

## ارزیابی فعالیت ضد میکروبی و ضد رادیکالی عصاره متانولی دو واریته بلوط و تعیین نوع ترکیبات فنولی با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

مریم قادری قهفرخی<sup>۱\*</sup> - علیرضا صادقی ماهونک<sup>۲</sup> - مهران اعلمی<sup>۳</sup> - مرتضی خمیری<sup>۴</sup> - راحیل رضائی<sup>۵</sup>

تاریخ دریافت: ۸۹/۹/۸

تاریخ پذیرش: ۹۰/۵/۳

### چکیده

در این پژوهش میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی و فعالیت ضد رادیکالی و ضد میکروبی عصاره متانولی میوه دو واریته بلوط ایرانی به نام- های *Quercus.branti var persica* و *Quercus.castaneifolia var castaneifolia* مورد بررسی قرار گرفت. مقدار ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و بازدهی استخراج عصاره متانولی واریته کاستانیفولیا (MC) به طور معنی‌داری بیشتر از واریته پرسیکا (MP) بود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با آزمون مهار رادیکال‌های آزاد DPPH مورد بررسی قرار گرفت و با آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی BHA و BHT مقایسه شد. مقادیر EC<sub>50</sub> برای MC، MP، BHA و BHT به ترتیب ۴۲/۸۴، ۷۰/۴۰، ۸۹/۴۶ و ۴۱/۷۳ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. عصاره‌ها فعالیت ضد میکروبی قابل ملاحظه‌ای در مقابل تمامی باکتری‌های مورد بررسی نشان دادند و تاثیر عصاره‌ها بر باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی بود. حداقل غلظت بازدارندگی عصاره‌های MP و MC به ترتیب از ۵-۱/۲۵ و ۵-۰/۳۱۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر متغیر بود. از نظر کمترین غلظت مهار کنندگی، برای باکتری‌های سالمونلا تیفی و شیگلا دیسانتری اختلافی بین دو عصاره مشاهده نشد، اما یرسینیا انتروکولیتیکا و اشرشیاکلی در غلظت‌های پائین- تری از عصاره MC مهار شدند. به استثنای سیتروباکتر فروندی، عصاره MP در غلظت ۵ mg/ml روی تمام باکتری‌های گرم منفی اثر بازدارندگی داشت. بیشترین اثر باکتری‌کشی عصاره MC مربوط به باسیلوس سرئوس (MBC=۰/۳۱۲ mg/ml) بود در حالی که شیگلا دیسانتری بیشترین میزان MBC (۱۰ mg/ml) را دارا بود. شناسایی ترکیبات فنولی عصاره‌ها با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا حاکی از وجود اسیدهای گالیک، کلروژنیک، کافئیک و p- کوماریک در عصاره‌ی MC و اسیدهای گالیک، کلروژنیک و کافئیک و سیرینجیک در عصاره‌ی MP بود.

**واژه‌های کلیدی:** ترکیبات فنولی، عصاره متانولی، فعالیت ضد میکروبی، اسید گالیک، میوه بلوط

### مقدمه

عملکردهای مفید آنتی‌اکسیدان‌ها به شمار می‌آیند ( Moure et al, 2001). کاربرد آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی نظیر بوتیلات هیدروکسی آیزول (BHA)، بوتیلات هیدروکسی تولوئن (BHT) و پروپیل گالات در حین فرآوری مواد غذایی منجر به بروز آثار جانبی نامطلوبی می‌گردد که از آن جمله می‌توان به سرطان زائی و بزرگ شدن کبد اشاره کرد. در نتیجه این محدودیت‌ها امروزه یافتن آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی که قادر به مهار واکنش‌های زنجیری رادیکال‌های آزاد، کند کردن روند تند شدن اکسیداتیو روغن‌ها و محافظت از بدن انسان در مقابل بیماری‌ها می‌گردند، از اهمیت زیادی برخوردار است (Ebrahimabadi et al, 2010).

