

بررسی و ارزیابی میزان ترکیبات اسیدهای فنولی و پلی فنولیک چند رقم فلفل (Capsicum) annum L با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

نسرين رنجبر^{۱*}، رضا حیدری^۲، رشید جامعی^۳

۱. کارشناسی ارشد سیستماتیک گیاهی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲. دکتری بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۳. دکتری فیزیولوژی گیاهی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۶/۱۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۹/۰۵)

چکیده

مقدمه: فلفل درختچه ای بوته ای متعلق به خانواده *Solanaceae* می باشد که از دیر باز به دلیل اثرات کاهش قند و فشار خون در طب سنتی ایران مورد استفاده قرار گرفته است. مهم ترین ترکیبات فلفل را فنل ها و به ویژه آنتوسیانین ها تشکیل می دهند که دارای خاصیت آنتی اکسیدانی قوی هستند. هدف از این پژوهش بررسی مقایسه ای مقدار ترکیبات فنلی و آنتوسیانینی در عصاره متانولی گیاه فلفل می باشد. گیاه فلفل از اصفهان و ترکیه در سال ۱۳۹۲ جمع آوری و تا زمان سنجش متابولیت های موردنظر در فریزر ۸۰ - درجه ی سانتی گراد نگهداری شد. سپس ترکیبات مورد نظر فلفل با استفاده از متانول اسیدی تهیه و ترکیبات فنلی و خواص آنتی اکسیدانی به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) اندازه گیری شد. بررسی عصاره های متانولی این مناطق نشان داد که بیشترین مقدار ترکیبات فنلی مربوط به کوماریک اسید (۱,۸۹ میلی گرم در میلی گرم عصاره) در فلفل سبز بلند ترکیه مشاهده گردید و بر حسب سیناپتیک اسید مربوط به فلفل های منطقه شهر رضای اصفهان بوده است و همچنین فلفل های اصفهان از فعالیت آنتی اکسیدانی بهتری در مقایسه با ترکیه برخوردار هستند.

کلیدواژگان

ترکیبات فنلی، فلفل (*Capsicum annum L*)، HPLC.



مقدمه

بسیاری از ترکیبات گیاهی از جمله پلی فنل ها دارای خواص آنتی اکسیدانی هستند (۱). ترکیبات پلی فنلی خصوصاً فلاونوئیدها در برابر آسیب های ناشی از سموم و رادیکال های آزاد دارای اثر حفاظتی می باشند (۲). رادیکال های آزاد، اتم یا مولکول های فعالی هستند که به دلیل وضعیت آخرین لایه اتمی آنها میل ترکیبی شدیدی با سایر مولکول های اطراف خود دارند و در صورت عدم جلوگیری از فعالیت ترکیبی آنها می توانند منجر به تخریب بافتی و بروز اختلالاتی نظیر بیماری های قلبی و سرطان شوند (۳). در صورتی که روند تولید رادیکال های آزاد کنترل نشود می توانند برای سلول و در نهایت بافت، بسیار مخرب باشند. آنتی اکسیدان ها ترکیباتی هستند که رادیکال های تولید شده را با مکانیسم های مختلف خنثی می نمایند (۴). هم چنین آنتی اکسیدان ها در مقادیر اندک می توانند غشاهای سلولی و ترکیبات مختلف موجود زنده را در مقابل اکسیدان ها حفظ کنند. در طب سنتی ایران گیاهان زیادی مانند فلفل وجود دارد که در رفع ناراحتی های بدن انسان سفارش شده است (۵). فلفل گیاهی است که دارای ترکیبات آنتی اکسیدانی فراوانی است (۶-۷). از مهم ترین آنها می توان به ویتامین های مانند ریبوفلاوین (B2)، نیاسین (B3)، تیامین (B1) و ویتامین C و A اشاره کرد. هم چنین دیگر ترکیبات آنتی اکسیدانی مانند اسیدهای چرب غیر اشباع، گزانتوتوکسین، کاروتنوئیدها، فلاونوئیدها و اسیدفولیک در فلفل وجود دارد (۸). فلفل از محصولات مهم کشاورزی است که علاوه بر اهمیت اقتصادی یک منبع بسیار خوبی از آنتی اکسیدان هاست که در سلامتی انسان نقش مهمی دارد (۹). مصرف روزانه فلفل به مقدار کافی در رژیم غذایی

