**مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران**
**سال چهاردهم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۸، صفحات ۱۰۸-۹۹**

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 19:39 +0430 on Sunday May 16th 2021

# 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 پلی‌فنولی و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی آب انار پوست سیاه ساوه و تغلیظ شده آن با استفاده از خشک‌کن انجمادی و خشک‌کن تحت خلاء و انتخاب بهترین روش تغلیظ‌سازی آب انار است.

**مواد و روش‌ها:** انارها پس از شستشو، توسط آب میوه‌گیری، آب‌گیری شدند و پس از تغلیظ‌سازی با دو روش خشک‌کن انجمادی و آون تحت خلاء، فعالیت آنتی‌اکسیدانی 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 نمونه‌های آب انار اندازه‌گیری شدند.

**یافته‌ها:** بیشترین ترکیب پلی‌فنولی در نمونه‌های آب انار تغلیظ شده، پونیکالاژین B بود. آب انار تغلیظ شده با خشک‌کن انجمادی، در مقایسه با آب انار طبیعی و تغلیظ شده آن در آون خلاء، بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۰/۴۰±۷۰/۰ درصد)، فنول کل (۰/۷۵±۲۵۱۷/۰ میلی‌گرم گالیک اسید در لیتر) و فلاوونوئید (۰/۰۰±۳۹۰/۵۰ میلی‌گرم کوئرستین در لیتر) را داشت. بین مقادیر حاصل از تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فلاوونوئید کل، ترکیب درصد ترکیبات پلی‌فنولی و فنول کل اندازه‌گیری شده در نمونه‌های تغلیظ شده و آب انار طبیعی اختلاف معنی‌داری ($p<0/05$) وجود داشت.

**نتیجه گیری:** آب انار پوست سیاه ساوه تغلیظ شده در خشک‌کن انجمادی در مقایسه با آب انار تغلیظ شده در آون تحت خلاء بیشترین میزان ترکیب پلی‌فنولی و خواص آنتی‌اکسیدانی را داشت. بنابراین تغلیظ‌سازی آب انار با استفاده از خشک‌کن انجمادی به دلیل حفظ ترکیبات بیوفنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها به منظور کاربرد در صنعت غذا پیشنهاد می‌شود.

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

## • مقدمه

رادیکال‌های آزاد درتمام موجودات زنده در مسیرهای متابولیکی طبیعی و در طول واکنش‌های اکسیداسیون تشکیل 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 اکسیدان‌ها نقش مهمی در حفظ سلامت بدن در برابر فرآیندهای اکسیداسیونی و رادیکال‌های آزاد، دارند و به صورت طبیعی یا مصنوعی هستند. در برخی مطالعات سمیت آنتی‌اکسیدان های مصنوعی موجب نگرانی شده و اخیراً توجه زیادی به استفاده از منابع غنی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی، مانند: گیاهان و مکمل‌های غذایی شده است، زیرا آنها شامل ویتامین‌ها (ویتامین E، C و بتاکاروتن) و پلی‌فنول‌های گیاهی هستند (۳، ۲). آنتی‌اکسیدان‌ها از تخریب اکسیداسیونی 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

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 19:39 +0430 on Sunday May 16th 2021

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 تانن‌ها (*Ellagitannins*)، به طور عمده پونیکالاژین (*Punicalagin*)، الاژیک اسید (*Ellagic acid*) و پونیکالین‌ها (*Punicalin*) است که می‌توانند روی ظاهر و عطر و طعم انار تأثیر گذارند (۹، ۸).

بخش خوراکی میوه انار را می توان به صورت تازه‌خوری، آب میوه تازه، نوشیدنی‌های کنسرو شده، ژله، مربا، خمیر و همچنین به صورت فرآورده‌های طعم دهنده و رنگ‌دهنده محصولات استفاده کرد (۱۰). در میان محصولات مشتق شده از انار، آب انار یکی از متداول‌ترین نوشیدنی‌ها بوده و به دلیل عطر، طعم و رنگ دلپذیری که دارد، در سراسر جهان مصرف می‌شود (۱۱).