آلودگی میکروبی یکی دیگر از مشکلاتی است که صنایع غذایی، آشامیدنی، آرایشی و دارویی با آن رو به رو می‌باشند. یکی از نگرانی-

آنتی‌اکسیدان‌ها نقش مهمی در مهار رادیکال‌های آزاد و شکستن واکنش‌های زنجیری اکسیداسیون دارند. مهار واکنش‌های اکسیداسیون در مواد غذایی، دارویی، آرایشی و بهداشتی و جلوگیری از بروز بیماری‌های مرتبط به استرس‌های اکسیداتیو، برخی از

۵۰۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

(\*-نویسنده مسئول: Email: mghaderi\_gh@yahoo.com)

۳۰۲- استادیاران دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

۴- دانشیار دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

مواد غذایی صورت گرفته است. از آنجائی که بیشتر بررسی‌های انجام شده در این زمینه روی برگ، پوسته داخلی و پوسته تنه درخت بلوط صورت گرفته، لذا هدف از این تحقیق، بررسی خواص ضد رادیکالی، ضد میکروبی و تعیین ترکیبات فنولی عصاره متانولی میوه دو وارپته بلوط ایرانی می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

### تهیه عصاره

در این تحقیق از میوه‌ی بلوط دو وارپته‌ی بلوط استفاده شد. وارپته‌ی *Quercus.branti var persica* از جنگل‌های بلوط استان چهارمحال و بختیاری و وارپته‌ی *castaneifolia var castaneifolia* از جنگل قرق واقع در شرق شهرستان گرگان جمع‌آوری گردیدند. پس از خشک کردن میوه‌ها در دمای محیط و جدا کردن پوست‌های چوبی و داخلی، توسط آسیاب چکشی (ایران خودساز) به صورت آرد (تا مش ۶۰) در آمدند. جهت تهیه عصاره فنولی از حلال متانول ۸۰٪ (حجمی: حجمی) استفاده شد. ۱۰۰ میلی‌لیتر حلال به ۱۰ گرم پودرافزوده و مخلوط حاصله به مدت ۴ ساعت در دمای محیط با همزن مغناطیسی هم زده شد. پس از این مرحله، بخش جامد به وسیله کاغذ صافی معمولی جدا گردید و عمل استخراج با حلال تازه مانند قبل تکرار گردید. عصاره‌های حاصل از دو مرحله با یکدیگر ادغام گردیدند و به وسیله تبخیر کننده چرخان (مدل Laborata4000، ساخت کمپانی هایدولف) در دمای ۴۰°C تغلیظ و در نهایت عصاره‌ها توسط خشک‌کن انجمادی (Operun- FDB550) ساخت کره جنوبی) در دمای ۵۰°C- به پودر تبدیل شدند و تا زمان استفاده در ظروف غیر قابل نفوذ به هوا در فریزر ۱۸°C- قرار گرفتند (Liu & Yao, 2007). جهت سهولت در بیان نتایج، عصاره متانولی وارپته کاستانیفولیا و پرسیکا به ترتیب با علائم MC و MP بیان می‌شوند. تمامی مواد مورد استفاده در این پژوهش با درجه خلوص بالا و از شرکت‌های مرک و سیگما تهیه شدند.

### اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی

مقدار کل ترکیبات فنولی با روش فولین سیوکالته (Slinkard & Singelton, 1977) اندازه‌گیری شد. جهت تعیین میزان ترکیبات فلاونوئیدی نیز از روش چانگ و همکاران (۲۰۰۴) استفاده شد.