برای پیشگیری از گسترش سرطان و بیماری های قلبی و عروقی مفید می باشد (۱۰). ترکیبات فنولی در فلفل، گروهی از بیو مولکول ها هستند که فعالیت های بیولوژیکی عمده ای از خود نشان می دهند. همانند اکثر میوه ها و سبزیجات، فلفل شامل بیو فنول های توزیع شده در گوشت و دانه می باشد. مشخصات کیفی آن ها برای یک رقم ویژه ثابت است (۱۱). ترکیبات فنلی با مهار اکسیداسیون خود به به واسطه ترکیب با یون ها ی C خودی لپیدها، ویتامین سنگین و کاراتنوئیدها از طریق واکنش با اکسیژن تک مولکولی و پرواکسیدها، باعث حذف رادیکال ها می شوند که این مواد خود از ترکیبات مهم فلفل می باشند (۱۲). فلفل زنگوله ای شیرین (نارنجی و زرد) و سبز ریز از شهر رضای اصفهان و فلفل سبز بلند از ترکیه تهیه شدند (۱۳ و ۱۴). نتایج حاصل از HPLC وجود سه ترکیب فنولی در فلفل سبز بلند ترکیه و سه رقم دیگر دو ترکیب فنولی را نشان دادند (۱۵). که این ترکیبات، پاداکساینده های عمده ای هستند که خطر بیماری ها را کاهش می دهند (۱۶). هدف از این مطالعه سنجش و بررسی میزان ترکیبات فنولی چند رقم فلفل در سه رنگ مختلف (زرد، نارنجی و سبز) با استفاده از آنالیز ترکیبات فنولی فلفل توسط دستگاه HPLC بود.

مواد و روش ها

عصاره گیری برای آنالیز ترکیب های فنولی توسط دستگاه (HPLC) کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

5CC متانول گرید HPLC با 5CC آب گرید HPLC مخلوط کرده، سپس 8 CC از محلول آماده شده را با 2CC اسید کلریدریک ۱،۲ مولار مخلوط کرده و ۰،۵ گرم فلفل تر به آن اضافه کرده و سپس به مدت ۱ ساعت در دمای ۸۰ درجه قرار داده شد. بعد از حرارت دادن ، 10 CC متانول گرید HPLC به آن اضافه کرده



ذرات پایه ۵ میکرومتر بود. آشکار ساز استفاده شده UV با طول موج ۲۵۴ نانومتر و حجم هر بار تزریق برابر ۲۰ میکرولیتر بود. دمای اتاق برای انجام آزمایش ۲۵ درجه سانتی گراد در نظر گرفته شد. هم چنین از نرم افزار Chrom Gate برای آنالیز استفاده شد.

روش کار

ابتدا برای اندازه گیری کمی، ۰/۱ میلی گرم از هر یک از استانداردها در یک میلی لیتر از متانول مخصوص HPLC حل گردید و غلظت‌های ۰،۱، ۰،۰۶، ۰،۰۴، ۰،۰۲، ۰،۰۵ میلی گرم در میلی لیتر از آن‌ها تهیه شد و هر یک سه بار به دستگاه بارگذاری گردید. سپس عصاره تهیه شده به منظور شناسایی و تعیین ترکیبات فنولی در دستگاه بارگذاری گردید و به منظور آنالیز کمی کروماتوگرام حاصل از بارگذاری هر نمونه با کروماتوگرام‌های بدست آمده از بارگذاری استانداردهای مربوطه مقایسه و در نهایت غلظت این ترکیبات برحسب میلی گرم بر گرم عصاره محاسبه شد (جدول ۱).

