oukabli A, Mehinagic E. Comparative study of phenolic compounds and their antioxidant attributes of eighteen pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Morocco. J Chem 2017; 10: S2675-S2684.
24. Sadeghi F, Eghdami A, Eizadi M. Antioxidant activity of juice and peel extract of three variety of pomegranate and the effect of pomegranate juice on the plasma lipids. Int J Bio Sci 2012; 10(2):116-123.
25. Tezcan F, Gultekin-Ozguven M, Diken T, Ozcelik B, Erim FB. Antioxidant activity and total phenolic, organic acid and sugar content in commercial pomegranate juices. J Food Chem 2009; 115: 873-877.
26. Roginsky V, Lissi EA. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. J Food Chem 2005; 92: 235-254.
27. Dana N, Haghjooy javanmard SH, Rafiee L. Antiangiogenic and antiproliferative effects of black pomegranate peel extract on melanoma cell line. J Pharm Sci 2015; 10(2): 117-124.
28. Ahmadi M, Ghasemnezhad M, Meighani H, Kavooosi M.A Comparison of conventional, integrated and organic management systems on the quality of pomegranate fruit cv "Rabbab-e-Shiraz". J horticulture Sci 2016; 3: 447-456[in Persian].
29. Mahmoud SH, Ashoush IS, Attia MY, RM M. Immunomodulatory and Antioxidant Activity of Pomegranate Juice Incorporated with Spirulina and Echinacea Extracts Sweetened by Stevioside. J Agric Vet Sci 2015; 8(2): 161-174.
30. El Kar C, Ferchichi A, Attia F, Bouajila J. Pomegranate (*Punica granatum*) Juices: chemical composition, micronutrient cations, and antioxidant capacity. J Food Sci 2011;76(6):795-800.
31. Karakaplan, M., Yildiz, M. Determination of phenolic acids in pomegranate juices by HPLC-DAD. J Sci Tech 2017; 6(10): 32-37.
32. Poyrazoglu E, Gokmen V, Artik N. Organic acids and phenolic compounds in pomegranates (*Punica granatum* L.) grown in Turkey. J Food Comp Anal 2002; 15: 567-575.

Investigation of the Polyphenolic Compounds and Antioxidant Properties of Black Peel Pomegranate Juice Cultivar (*Punica granatum*) in Saveh

Hosseini S.¹, Rashidi L.*², Homapoor M³

1- Msc. Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Pharmacy, Islamic Azad University Pharmaceutical Science Branch, Tehran, Iran.

2- *Corresponding author: Assistant Prof, Department of Food Science and Agriculture, Research Standard Institute, Iranian National Standards Organization. Email: l.rashidi@standard.ac.ir

3- Assistant Prof, Department of Food Science and Technology, Safadasht Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received 7 Jun, 2018

Accepted 26 Sept, 2018

Background and Objectives: Black peel pomegranate is one of the indigenous cultivars in Iran, which is approximately rare in comparison with other cultivars and is used as an herbal therapy. In this research, the aim was studying the polyphenol compounds and antioxidant activity of pomegranate juice, condensed juice with freeze dryer, and vacuum oven, and choosing the best pomegranate juice condensation method.

Materials and Methods: For this purpose, pomegranate fruits were washed, and squeezed for obtaining the juice. After the juices were condensed by two methods (freeze dryer and vacuum oven), their antioxidant activity using DPPH assay, total phenol using Folin-Ciocalteu reagent, flavonoids using aluminum chloride method, and detection and quantity of polyphenol compounds using HPLC were determined.

Results: The results showed that the highest polyphenol compound of the condensed black peel pomegranate juice was punicalagin B. In addition, the highest antioxidant activity ($70.0 \pm 0.40\%$), total phenol (2517.0 ± 0.75 mgGa/100ml), and flavonoid (390.50 ± 0.00 mgQ/100ml) were belonged to the condensed pomegranate juice with freeze dryer in comparison with natural pomegranate juice and condensed pomegranate juice with vacuum oven, respectively. There were significant differences in the amounts of antioxidant activity, polyphenol compounds, total flavonoid, and total phenol of the condensed pomegranate juices and natural pomegranate juice ($p < 0.05$).

Conclusion: The condensed black peel pomegranate juice with freeze dryer had the highest polyphenol compounds and antioxidant activity values in comparison with the pomegranate juice with vacuum oven. Therefore, the condensation of pomegranate juice using freeze dryer because of preserving polyphenol compounds and their antioxidant activities is proposed for application in food industry.

Keywords: Antioxidant activity, Phenol compounds, Pomegranate juice