### میزان به دام اندازی رادیکال‌های آزاد DPPH<sup>۱</sup>

برای این منظور، محلول‌هایی با غلظت‌های مختلف از عصاره‌ها و

های تولیدکنندگان و نیز محققین صنعت غذا، افزایش رو به رشد بیماری‌های مرتبط با مصرف مواد غذایی است که توسط پاتوژن‌ها یا آنتروتوکسین‌های آنها ایجاد می‌گردد. گونه‌های مختلف اشرشیباکلی، استافیلوکوکوس، سالمونلا، یرسینیا و کلستریدیوم منجر به بروز برخی بی‌نظمی‌های معدی- رودی نظیر اسهال و استفراغ می‌گردند. علاوه بر این، برخی از این میکروارگانیسم‌ها با فساد مواد غذایی و به تبع آن با زیان‌های اقتصادی مرتبط می‌باشند (Demirsi et al, 2008). افزایش استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به افزایش مقاومت میکروارگانیسم‌ها به این ترکیبات شده است و پذیرش کلی مصرف کنندگان را نیز کاهش می‌دهد. بنابراین امروزه جست و جو برای انواع جدیدی از آنتی‌بیوتیک‌های موثر و غیر سمی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. تحقیقات زیادی در زمینه یافتن عوامل ضد میکروبی به ویژه ترکیبات آنتی‌میکروبی طبیعی در دهه گذشته انجام شده است و در این راستا گیاهان و محصولات گیاهی نظیر اسانس‌ها و عصاره‌ها بسیار مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (Burt, 2004). ترکیبات فنولی دسته بزرگی از متابولیت‌های ثانویه گیاهی می‌باشند که در سال‌های اخیر به دلیل عملکردهای بیولوژیکی متنوع مورد توجه قرار گرفته‌اند. فعالیت ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی به اثبات رسیده است. مکانیسم‌هایی که به واسطه آن ترکیبات فنولی برای میکروارگانیسم‌ها سمیت ایجاد می‌کنند شامل جذب سطحی و شکستن غشای سلول، واکنش با آنزیم‌ها و کاهش یون‌های فلزی مورد نیاز باکتری‌ها می‌باشد. بنابراین استفاده از ترکیبات فنولی در مواد غذایی نه تنها منجر به محافظت از مواد غذایی می‌گردد و زمان ماندگاری آنها را افزایش می‌دهد بلکه با افزایش ثابت اکسیداتیو مواد غذایی حاوی چربی همراه بوده و بیماری‌های مرتبط با منابع میکروبی را نیز به خوبی کنترل می‌نماید (Majhenic et al, 2007).

درخت بلوط متعلق به خانواده فاگاسه و جنس کوئرکوس می‌باشد. میوه‌ی این درخت یکی از منابع غنی از کربوهیدرات، اسید آمینه، چربی و استرول‌های مختلف بوده که از قدیم الایام در بسیاری از مناطق جهان در تهیه‌ی نان یا کیک مورد استفاده قرار گرفته است. میوه‌ی بلوط علاوه بر ترکیبات تغذیه‌ای حاوی مقادیر قابل توجهی از ترکیبات فعال بیولوژیکی می‌باشد که از آن جمله می‌توان به تانن، گالیک اسید، الاجیک اسید و مشتقات گالویل یا هگزا هیدروکسی دی فنوئیل اشاره کرد که تمامی این ترکیبات دارای خواص آنتی‌اکسیدانی هستند (Rakic et al, 2007). در منابع علمی خواص درمانی بسیاری برای قسمت‌های مختلف درخت بلوط نظیر برگ، پوست ساقه‌های جوان، پوست تنه و گل‌های آن اشاره شده است که از آن جمله می‌توان به خواص ضد عفونی‌کنندگی میوه بلوط اشاره کرد (حاجی شریفی، ۱۳۸۲). علی‌رغم پوشش انبوه جنگل‌های بلوط در مناطق مختلف کشور، مطالعات اندکی در زمینه فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های مختلف میوه این درخت به ویژه علیه باکتری‌های عامل فساد

1- 2, 2'- diphenyl 1-2- picryl hydrazyl

صافی ۲۰ میکرولیتر به دستگاه تزریق گردید (Arabshahi, 2006).

## ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ها

### تهیه سویه‌های میکروبی

میکروارگانیزم‌های مورد بررسی در این مطالعه شامل باکتری‌های گرم مثبت شامل باسیلوس سرئوس (PTCC 1015)، استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 1885)، میکروکوکوس لوتئوس (ATCC 7984) و باکتری‌های گرم منفی شامل اشرشیاکلی (+Esbl)، سالمونلا تیفی موریوم (PTCC 1639)، شیگلا دیسانتری (PTCC 1188)، یرسینیا انتروکولیتیکا (PTCC 1151) و سیتروباکتر فروندی (ATCC 24580) بودند. سویه‌های خالص این باکتری‌ها از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران خریداری شد.

### تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC)<sup>۴</sup>

حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره‌های متانولی دو وارته با استفاده از روش رقت سازی در چاهک (میکروبراث دایلویشن) مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور از پلیت‌های استریل ۹۶ خانه‌ای استفاده شد. محلول استوک عصاره در دی متیل سولفوکساید تهیه گردید و غلظت‌های مختلف عصاره (از ۴۰ تا ۰/۱۵۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) با رقیق سازی محلول استوک با محیط کشت مولر هیتون براث تهیه شد. باکتری‌ها به مدت یک شبانه روز قبل از انجام آزمایش، در دمای ۳۷°C روی محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شدند. جهت تهیه سوسپانسیون میکروبی (۱۰<sup>۶</sup> cfu/ml) از رقت ۰/۵ مک فارلند استفاده شد. بعد از پر کردن چاهک‌ها، میکروپلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷°C قرار داده شد و بعد از طی این دوره میزان کدورت توسط دستگاه الیزا ریدر (بیوتک اینسترومنت) در طول موج ۶۳۰ نانومتر قرائت شد. اولین خانه‌ای که در آن کدورتی دیده نشد به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) تعیین شد. آزمایشات در ۳ تکرار و ۳ زمان مختلف انجام شد (NCCLS, 2000).

### حداقل غلظت کشندگی (MBC)<sup>۵</sup>

از خانه‌هایی که در آنها کدورتی مشاهده نشد، ۵ میکرولیتر به محیط کشت جامد (مولر هیتون آگار) منتقل و یک شب در دمای ۳۷ درجه نگهداری شد. اولین غلظتی که در آن هیچ رشدی دیده نشد به عنوان حداقل غلظت کشندگی (MBC) می‌باشد (Oroojalian et al, 2010).

نیز آنتی اکسیدان‌های سنتزی بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT) و بوتیل هیدروکسی آنیزول (BHA) در حلال متانول آماده شدند. یک میلی‌لیتر از محلول متانولی DPPH (با غلظت ۱ میلی‌مولار) به ۳ میلی‌لیتر از عصاره افزوده و مخلوط حاصله به شدت هم زده شد. لوله‌های آزمایش به مدت ۳۰ دقیقه در محل تاریک قرار گرفتند. بعد از این مدت میزان جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد. لازم به ذکر است در نمونه کنترل، عصاره با ۳ میلی‌لیتر متانول جایگزین شد. در نهایت درصد مهار رادیکال‌های DPPH توسط عصاره با فرمول زیر محاسبه گردید.

$$(1) \quad \text{به دام اندازی رادیکال آزاد (\%)} = \frac{(A_c - A_s)}{A_c} \times 100$$

که در این رابطه  $A_c$  و  $A_s$  به ترتیب جذب کنترل و جذب نمونه می‌باشند.  $EC_{50}$  به غلظتی از عصاره گفته می‌شود که در آن، ۵۰٪ از رادیکال‌های آزاد موجود در محیط مهار شوند (Yildirim et al, 2001).

## تعیین نوع ترکیبات فنولی عصاره‌ها با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا<sup>۱</sup>

به منظور تعیین نوع ترکیبات فنولی موجود در عصاره‌ها از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا استفاده شد. مشخصات دستگاه به شرح زیر بود:

مدل دستگاه: مرک- هیتاچی ال- ۷۱۰۰، دکتور: دکتور دیود اری هیتاچی ال- ۲۴۵۰، آون ستون: هیتاچی ال- ۲۳۰۰ و نوع ستون: آر پی- ۱۸ با ابعاد ۴/۶ × ۲۵۰ میلی‌متر و اندازه‌ی ذرات ۵ میکرو متر.

فاز متحرک مورد استفاده در این بررسی شامل آب دیونیزه: استونیتریل: اسید استیک با نسبت ۸۹: ۱۰: ۱ (حجمی: حجمی)، سرعت جریان فاز متحرک در ستون ۱ میلی‌لیتر در هر دقیقه، سیستم مورد استفاده ایزو کراتیک<sup>۲</sup> و دمای ستون ۲۵°C بود. جهت شناسایی نوع ترکیبات فنولی از استانداردهای اسید گالیک، اسید فرولیک، اسید کلروژنیک، اسید کافئیک، اسید سیرینجیک و اسید p- کوماریک استفاده شد. برای این منظور حدود ۱۰۰ میلی‌گرم از هر عصاره در ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۱۰٪ حل شد و به مدت ۱۰ دقیقه در حمام فراصوت قرار گرفت. سپس محلول‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰ سانتریفوژ شدند. جهت جلوگیری از ورود ناخالصی‌های احتمالی موجود در عصاره‌ها به ستون، محلول‌های عصاره با فیلترهای سرنگی با اندازه‌ی منافذ ۰/۲ میکرومتر صاف و در نهایت از محلول خروجی از