و به مدت ۵ دقیقه با دور ۴۰۰۰ سانتریفیوژ کرده و محلول صاف شده برای آنالیز HPLC استفاده گردید (۱۷).

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)

روش کروماتوگرافی مورد استفاده جهت جداسازی و تعیین مقدار فنول‌های موجود در گیاه فلفل، روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) است در بین روش‌های گوناگون آنالیز فنول‌ها، روش آشکارساز ماوراء بنفش بیشتر مورد توجه قرار می‌گیرد، چون این روش هم‌گزینهش پذیری مناسب و هم حساسیت خوبی دارد. فنول‌هایی که در این تحقیق اندازه گیری شدند، کوماریک اسید، فرولیک اسید و سیناپیک اسید بودند.

مشخصات دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

برای آنالیز از دستگاه HPLC مدل KNUER استفاده شد. Flow rate برابر ۰/۵ میلی لیتر در دقیقه و ترکیب فاز متحرک به کار برده شده استونیتریل، آب و اسید استیک ۲% بود. نوع ماده پرکننده C₁₈ reversed phase طول ستون ۲۵ سانتی متر و اندازه

جدول ۱- ترکیبات فنولی موجود در چهار رقم فلفل (*Capsicum annum L.*). ترکیبات براساس میانگین سه تکرار میکروگرم برگرم وزن تر می باشد

ردیف	اسیدهای فنولی	فلفل نارنجی دلمه‌ای شیرین	فلفل سبز بلند ترکیه	فلفل سبز ریز اصفهان	فلفل زرد دلمه‌ای شیرین اصفهان
۱	Ascorbic acid				
۲	Gallic acid				
۳	Rutin				
۴	Caffeic acid				
۵	P-hydroxy benzoic acid				
۶	Vanilic acid				
۷	P-coumaric acid	107803	1897078	51450	
۸	Syrinjic acid				
۹	Ferolic acid		908606		32543
۱۰	Sinapic acid	107305	8727	278149	203048



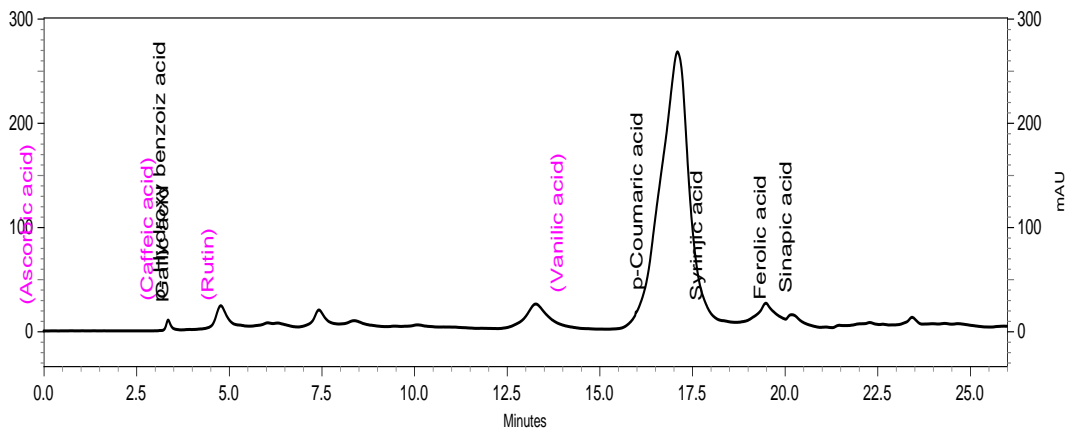
تشخیص بود. ترکیب های فنولی در ارقام فلفل اصفهان و ترکیه از نظر مقدار متفاوت است اما از نظر نوع ترکیبات فنلی تقریباً یکسان هستند در هر دو رقم اصفهان و ترکیه ترکیبات فنلی پاراکوماریک اسید؛ سیناپیک اسید و فرولیک اسید را دارا می باشند. اما در رقم ترکیه بیشترین ترکیب فنولی کوماریک اسید (۱,۸۹ میلی گرم بر گرم عصاره) و در فلفل های اصفهان میزان سیناپیک اسید به میزان بیشتری مشاهده گردید. این میزان ها به ترتیب برای فلفل زرد دلمه ای، سبز ریز و نارنجی دلمه ایی (0.27,0.2 و 0.107 میلی گرم بر گرم عصاره) در جدول ۱ نشان داده شده است.