آب انار حاوی مقادیر بالایی از آنتی‌اکسیدان‌ها نسبت به سایر آب میوه‌ها و نوشیدنی‌های دیگر بوده و دارای ۸۵/۴ درصد آب، ۱۰/۶ درصد مجموع مواد قندی، ۱/۴ درصد پکتین، ۱-۰/۲ درصد ترکیباتی پلی‌فنولی و فلاوونوئید است. آب انار فعالیت‌های زیست شناختی مهمی، مانند فعالیت های ضد سرطانی، ضد میکروبی، ضد قارچی، تقویت سامانه ایمنی بدن، پیشگیری از بیماری‌های قلبی و جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدها، حتی در غلظت‌های پایین‌تر از ویتامین C را دارا است (۱۳، ۱۲). اخیراً مشتقات مختلف اسید گالیک و اسید الاژیک، با هیدرولیز قبلی یا بدون آن، در میوه و آب انار شناسایی شده‌اند (۱۴، ۸).

علاوه بر این، شناسایی و تعیین مقدار لیگنان‌های فیتواستروژن (*Phytoestrogen lignans*) در میوه‌های انار و محصولات مشتق شده از آن‌ها 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 می‌گیرد (۱۶).

آب انار را می‌توان به شکل‌های "آب از عصاره مستقیم"، "آب از کنسانتره"، "آب کنسانتره شده " و " آب از کنسانتره با طعم‌های طبیعی" به دست آورد (۱۷). کنسانتره باعث حذف جزئی آب می‌شود و ترکیبات جامد اصلی مانند قندها، مواد معدنی و ویتامین‌ها در کنسانتره بیشتر متمرکز می‌شوند. بنابراین خشک کردن از اهمیت زیادی برخوردار است، زیرا کیفیت محصول نهایی مانند طعم، رنگ و ظاهر را تعیین می‌کند (۱۸).

هدف از انجام این مطالعه تعیین نوع و مقدار ترکیبات پلی‌فنولی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، اندازه‌گیری 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 روش‌ها

**مواد:** معرف‌های ۲و۲-دی فنیل ۱-پیکروهیدرازیل [DPPH] از شرکت سیگما–آلدریچ(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، کافئیک اسید، وانیلین، وانیلیک اسید، پی‌کوماریک اسید از شرکت سیگما – آلدریچ خریداری شد.

**جمع‌آوری 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 آب‌میوه‌گیری دستی، آب انار گرفته شد. نمونه ها در شیشه‌های دربسته تیره تا زمان انجام آزمایش در فریزر نگهداری شدند. برای انجام آزمایش‌های مورد نظر، ۱ میلی‌لیتر از آب انار در بالن ۱۰۰میلی لیتری توسط آب مقطر به حجم رسانده شد (۲).

**تهیه آب انار تغلیظ شده درآون تحت خلاء:** ۲۵۰ میلی‌لیتر از آب انار درون بشر ریخته شده و در دمای ۵۰°C تحت خلاء نسبی و در فشار کمتر از ۱۰ میلی بار در آون خلاء (مدل $UF^{55}$ از شرکت Memmert، آلمان)، قرارداده شد. نمونه تغلیظ شده پس از ۲۴ ساعت درظرف پلاستیکی دربدار و غیرقابل نفوذ به هوا قرار گرفت و تا زمان انجام آزمایش در فریزر نگه‌داری شد. برای انجام آزمایش، ۱ گرم از آب انار تغلیظ شده، دربالن ۱۰۰ میلی‌لیتری با آب مقطر به حجم رسانده شد (۱۸).

**تهیه پودر آب انار در خشک کن انجمادی:** پس از ریختن آب انار در پلیت‌های یک بار مصرف، پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در فریزر قرار داده شدند و سپس ازخشک کن انجمادی (مدلChrist Alpha 1-4 LD و ساخت کشور آلمان، دمای کندانسور ۴۵°C ، فشار مطلق داخل محفظه ۲ میلی بار و در دمای محیط) برای تغلیظ‌سازی آب انار استفاده شد. نمونه‌های

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 19:39 +0430 on Sunday May 16th 2021

تغلیظ شده در ظروف پلاستیکی دربدار و غیرقابل 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 میلی‌لیتری با آب مقطر به حجم رسانده شد (۱۸).

