بررسي و ارزيابی ميزان ترکيبات اسيدهای فنولی و پلي فنوليک چند رقم فلفلCapsicum) annuum L) با روش کروماتوگرافي مايع با کارايي بالا

نسرين رنجبر [۱]؛ رضا حيدری[۲]؛ رشيد جامعی[۳]
[1]دانشگاه ارومیه کارشناسی ارشد سیستماتیک گیاهی، دانشکده علوم پایه ، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. نویسنده مسول
[۲] دکترا بیوشیمی ، دانشکده علوم پایه ، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
[۳] دکترا فیزیولوژی گیاهی، دانشکده علوم پایه ، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

چکیده

مقدمه: فلفل درختچه اي بوته ای متعلق به خانواده *Solanaceae* مي باشد که از دير باز به دليل اثرات کاهش قند و فشار خون در طب سنتي ايران مورد استفاده قرار گرفته است . مهم ترين ترکيبات فلفل را فنل ها و به ويژه آنتوسيانين ها تشکيل مي دهند که داراي خاصيت آنتي اکسيداني قوي هستند. هدف از اين پژوهش بررسي مقايسه اي مقدار ترکيبات فنلي و آنتوسيانيني در عصاره متانولي گياه فلفل مي باشد.گياه فلفل از اصفهان و ترکيه در سال ۱۳۹۲ جمع آوري و تا زمان سنجش متابوليت هاي موردنظر در فريزر ۸۰ - درجه ي سانتي گراد نگهداري شد. سپس ترکيبات مورد نظر فلفل با استفاده از متانول اسيدي تهيه و ترکيبات فنلي و خواص آنتي اکسيداني به روش کروماتوگرافي مايع با کارايي بالا(HPLC) اندازه گيري شد. بررسي عصاره هاي متانولي اين مناطق نشان داد که بيشترين مقدار ترکيبات فنلي مربوط به کوماريک اسيد (۱,۸۹ ميلي گرم در ميلی گرم عصاره) در فلفل سبز بلند ترکيه مشاهده گرديد و بر حسب سيناپتيک اسيد مربوط به فلفل هاي منطقه شهر رضای اصفهان بوده است و همچنين فلفل هاي اصفهان از فعاليت آنتي اکسيداني بهتري در مقايسه با ترکيه برخوردار هستند .

کليد واژگان: ترکيبات فنلی ، فلفل(Capsicum annuum L) ، HPLC

مقدمه

بسياري از تركيبات گياهي از جمله پلي فنل ها داراي خواص آنتي اكسيداني هستند (۱). تركيبات پلي فنلي خصوصاً فلاونوئيدها در برابر آسيب هاي ناشي از سموم و راديكال هاي آزاد داراي اثر حفاظتي مي باشند(۲). راديكال هاي آزاد، اتم يا مولكول هاي فعالي هستند كه به دليل وضعيت آخرين لاية اتمي آنها ميل تركيبي شديدي با ساير مولكول هاي اطراف خود دارند و در صورت عدم جلوگيري از فعاليت تركيبي آنها مي توانند منجر به تخريب بافتي و بروز اختلالاتي نظير بيماري هاي قلبي و سرطان شوند(۳). در صورتي كه روند توليد راديكال هاي آزاد كنترل نشود مي توانند براي سلول و در نهايت بافت، بسيار مخرب باشند. آنتي اكسيدان ها تركيباتي هستند كه راديكال هاي توليدشده را با مكانيسم های مختلف خنثي مي نمايند(۴). هم چنين آنتي اكسيدان ها در مقادير اندک مي توانند غشاهاي سلولي و تركيبات مختلف موجود زنده را در مقابل اكسيدان ها حفظ كنند. درطب سنتي ايران گياهان ز يادي مانند فلفل وجود دارد كه در رفع ناراحتي هاي بدن انسان سفارش شده است (۵). فلفل گياهي است كه داراي تركيبات آنتي اكسيداني فراواني است(۶-۷) . از مهم ترين آنها مي توان به و يتامين هايی مانند ريبوفلاوين(B2)، نياسين(B3)، تيامين(B1) ويتامينC و A اشاره كرد. هم چنين ديگر تركيبات آنتی اكسيدانی مانند اسيدهاي چرب غير اشباع ، گزانتوتوكسين، كاروتنوئيدها، فلاونوئيدها و اسيدفوليک در فلفل وجود دارد (۸). فلفل ازمحصولات مهم كشاورزي است كه علاوه بر اهميت اقتصادي يک منبع بسيار خوبي از آنتي اكسيدان هاست كه در سلامتي انسان نقش مهمي دارد(۹). مصرف روزانه فلفل به مقدار كافي در رژ يم غذايي براي پيشگيري از گسترش سرطان و بيماري ها ي قلبي و عروقي مفيد مي باشد(۱۰). تركيبات فنولی در فلفل، گروهی از بيو مولكول ها هستند كه فعاليت هاي بيولوژيکی عمده اي از خود نشان ميدهند. همانند اكثر ميوه ها و سبزيجات، فلفل شامل بيو فنول هاي توزيع شده در گوشت و دانه ميباشد. مشخصات كيفی