تجزیه و تحلیل آماری

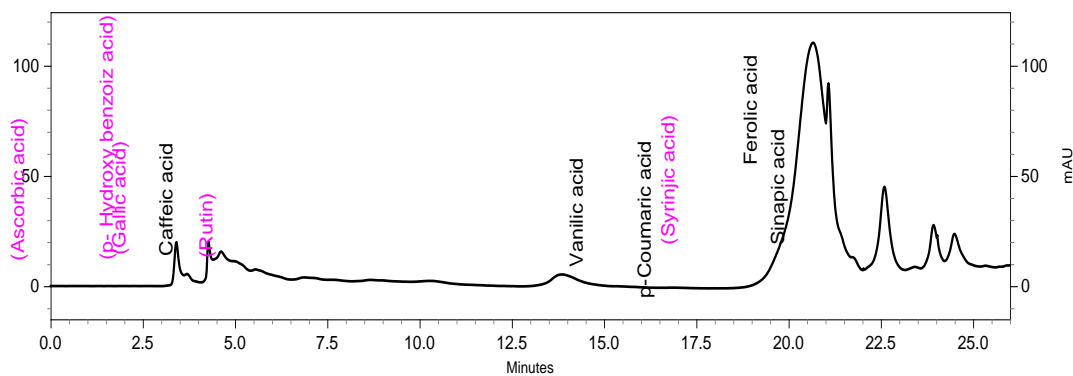
تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نمودارهای بدست آمده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا انجام گرفته است.

نتایج ترکیب های فنولی

با بررسی های انجام گرفته در این مطالعه مشاهده شد که گیاه فلفل دارای سه اسید فنولی کوماریک اسید، سیناپیک اسید و فنولیک اسید در میان ۱۰ اسید مختلف اندازه گیری شده در جدول ۱ می باشد، و میزان گالیک اسید، کافئیک اسید، هیدروکسی بنزوئیک اسید، وانیلیک اسید، سینرژیک اسید و آسکوربیک اسید و روتین در این ارقام فلفل زیر حد