**اندازه‌گیری درصد فعالیت آنتی اکسیدانی**: فعالیت آنتی‌اکسیدانی آب انار طبیعی و آب انار تغلیظ شده به وسیله دو روش خشک‌کن 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 میلی‌لیتر از محلول متانولی ۰/۱ میلی‌مولار DPPH اضافه شد و به مدت ۳۰ ثانیه با ورتکس همزده شد.

مخلوط حاصل به مدت۲۰ 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.

درصد مهار رادیکال آزاد× (Ac-As/Ac) = ۱۰۰

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

**اندازه‌گیری محتوای فنول کل با استفاده از معرف فولین سیوکالتو:** مقدار کل ترکیبات فنولی موجود در نمونه‌های رقیق شده، با روش فولین- سیوکالتو تعیین شد. لذا حدود ۱/۵ میلی‌لیتر از معرف فولین سیوکالتو (۱۰درصد)، به ۳۰۰ میکرولیتر نمونه رقیق شده اضافه شد و بعد از آن ۱/۲ میلی‌لیتر از محلول سدیم کربنات (۷/۵درصد)به آن اضافه شد. مخلوط با ورتکس به مدت چند ثانیه همزده 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 میلی‌گرم گالیک اسید بر لیتر بیان شد (۲۰).

**اندازه‌گیری محتوای فلاوونوئید کل:** میزان کل فلاوونوئیدها به روش رنگ سنجی آلومینیوم کلرید اندازه‌گیری شد. در این روش ۰/۵ میلی‌لیتر از نمونه‌های رقیق شده (آب انار یا نمونه‌های آب انار تغلیظ شده، که با آب رقیق شده (۱درصد) است) در ۱/۵ میلی‌لیتر متانول حل شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از آلومینیوم کلرید ۱۰ درصد، ۰/۱ میلی‌لیتر از پتاسیم استات ۱ مولار و در پایان ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه شده و با ورتکس همزده 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 کوئرستین استفاده شد. نتایج برحسب میلی‌گرم کوئرستین 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 پلی‌فنولی 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 سانتی‌متر، قطر داخلی ۰/۴۶ میلی‌متر)) تعیین شد. در این روش آزمون، فاز متحرک A آب دیونیزه + استیک اسید ۵درصد و فاز متحرک B استونیتریل + استیک اسید ۵درصد بود. به این منظور برای تعیین نوع و مقدار ترکیبات پلی‌فنولی، نمونه‌های رقیق شده (۱درصد) 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 پلی‌فنولی غلظت یک میلی گرم بر میلی‌لیتر (محلول ذخیره) تهیه شده و پس از رقیق‌سازی (تهیه غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، ۲۰ میکرولیتر از ماده استاندارد رقیق شده به دستگاه HPLC تزریق شد تا مکان پیک شاخص هر آنتی‌اکسیدان 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<۰/۰۵ 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 سیوکالتو (۲۰) و براساس معادله خط منحنی استاندارد گالیک اسید (x y=۰/۰۰۹۸ ، $R^2$=۰/۹۹۸۷) 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

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 19:39 +0430 on Sunday May 16th 2021