4- Minimum Inhibitory Concentration  
5- Minimum Bactericidal Concentration

1- High Performance liquid Chromatography  
2- Reverse Phase -18  
3- Isocratic

## آنالیز آماری

در این پژوهش تیمارها در سه تکرار انجام شده و نتایج به دست آمده با استفاده از روش آنالیز واریانس (ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال  $(P < 0/05)$  صورت گرفت. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SAS.9.1 و رسم نمودارها با نرم افزار Excel انجام شد.

## نتایج و بحث

**مقدار ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و بازدهی استخراج**  
مقدار ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و بازدهی استخراج عصاره‌های فنولی دو واریته در جدول ۱ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود اختلاف معنی داری  $(P < 0/05)$  بین عصاره‌ها از نظر این سه ویژگی وجود دارد. مقدار ترکیبات فنولی کل عصاره MC به طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر از MP بود.

جدول ۱- مقدار کل ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی، بازدهی استخراج و غلظت موثره عصاره‌های متانولی دو واریته بلوط ایرانی

واریته	مقدار کل ترکیبات فنولی (میلی گرم گالیک اسید/گرم عصاره)	مقدار کل ترکیبات فلاونوئیدی (میکروگرم کوئرستین/گرم عصاره)	بازدهی استخراج (%)
کاستانیفولیا	$313/69 \pm 7/63^a$	$150/31 \pm 5/65^a$	$34/78^a$
پرسیکا	$281/55 \pm 8/35^b$	$126/8 \pm 8/67^b$	$28/9^b$

حروف غیر مشابه در هر ستون بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین دو واریته در سطح احتمال ۵٪ می‌باشد.

ترکیبات فلاونوئیدی دو واریته بلوط از ۱۲۶/۸ برای MP تا ۱۵۰/۳۱ میکروگرم معادل کوئرستین در هر گرم عصاره متغیر بود. واریته‌های مورد استفاده در این بررسی، تاثیر معنی‌داری  $(P < 0/05)$  بر میزان بازدهی استخراج و احتمالاً نوع ترکیبات استخراج شده داشته‌اند. آنالیز همبستگی بین مقدار ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی انجام شد. نتایج حاکی از وجود همبستگی مثبت بالایی بین مقدار این ترکیبات در دو عصاره بود  $(R^2 = 0/93, P < 0/01)$ . بنابراین می‌توان نتیجه گرفت، بخش قابل ملاحظه‌ای از فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها احتمالاً مربوط به ترکیبات فلاونوئیدی آنها خواهد بود. همبستگی بالایی بین مقدار ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی میوه‌های آناناس و موز گزارش شد که با نتایج به دست آمده در این تحقیق مطابقت دارد (Allothman et al, 2009).