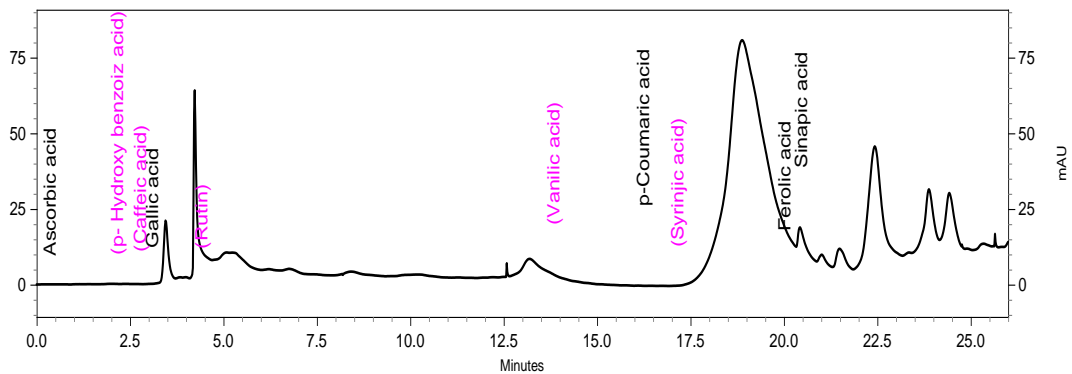


شکل ۱- Narenji

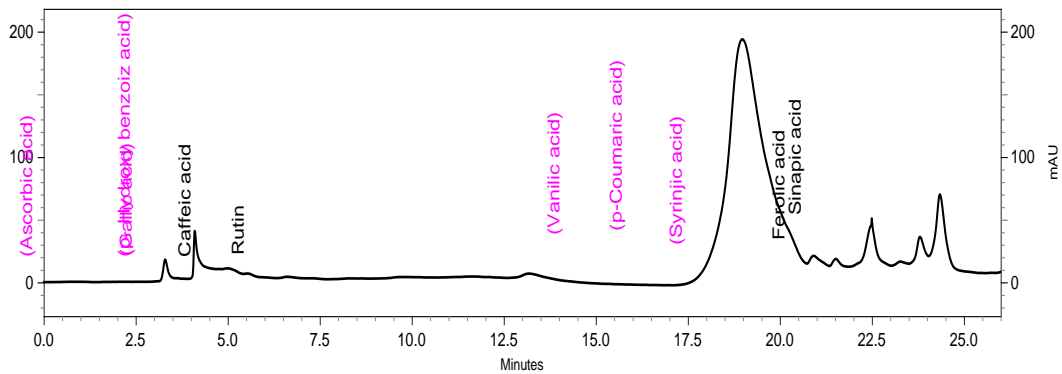


شکل ۲- Sabz turkey





شکل ۳- Sabz shahrreza



شکل ۴- Zard

به کار رفته است که از میان این روش ها HPLC کاربرد بیشتری نسبت به دو روش دیگر دارد. در مطالعات انجام شده از روش های مختلف استخراج و نیز شرایط دستگاهی متفاوت جهت جداسازی و تعیین ترکیبات فنولی استفاده شده است. ولی آنچه در میان تمامی روش های HPLC به چشم می خورد استفاده از استاندارد و تعیین مقدار بسیار ترکیبات فنولی با استفاده از منحنی کالیبراسیون این ماده و زمان بازداری نسبی آن ها براساس این ترکیب است (۱۹). نتایج حاصل از این آزمایش بیانگر وجود اختلاف معنی دار بین رقم ها از نظر ترکیبات فنولی اندازه گیری شده توسط HPLC می باشد. وجود تفاوت در ترکیبات فنولی بیان کننده تاثیر نقش ژنتیک در سنتز ترکیبات فنولی است که با نتایج به دست آمده توسط Materska و همکاران مطابقت

بحث حاصل از HPLC

گیاهان حاوی ترکیبات متعددی هستند که ساختارهای متفاوتی دارند. استخراج این ترکیبات به عوامل متعددی بستگی دارد که مهم ترین آن ها حلال و روش استخراج می باشند. انتخاب حلال و روش استخراج بستگی به قسمت های مختلف یک گیاه و نیز مواد متشکله آن دارد. بسیار مشکل خواهد بود که برای هر دسته از ترکیبات گیاهی حلال مخصوصی انتخاب شود زیرا همراه با این ترکیبات، مواد دیگری نیز وجود دارد که بر روی درجه حلالیت این مواد تاثیر گذار می باشند (۱۸). روش های گوناگونی شامل (Micellar electro kinetic Chromatography) MEKC و HPLC-UV-MS برای تعیین ترکیبات فنولی در گیاه توسط محققین مختلف