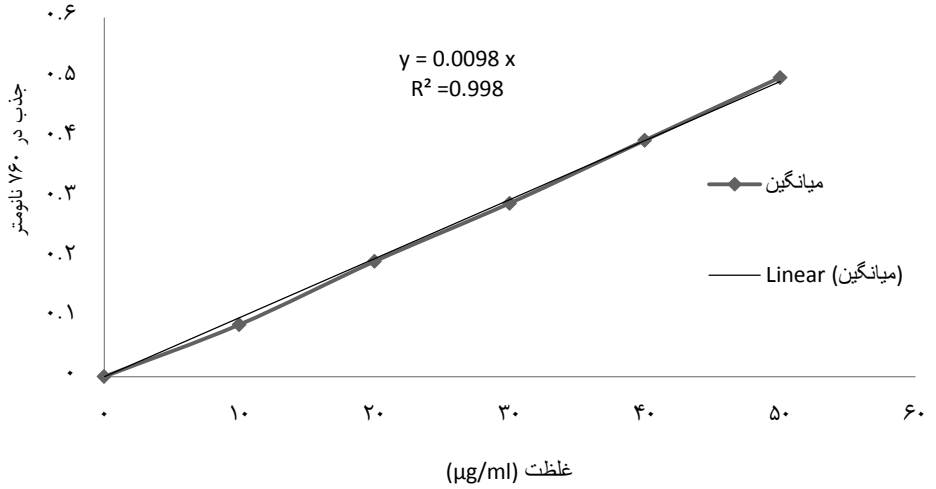
میزان فنول کل اختلاف معنی داری وجود داشت (P<۰/۰۵). بیشترین مقدار فنول کل مربوط به نمونه تغلیظ شده در خشک کن انجمادی به میزان ۲۵۱۷/۰±۰/۷۵ میلی‌گرم گالیک اسید در لیتر، و کمترین مقدار فنول کل مربوط به آب انار طبیعی به میزان ۱۵۴۴/۰±۰/۸۰ میلی‌گرم گالیک اسید در لیتر بود. بررسی بین سه نمونه آب انار طبیعی و نمونه‌های آب انار تغلیظ شده در خشک‌کن انجمادی یا آون تحت 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 کوئرستین مطابق با شکل ۲ اندازه‌گیری شد. بیشترین مقدار کل ترکیبات فلاوونوئیدی ۳۹۰/۰۰±۰/۰۰ میلی‌گرم کوئرستین در لیتر، به نمونه آب انار تغلیظ شده با خشک‌کن انجمادی تعلق داشت. مقدار کل ترکیبات فلاوونوئیدی موجود در نمونه‌های تغلیظ شده، در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معناداری داشت.

**جدول۱.** میزان فنول کل و فلاوونوئید کل درآب انار رقیق شده، و نمونه‌های آب انار تغلیظ شده در آون خلاء و خشک کن انجمادی

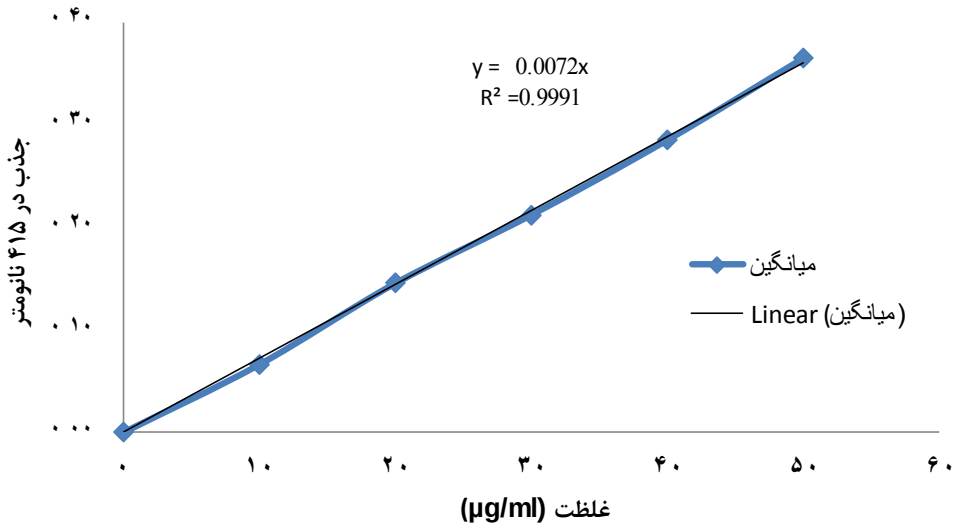
| تیمارها | محتوای فنول کل (میلی گرم گالیک اسید در لیتر) | محتوای فلاوونوئید کل (میلی گرم کوئرستین در لیتر) |
|---|---|---|
| آب انار تغلیظ شده در خشک کن انجمادی | ۲۵۱۷/۰±۰/۷۵ a | ۳۹۰/۰۰±۵۰/۰۰ a |
| آب انار تغلیظ شده در آون خلاء | ۲۲۲۳/۰±۰/۹۸ b | ۳۲۰/۰±۰/۱۳ b |
| آب انار طبیعی | ۱۵۴۴/۰±۰/۸۰ c | ۳۰۰/۰±۰/۹۲ c |

حروف متجانس بیانگر آن است که اختلاف معنی دار دیده نشد (P>۰/۰۵).
حروف نامتجانس مثل a و b یا c در هر ستون، بیانگر اختلاف معنی دار بین نتایج است (P<۰/۰۵).