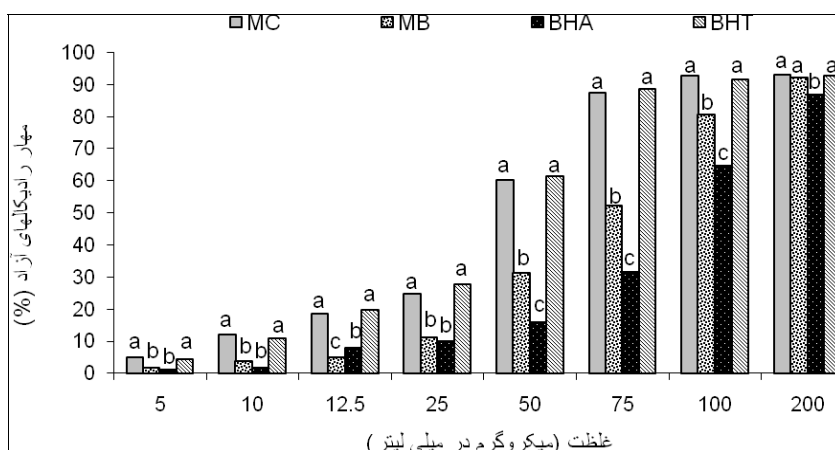
### به دام اندازی رادیکال‌های آزاد DPPH

اندازه‌گیری میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH یکی از روش‌های معتبر، دقیق، آسان و مقرون به صرفه با قابلیت تکرار پذیری بالا می‌باشد که در بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های گیاهی در شرایط آزمایشگاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Singh & Singh, 2008). DPPH یکی از رادیکال‌های هیدروفیل آزاد و پایدار با رنگ بنفش تیره بوده که حداکثر جذب آن در محدوده ۵۱۵ تا ۵۱۷ نانومتر است. هنگام دریافت الکترون از ترکیبات احیاء کننده نظیر فنول‌ها، این رادیکال به فرم هیدرازین بی رنگ تبدیل می‌شود که این تغییر ساختاری با کاهش میزان جذب همراه است (Zhou & Yo, 2004). مهار رادیکال‌های آزاد یکی از شناخته شده

عوامل متعددی مقدار ترکیبات فنولی موجود در بافت های گیاهی را تحت تاثیر قرار می‌دهند که از آن جمله می‌توان به فاکتورهای ژنتیکی، میزان تابش نور خورشید، شرایط خاک، درجه رسیدگی در زمان برداشت، شرایط محیطی و آب و هوایی، عملیات پس از برداشت و شرایط نگهداری اشاره کرد (Faller & Fialho, 2009). مقدار ترکیبات فنولی کل و تانن عصاره متانولی میوه بلوط گونه کوئرکوس روبرو به ترتیب ۰/۲۲۳ و ۰/۲۰۴ و برای گونه کوئرکوس سوبور ۰/۲۲۹ و ۰/۲۱۸ میلی‌گرم معادل اسید گالیک در میلی‌گرم عصاره بود (Racik et al, 2007). مقادیر گزارش شده برای ترکیبات فنولی این گونه‌ها نسبت به دو واریته مورد بررسی در این تحقیق حاضر کمتر بود. ترکیبات فنولی ۴ واریته‌ی مختلف سیب زمینی به وسیله حلال متانول استخراج و مقدار ترکیبات فنولی در واریته‌های بنگوتا، ایگورتا، گانزا و ۱۲۵۴۱۱.۲۲ به ترتیب ۵۰، ۴۷/۴، ۳۹/۱ و ۳۴/۴٪ گزارش شد. تفاوت‌های مشاهده شده بین واریته‌های مختلف سیب زمینی به تفاوت در فاکتورهای ژنتیکی و شرایط محیطی نظیر دسترسی به آب، نور و دما نسبت داده شد (Rumbaoa et al, 2009). اختلاف بین مقدار ترکیبات فنولی عصاره‌های حاصل از واریته‌های مختلف را می‌توان به تفاوت در نوع ترکیبات فنولی دو واریته، درجه پلیمریزاسیون آنها، حلالیت فنول‌ها و واکنش آنها با دیگر اجزای موجود در ماتریکس غذائی نسبت داد (Thoo et al, 2010). فلاونوئیدها یکی از گسترده ترین و متنوع ترین گروه از ترکیبات فیتوشیمیائی گیاهی می‌باشند. این ترکیبات از طیف وسیعی از فعالیت‌های فیتوشیمیائی و بیولوژیکی برخوردارند که از آن جمله می‌توان به ویژگی‌های مهار رادیکال‌های آزاد اشاره کرد (Prasad et al, 2009).  
با در نظر گرفتن معادله خط استاندارد کوئرستین  $(R^2 = 0/998)$  مقدار