از قبیل وانیلیک، کافئیک، فرولیک و کوماریک اسید را در بادام شناسایی کرده‌اند (۱۳). با بررسی هایی که Ghasemnezhad و همکاران (۲۰۱۱) بر روی فعالیت‌های آنتی اکسیدانی عصاره های متانولی چند رقم فلفل انجام دادند، گزارش کردند که بین فعالیت آنتی اکسیدانی و میزان ترکیب های فنولی رابطه مثبتی وجود دارد. که با نتایج مشاهده شده در این تحقیق هماهنگی خوبی نشان می دهد (۲۵). هم چنین مقدار ترکیبات فنولی عصاره های حاصل از واریته های مختلف را می توان به تفاوت در نوع ترکیبات فنولی دو واریته، درجه پلیمریزاسیون آن ها، حلالیت فنول ها و واکنش آن ها با دیگر اجزای موجود در ماتریکس غذایی نسبت داد (۲۶).

سپاسگزاری

بدین وسیله از گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه ارومیه برای تأمین هزینه های انجام این طرح تشکر می گردد.

داشت (۲۰). Fernandez-Pachon و همکاران (۲۰۰۶) نشان دادند که ترکیب های فنولی از توانایی جاروب کردن رادیکالهای آزاد از قبیل گونه های فعال اکسیژن برخوردارند که این توانایی توسط قابلیت آنها به عنوان عوامل دهنده ی هیدروژن. یا الکترون شکل گرفته است (۲۱). مطالعات HPLC انجام شده روی ترکیبات فنولی گوشت و پوست ارقام مختلف سیب توسط Khanizadeh و همکاران (۲۰۰۷) نشان دهنده وجود تفاوت هایی در میزان تجمع ترکیبات فنولی در بخش های مختلف میوه بود (۲۲). عوامل متعددی مقدار ترکیبات فنولی موجود در بافت های گیاهی را تحت تاثیر قرار می دهند که از آن جمله می توان به فاکتورهای ژنتیکی، میزان تابش نور خورشید، شرایط خاک، درجه رسیدگی در زمان برداشت، شرایط محیطی و آب و هوایی، عملیات پس از برداشت، مقدار و شرایط نگهداری اشاره کرد (۲۳). مقادیر گزارش شده ترکیبات فنولی کل و تانن عصاره متانولی میوه بلوط ۰/۲۲۳ و ۰/۲۰۴ میلی گرم اسید گالیک در میلی گرم عصاره بود(۲۴). Amarowicz و همکاران (۲۰۰۵) با استفاده از تکنیک HPLC ترکیبات فنولی