**شکل۱.** نمودار کالیبراسیون گالیک اسید

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 19:39 +0430 on Sunday May 16th 2021




**شکل۲.** نمودار کالیبراسیون کوئرستین

**ترکیبات پلی فنولی موجود در نمونه‌های رقیق شده (۱درصد) 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<۰/۰۵). ترکیبات پلی فنولی مانند پونیکالین، کاتچین، و پی‌کوماریک بیشترین مقدار را در آب انار تغلیظ شده در خشک‌کن انجمادی داشته و هیدروکسی تیروزول، تیروزول، اسید گالیک، اسید الاژیک، اسید کافئیک و وانیلین بیشترین مقدار را در نمونه آب انار تغلیظ شده در آون خلاء به خود اختصاص دادند. همچنین پونیکالاژین 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.

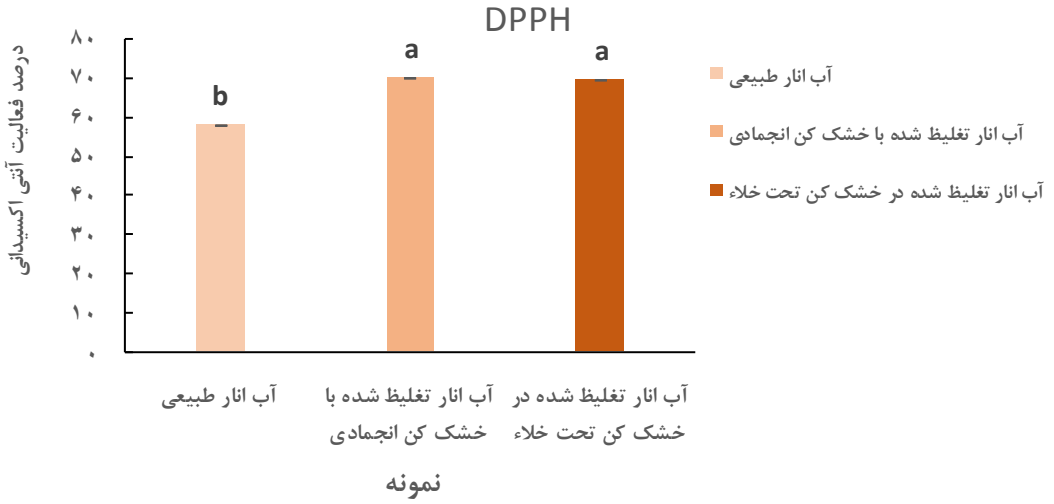
**جدول۲.** ترکیب درصد ترکیبات پلی فنولی موجود در آب انار طبیعی، نمونه‌های آب انار تغلیظ شده در آون خلاء و خشک‌کن انجمادی

| ترکیب پلی فنولی | آب انار طبیعی (٪) | آب انار تغلیظ شده در خشک کن انجمادی (٪) | آب انار تغلیظ شده در آون تحت خلاء (٪) |
|---|---|---|---|
| هیدروکسی تیروزول | ۰/۵±۰/۰۱ c | ۴/۶±۰/۱ b | ۷/۰±۹/۲ a |
| تیروزول | ۲/۷±۰/۲ b | ۱/۸±۰/۱ c | ۵/۳±۰/۱ a |
| گالیک اسید | ۵/۱±۰/۱ b | ۲/۵±۰/۱ c | ۹/۸±۰/۲ a |
| پونیکالین | ۴/۹±۰/۰ b | ۱۰/۸±۰/۱ a | ۱۰/۱±۰/۱ a |
| پونیکالاژین A | ۲۰/۶±۰/۴ a | ۱۰/۳±۰/۰۱ b | ۵/۴±۰/۰۱ c |
| پونیکالاژین B | ۲۷/۹±۰/۵ a | ۱۹/۷±۰/۲ b | ۱۰/۲±۰/۱ c |
| کاتچین | ۱۴/۸±۰/۲ b | ۱۶/۵±۰/۳ a | ۷/۲±۰/۱ c |
| وانیلیک اسید | ۱/۶±۰/۰ b | ۷/۰±۰/۱ a | ۷/۸±۰/۱ a |
| وانیلین | ۲/۸±۰/۰ b | ۲/۲±۰/۱ b | ۹/۴±۰/۱ a |
| پی کوماریک اسید | ۳/۶±۰/۱ b | ۷/۲±۰/۲ a | ۲/۲±۰/۱ c |
| فرولیک اسید | ۲/۳±۰/۱ a | ۰/۸±۰/۰ b | ۰/۷±۰/۰ b |
| الاژیک اسید | ۳/۲±۰/۱ c | ۹/۴±۰/۱ b | ۷/۴±۰/۲ a |
| کوئرستین | ۰/۱±۰/۱ b | ۰/۱±۰/۱ b | ۱/۰±۰/۰ a |
| اپی ژنین | ۰/۱±۰/۰ c | ۱/۸±۰/۰۱ b | ۲/۸±۰/۱ a |
| روتین | ۳/۵±۰/۱ a | ۰/۷±۰/۱ b | ۰/۸±۰/۰ b |
| ناشناخته | ۶/۳±۰/۱ b | ۴/۶±۰/۲ c | ۱۲/۹±۰/۵ a |