هیدروژن به رادیکال‌های آزاد و به دنبال آن قدرت مهار کنندگی عصاره افزایش می‌یابد (Sanchez-Moreno et al, 1999). قدرت مهار کنندگی عصاره‌های مختلف به میزان زیادی به تعداد و موقعیت گروه‌های هیدروکسیل و وزن مولکولی ترکیبات فنولی بستگی دارد. در ترکیبات فنولی با وزن مولکولی پایین‌تر گروه‌های هیدروکسیل راحت‌تر در دسترس قرار می‌گیرند (Jung et al, 2006). معمولاً برای مقایسه فعالیت ضد رادیکالی عصاره‌های مختلف از فاکتوری تحت عنوان  $EC_{50}$  استفاده می‌شود. طبق تعریف  $EC_{50}$  به غلظتی از عصاره اطلاق می‌گردد که در آن ۵۰٪ از رادیکال‌های آزاد DPPH موجود در محیط واکنش مهار شوند. بنابراین هر چه این غلظت کمتر باشد، نشان دهنده این است که عصاره مورد نظر فعالیت ضد رادیکالی بیشتری دارد. در این بررسی نیز مقادیر  $EC_{50}$  برای تمامی عصاره‌های تعیین و با آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی BHA و BHT مقایسه گردید (جدول ۲). همانطور که در جدول دیده می‌شود، کمترین میزان  $EC_{50}$  متعلق به BHT بود که از این نظر اختلاف معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) با عصاره MC نداشت. همچنین اختلاف معنی‌داری بین  $EC_{50}$  عصاره MP و BHA دیده شد و این عصاره از نظر میزان مهار رادیکال‌های آزاد نسبت به BHA قوی‌تر بود.

ترین مکانیسم‌هایی است که به واسطه آن ترکیبات آنتی‌اکسیدانی می‌توانند اکسیداسیون چربی‌ها را مهار نمایند. نتایج آنالیز واریانس نشان داد، نوع و غلظت عصاره‌ها و آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی تأثیر معنی‌داری بر میزان مهار رادیکال‌های آزاد داشتند. همچنین نتایج حاکی از آن بود که توانایی عصاره‌ها در مهار رادیکال‌های آزاد وابسته به غلظت بوده و با افزایش غلظت فعالیت ضد رادیکالی آنها افزایش می‌یابد. شکل ۱ میزان مهار رادیکال‌های آزاد توسط غلظت‌های مختلف عصاره‌های متانولی دو وارپته و آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی را نشان می‌دهد. در تمامی غلظت‌های مورد بررسی اختلاف معنی‌داری بین BHT و MC مشاهده نشد. اگرچه بین میزان مهار رادیکال‌های آزاد عصاره MP و BHA در غلظت‌های کمتر از ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر اختلاف چشم‌گیری مشاهده نشد، اما با افزایش غلظت این ویژگی برای عصاره MP به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت به طوری که در غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از این نظر با BHT نیز قابل رقابت بود. در کل افزایش غلظت ترکیبات فنولی به طور مستقیم میزان توانایی عصاره‌های مختلف را در مهار رادیکال‌های آزاد افزایش می‌دهد. در غلظت‌های بالاتر ترکیبات فنولی به دلیل افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل موجود در محیط واکنش، احتمال اهداء



شکل ۱- مقایسه میانگین درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH غلظت‌های مختلف عصاره‌های متانولی میوه‌ی دو وارپته بلوط و آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی.

حروف غیر مشابه در هر غلظت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ است.

جدول ۲- مقایسه میانگین مقادیر  $EC_{50}$  (میکروگرم عصاره در میلی‌لیتر) برای عصاره‌های متانولی دو وارپته‌ی بلوط، BHT و BHA

آنتی‌اکسیدان سنتزی		وارپته		عصاره
BHT	BHA	برانتی	کاستانیفولیا	
۴۱/۷۳ <sup>c</sup>	۸۹/۴۶ <sup>a</sup>	۷۰/۴۰ <sup>b</sup>	۴۲/۸۴ <sup>c</sup>	$EC_{50}$

حروف غیر مشابه در هر سطر بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ است.

جدول ۳- حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) (میلی گرم/میلی لیتر) عصاره‌های متانولی میوه دو واریته بلوط

واپار	واپار		نوع باکتری (-/+)	شماره باکتری	باکتری
	پرسیکا	کاستانیفولیا			
۰/۳۱۲	۱/۲۵		+	PTCC 1015	باسیلوس سرئوس
۰/۳۱۲	۱/۲۵		+	ATCC 1885	استافیلوکوکوس اورئوس
۰/۳۱۲	۱/۲۵		+	ATCC 79840	میکروکوکوس لوتئوس
۲/۵	۵		-	Esbl+	اشرشیا کلی
۲/۵	۲/۵		-	PTCC 1639	سالمونلا تیفی
۰/۶۲۵	۱/۲۵		-	PTCC 1151	یرسینیا انتروکولیتیکا
۲/۵	۲/۵		-	PTCC 1188	شیگلا دیسانتری
۵	۵		-	ATCC 24580	سیتروباکتر فروندی