آن ها براي يک رقم ويژه ثابت است(۱۱). ترکيبات فنلي با مهار اکسيداسيون خود به به واسطه ترکيب با يون ها ي C خودي ليپيدها، ويتامين سنگين و کاراتنوئيدها از طر يق واکنش با اکسيژن تک مولکولي و پرواکسيدها، باعث حذف راديکال ها مي شوند که اين مواد خود از ترکيبات مهم فلفل مي باشند(۱۲). فلفل زنگوله ای شیرین(نارنجی و زرد) و سبز ریز از شهر رضای اصفهان و فلفل سبز بلند از ترکیه تهیه شدند(۱۳و۱۴). 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 روشها

عصاره گيري براي آناليز ترکيب هاي فنولي توسط دستگاه (HPLC) کروماتوگرافي مايع با کارايي بالا

5CC متانول گرید HPLC با 5CCآب گرید HPLC مخلوط کرده، سپس 8 CC از محلول آماده شده را با 2CCاسید کلریدریك ۱,۲ مولار مخلوط کرده و ۰,۵ گرم فلفل تر به آن اضافه کرده و سپس به مدت ۱ ساعت در دماي ۸۰ درجه قرار داده شد. بعد از حرارت دادن , 10 CC متانول گریدHPLC به آن اضافه کرده و به مدت ۵ دقیقه با دور ۴۰۰۰ سانتریفیوژ کرده و محلول صاف شده برای آنالیز HPLC استفاده گردید (۱۷).

کروماتوگرافي مايع با کارايي بالا(HPLC)

روش کروماتوگرافي مورد استفاده جهت جداسازي وتعيين مقدار فنول هاي موجود در گياه فلفل، روش کروماتوگرافي مايع با کارايي بالا(HPLC) است در بين روشهاي گوناگون آناليز فنول ها، روش آشکارساز ماوراء بنفش بيشتر مورد توجه قرار مي گيرد ، چون اين روش هم گزينش پذيري مناسب و هم حساسيت خوبي دارد. فنول هايي که در اين تحقيق اندازه گيري شدند، کوماريک اسيد ، فروليک اسيد و سيناپيک اسيد بودند.

مشخصات دستگاه کروماتوگرافي مايع با کارايي 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 C_{18} reversed phase و طول ستون ۲۵ سانتی متر و اندازه 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 انالیز 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 غلظت های ۰,۰۰۵,۰,۰۰۲,۰,۰۰۴,۰,۰۰۶و ۰,۱ میلی گرم در میلی لیتر از آن ها تهییه شد و هر یک سه بار به دستگاه بارکذاری 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 کروماتوگرام های بدست آمده از بارگذاری استانداردهای مربوطه مقایسه و در نهایت غلظت این ترکیبات برحسب میلی گرم بر گرم عصاره محاسبه شد (جدول۱).