حروف متجانس در یک ردیف بیانگر آن است که اختلاف معنی‌دار دیده نشد (P>۰/۰۵).

حروف نامتجانس مثل a و b یا c در یک ردیف بیانگر اختلاف معنی‌دار بین نتایج است (P<۰/۰۵).

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 19:39 +0430 on Sunday May 16th 2021




حروف متجانس بیانگر آن است که اختلاف معنی دار دیده نشد (P>۰/۰۵).
حروف نامتجانس مثل a و b یا c بیانگر اختلاف معنی دار بین نتایج است (P<۰/۰۵).

**شکل۳.** میزان فعالیت آنتی اکسیدانی درآب انارطبیعی، و نمونه‌های آب انارتغلیظ شده در آون خلاء و خشک کن انجمادی

**میزان فعالیت آنتی اکسیدانی:** با توجه به شکل ۳ میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی برای آب انارهای تغلیظ شده در مقایسه با آب انار طبیعی، به طور معناداری افزایش داشته است (P<۰/۰۵). مقدار فعالیت آنتی اکسیدانی در آب انار تغلیظ شده در خشک کن انجمادی (۷۰/۴۴±۰/۴۰ درصد)، بیشترین مقدار فعالیت آنتی اکسیدانی و در آب انار طبیعی (۵۸/۳۳±۰/۰۰ 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 خشک‌کن 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 درمحدوده ۲۵۰۲ میلی‌گرم 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 میلی‌گرم گالیک اسید در لیتر 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 میلی‌گرم گالیک اسید در لیتر و در ارقام خارجی در محدوده ۸۹۵ تا ۱۲۸۴ میلی‌گرم گالیک اسید در لیتر بود (۲۳). این در حالی است که آب انار طبیعی تحت بررسی حاوی ۱۵۴۴/۰±۰/۸۰ میلی‌گرم 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 آنتی‌اکسیدانی آب میوه انار و عصاره پوست آن را در سه نوع مختلف بررسی کردند. آب انار ملس بیشترین آنتی‌اکسیدان را در مقایسه با آب انار ساوه و انار وحشی شمال داشت و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها در محدوده ۳۲±۰/۵۲ تا ۴۸/۳±۰/۱۵ درصد قرار داشت (۲۴). در این پژوهش، فعالیت آنتی‌اکسیدانی اندازه‌گیری شده برای آب انار تغلیظ شده در خشک‌کن انجمادی (۷۰/۴۴±۰/۴۰ درصد) و آب انار طبیعی (۵۸/۳۳±۰/۰۰ 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 ۱۰۰درصد آب انار خالص بدون افزودنی هستند، مورد بررسی

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 19:39 +0430 on Sunday May 16th 2021