منابع و مأخذ

1. Chen J, Zhu Z, Hu T, Zhu Y. Structure activity relationship of natural flavonoids in hydroxyl radical scavenging effects. *Acta Pharmacol Sin* 2002; 23: 667-72.
2. Bruck R, Shirin H, Aeed H, Matas Z. Prevention of hepatic cirrhosis in rats by hydroxyl radical scavengers. *J Hepatol* 2001; 35: 457-64.
3. Carreon J, Iimenez G, Vega J. Genotoxic and antigenotoxic properties of *Calendula officinalis* extract in rat liver cell cultures treated with diethyl nitrosamin. *Toxicol in Vitro* 2002; 16: 235-58.
4. Delattre J, Rousselot D. Oxidative stress free radicals and aging. *Biotech Lab Int.* 1998; 5: 21-3.
5. Yesilada E, Küpeli E. *Berberis crataegina* DC root exhibits potent anti-inflammatory, analgesic and febrifuge effects in mice and rats. *J Ethnopharmacol* 2002; 79(2): 237-48.
6. Wollenweber E, Dorr M, Rustayan A. *Dorema auchri*, the first umbelliferous plant found to produce exudates flavonoids. *Phytochem* 1995; 38: 1417-27.
7. Yanardag R, Bolkent S, Tabakoglu-Oguz A, Ozsoy-Sacan O. Effects of (*Petroselinum crispum*) extract on pancreatic B cells and blood glucose of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biol Pharm Bull* 2003; 26:1206-10.
8. Eidi A, Eidi M, Badiei L. Antinociceptive effects of ethanolic extract of parsley (*Petroselinum crispum* L.) leaves in Mice 3 2009; 19(3): 181-18.
9. Thomas SCLI. *Vegetables and fruits: nutritional and therapeutic values*, 2008.
10. Howard L, Talcott S, Brenes C, Villalon B. Changes in phytochemical and antioxidant activity of selected pepper cultivars (*Capsicum* species) as influenced by maturity. *Journal of Agricultural of Food Chemistry* 2000; 48: 1713-20.
11. Bramley P. Is lycopene beneficial to human health?. *Phytochemistry* 2000; 54: 233-6.
12. Namiki M. Antioxidants/antimutagens in food. *CRC Critical Eviews in Food Science and Nutrition* 1990; 29: 273-300.
13. Materska M, Perucka I, 2005. Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (*Capsicum annuum* L), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5): 1750-6.
14. Gambacorta G, Faccia M, Pati S, Lamacchia C, Baiano A, La Note E, 2007. Changes in the chemical and sensorial profile of extra virgin olive oils flavored with herbs and spices during storage, *Journal of Food Lipids*, 14: 202-215.
15. Sim KH, Sil HY, 2008, Antioxidant activities of red pepper (*Capsicum annuum* L.) pericarp and seed extracts, *Journal of Food Science and Technology*, 43: 1813-1823.
16. Stoilova I, Krastanov A, Stoyanova A, Denev P, Gargova S, 2007, Antioxidant activity of ginger extract (*Zingiberofficinale*), *Journal of Food Ch.*
17. Haruenkit, R., Poovarodom, S., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Sajewicz, M., Kowalska, T., Delgado-Licon, E., Rocha-Guzma'n, N.E., Gallegos-.
18. Infante, J.A., Trakhtenberg, S. and Gorinstein, S., 2007. Health properties and nutritional value of durian (*Durio zibethinus* cv Mon Thong): experiments in vitro and in vivo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 5842-5849. *emistry*, 102: 764-70.
19. Samsam shariat SH. *Extraction of effective components of herbal medicine, determination and evaluation methods*, Mani Press. Esfahan. Iran. 1371, pp: 12 -30.
20. Grill, Charles M., Larry Miller, and Tony Q. Yan. "Resolution of a racemic pharmaceutical intermediate: A comparison of preparative HPLC, steady state (2004): 101-108.



21. Materska, Malgorzata, and Irena Perucka. "Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (*Capsicum annum* L.)." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53.5 (2005): 1750-1756.
22. Fernandez-Pachon, M.S., Villano, D., Troncoso, A.M and Garcya-Parrilla, M.C., 2006. Determination of the phenolic composition of sherry and table white wines by liquid chromatography and their relation with antioxidant activity. *Analytica Chimica Acta* 563: 101-108.
23. Khanizadeh, Shahrokh, et al. "Phenolic composition and antioxidant activity of selected apple genotypes." *Journal of Food Agriculture and Environment* 5.1 (2007): 61.
24. Bajpai, Monika, et al. "Phenolic contents and antioxidant activity of some food and medicinal plants." *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 56.4 (2005): 287-291.
25. Barrera-García, V. Daniela, et al. "Different sorption behaviors for wine polyphenols in contact with oak wood." *Journal of agricultural and food chemistry* 55.17 (2007): 7021-7027.
26. Ghasemnezhad, Mahmood, Mohamad Sherafati, and Gholam Ali Payvast. "Variation in phenolic compounds, ascorbic acid and antioxidant activity of five coloured bell pepper (*Capsicum annum*) fruits at two different harvest times." *Journal of functional foods* 3.1 (2011): 44-49.
27. Mattila, Pirjo, and Jorma Kumpulainen. "Determination of free and total phenolic acids in plant-derived foods by HPLC with diode-array detection." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50.13 (2002): 3660-3667.