تجزيه و تحليل آماري

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

نتايج تركيب هاي فنولي

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 آسکوربیک اسید و روتین در این ارقام فلفل زیر حد تشخیص بود . تركيب هاي فنولي درارقام فلفل اصفهان و تركيه از نظر مقدار متفاوت است اما از نظر نوع تركيبات فنلی تقريبا يكسان هستند در هر دو رقم اصفهان و تركيه تركيبات فنلی پارا كوماريک اسيد ؛ سيناپيک اسيد و فروليک اسيد را دارا می باشند .اما در رقم تركيه بيشترين تركيب فنولي كوماريک اسيد (۱,۸۹ ميلي گرم بر گرم عصاره) و در فلفل های اصفهان ميزان سيناپيک اسيد به ميزان بيشتری مشاهده گرديد . اين ميزان ها به ترتيب برای فلفل زرد دلمه ای , سبز ريز و نارنجی دلمه ايی (0.27,0.2 و 0.107 ميلي گرم بر گرم عصاره) در جدول ۱ نشان داده شده است.

بحث حاصل ازHPLC

گياهان حاوي تركيبات متعددي هستند كه ساختارهاي متفاوتي دارند. استخراج اين تركيبات به عوامل متعددي بستگي دارد كه مهم ترين آن ها حلال و روش استخراج مي باشند. انتخاب حلال و روش استخراج بستگي به قسمت هاي مختلف يك گياه و نيز مواد متشكله آن دارد. بسيار مشكل خواهد بود كه براي هر دسته از تركيبات گياهي حلال مخصوصي انتخاب شود زيرا همراه با اين تركيبات، مواد ديگري نيز وجود دارد كه بر روي درجه حلاليت اين مواد تاثير گذار مي باشند (۱۸).روش های گوناگونی شامل(MEKC (Micellar electro kinetic Chromatography

و HPLC-UV-MS برای تعیین ترکیبات فنولی در گیاه توسط محققین مختلف 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 ان 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 داشت (۲۰).Fernandez-Pachon و همکاران (۲۰۰۶) نشان دادند که ترکیب هاي فنولي از توانايي جاروب کردن راديکالهاي آزاد از قبيل گونه هاي فعال اکسيژن برخوردارند که اين توانايي توسط قابليت آنها به عنوان عوامل دهنده ي هيدروژن . يا 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 وهمکاران (۲۰۰۵) با استفاده از تکنیک HPLC ترکیبات فنولی .از قبیل وانیلیک، کافئیک، فرولیک و کوماریک اسید را در بادام شناسایی کرده‌اند (۱۳). با بررسي هايي که Ghasemnezhad و همکاران (۲۰۱۱) بر روي فعاليت هاي آنتي اکسيداني عصاره هاي متانولي چند رقم فلفل انجام دادند، گزارش کردند که بين فعاليت آنتي اکسيداني و ميزان ترکيب هاي فنولي رابطه مثبتي وجود دارد. که با نتايج مشاهده شده در اين تحقيق هماهنگي خوبي نشان مي 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).

سپاسگزاري

بدين وسيله از گروه زيست شناسي دانشکده علوم دانشگاه ارومیه براي تأمين هزينه هاي انجام اين طرح تشکر می گردد.

منابع مورد استفاده

1.Chen J, Zhu Z, Hu T, Zhu Y. Structure activity relationship of natural flavonoids in hydroxyl radicalscavenging 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 ratliver cell cultures tread with diethy initrosamin. 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 exhibitspotent 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-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.

18.Samsam shariat SH. Extraction of effective components of herbal medicine, determination and evaluation methods, Mani Press. Esfahan. Iran. 1371, pp: 12 - 30

19.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.

20. Materska, Malgorzata, and Irena Perucka. "Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (Capsicum annuum L.)." Journal of Agricultural and Food Chemistry 53.5 (2005): 1750-1756

21. 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

22. Khanizadeh, Shahrokh, et al. "Phenolic composition and antioxidant activity of selected apple genotypes." Journal of Food Agriculture and Environment 5.1 (2007): 61.

23.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.

24. 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.

25.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.

26.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.