قرار گرفت. میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها بین ۱۰/۳۷ تا ۶۷/۴۶ درصد گزارش شد (۲۵). همچنین در بررسی دیگر فعالیت آنتی‌اکسیدانی در هشت رقم آب انار در ایران بین ۱۸/۶ تا ۴۲/۸ 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 (۰/۴۰±۷۰/۴۴ درصد) و آب انار طبیعی کمترین مقدار (۰/۰۰±۵۸/۳۳ 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 ۳۰۷ 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 ۱/۷۶ 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 ۶۳۶ میلی‌گرم کوئرستین در لیتر و کمترین مقدار آن حدود ۱۳۵ میلی‌گرم کوئرستین در لیتر بود (۳۰). مقدار فلاوونوئید کل آب انار طبیعی در این بررسی ۰/۹۲±۳۰۰/۰ میلی‌گرم گالیک اسید در لیتر بود که در محدوده گزارش شده توسط احمدی و همکاران (۲۸) و همچنین آب انار گزارش شده توسط 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 استخراج آب میوه، مدت زمان استخراج آب میوه و نوع فرآیندهای 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 (۰/۰۱ درصد)، پی‌کوماریک اسید (۰/۴۶ درصد)، فرولیک اسید (۰/۱۷ درصد)، گالیک اسید (۰/۰۴ درصد) وکلروژنیک اسید(۰/۸ درصد)، همچنین در آب انار تجاری، کافئیک اسید(۰/۰۸ درصد)، پی‌کوماریک اسید(۰/۳۲ درصد)، فرولیک اسید (۰/۲۱ درصد)، گالیک اسید (۰/۰۸ درصد) وکلروژنیک اسید (۰/۳۸ درصد)، و ترکیبات پلی فنولی موجود در آب انار تغلیظ شده، کافئیک اسید (۰/۷۸ درصد)،پی‌کوماریک اسید (۰/۲۵ درصد)، فرولیک اسید (۰/۴۹ درصد)، گالیک اسید (۰/۳۶ درصد) وکلروژنیک اسید (۰/۱۷ 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، الاژیک 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. Poyrazoglu و همکاران در سال ۲۰۰۲، مقادیر ترکیبات فنولی موجود در آب انار، شامل: گالیک اسید (۴/۵۵)، کاتچین (۳/۷۲)، کلروژنیک اسید (۱/۲۴)، کافئیک اسید (۰/۷۸)، فرولیک اسید (۰/۰۱)، فلوریدزین (۰/۹۹) و کوئرستین (۲/۵۰) را بر حسب میلی گرم در لیتر گزارش کردند (۳۲). در بیشتر پژوهش‌های مربوط به آب انار، مقدار پونیکالاژین گزارش نشده است، این درحالی است که در این پژوهش پونیکالاژین بیشترین مقدار را در آب انار به خود اختصاص داده است. کاهش مقدار پونیکالاژین 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

باشد. همچنین مقادیر سایر ترکیبات پلی‌فنولی 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 تغلیظ‌سازی مهم‌ترین عامل در حفظ و نگه‌داری ترکیبات پلی‌فنولی، فنول کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فلاوونوئید کل در آب انار پوست سیاه ساوه شناخته شد. نتایج نشان داد، که بین آب انار طبیعی، و نمونه‌های آب انار تغلیظ شده (در آون تحت خلاء، و در خشک‌کن انجمادی)، نمونه آب انار تغلیظ شده در خشک‌کن انجمادی دارای بیشترین مقدار فعالیت آنتی‌اکسیدانی، محتوای فنول کل و فلاوونوئید کل در مقایسه با آب انار تغلیظ شده در آون تحت خلاء و آب انار طبیعی بود. همچنین نمونه تغلیظ شده در خشک‌کن 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 آنتی‌اکسیدانی آنها به منظور کاربرد در صنعت غذا پیشنهاد می‌شود."از سوی دیگر، بر اساس نتایج فوق می‌توان نتیجه گرفت که آب انار پوست سیاه ساوه منبع سرشاری از مواد فعال زیستی است که می‌تواند به عنوان نوشیدنی مفیدی برای سلامت انسان در نظر گرفته شود.

## • References


1. Negi PS, JayaprakashaGK, Jena BS. Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. J Food Chem 2003; 80: 393-397.
2. Aloqbi A, Omar U, Yousr 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, VermaN, 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. Identificationand quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MS*n*. 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 ofpomegranate 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.


Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 19:39 +0430 on Sunday May 16th 2021

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 19:39 +0430 on Sunday May 16th 2021

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, Kavoosi 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 M[3]*

*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±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

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 19:39 +0430 on Sunday May 16th 2021