جدول ۴- حداقل غلظت کشندگی (MBC) (میلی گرم/میلی لیتر) عصاره‌های متانولی میوه دو واریته بلوط

واپار	واپار		نوع باکتری (-/+)	باکتری
	پرسیکا	کاستانیفولیا		
۰/۳۱۲	۱/۲۵		+	باسیلوس سرئوس
۱/۲۵	۱/۲۵		+	استافیلوکوکوس اورئوس
۲/۵	۲/۵		+	میکروکوکوس لوتئوس
۵	۵		-	اشرشیا کلی
۵	۵		-	سالمونلا تیفی
۲/۵	۵		-	یرسینیا انتروکولیتیکا
۱۰	۵		-	شیگلا دیسانتری
۵	۱۰		-	سیتروباکتر فروندی

فعالیت رادیکال‌زدایی عصاره‌ها به طور معنی دار افزایش نیافت که با نتایج به دست آمده در این بررسی مطابقت داشت. در بررسی دیگری فعالیت آنتی‌اکسیدانی دو نوع قارچ وحشی (*Lactarius* (Ld) و *Tricholoma portentusum* (Tp) را مورد بررسی گرفت. مقادیر  $EC_{50}$  برای قارچ‌های Ld و Tp به ترتیب ۸/۵۲ و ۲۲/۹ میلی‌گرم در میلی لیتر بود. تفاوت‌های مشاهده شده بین مقادیر  $EC_{50}$  عصاره‌ی متانولی دو نوع قارچ را به تفاوت در مقدار ترکیبات فنولی آنها نسبت دادند (Ferreira et al, 2007). مقدار ترکیبات فنولی در عصاره Ld و Tp به ترتیب ۱۷/۲۵ و ۱۰/۸۰ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره بود. همانطور که مشاهده شد، یافته‌های به دست آمده توسط سایر محققین حاکی از آن است که بین مقدار ترکیبات فنولی عصاره‌های گیاهی با فعالیت ضد رادیکالی آنها ارتباط وجود دارد. این یافته‌ها با نتایج تحقیق حاضر را تأیید می‌نماید.

#### فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ها

فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های متانولی دو واریته بر تعدادی از باکتری‌های پاتوژن موجود در مواد غذایی مورد بررسی قرار گرفت و

تفاوت‌های مشاهده شده بین  $EC_{50}$  عصاره‌های مختلف در این تحقیق را می‌توان به تفاوت در مقادیر ترکیبات فنولی آنها نسبت داد. میزان ترکیبات فنولی، به طور مستقیم فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد.

ضریب هم‌بستگی معکوسی بین مقدار ترکیبات فنولی عصاره‌ها با  $EC_{50}$  آنها به دست آمد ( $r = -0/99$ ,  $P = 0/036$ ) که خود موید این است که عصاره‌هایی که حاوی مقادیر بیشتری از ترکیبات فنولی می‌باشند، در غلظت‌های پائین توانائی بیشتری در مهار رادیکال‌های آزاد از خود نشان می‌دهند. محققین دیگری نیز توانائی عصاره‌های گیاهی مختلف را در مهار رادیکال‌های آزاد DPPH مورد بررسی قرار داده‌اند. در بررسی انجام شده روی دو گونه‌ی بلوط کوئرکوس کریس و کوئرکوس روبرو، میزان مهار رادیکال‌های DPPH در غلظت‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد، با افزایش غلظت عصاره متانولی از ۱۰۰-۱۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر درصد مهار رادیکال‌های آزاد به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت. مقادیر  $EC_{50}$  برای دو واریته کریس و روبرو به ترتیب ۸/۸۸ و ۸/۰۴ میکروگرم در میلی‌لیتر بود (Rakic et al, 2007). هم‌چنین در غلظت‌های بالا،

مقایسه با MP نسبت داد. عصاره اتانولی گیاه *Eclipta prostrata* نیز در مقایسه به سایر حلال‌ها (آب، هگزان، اتیل استات) نقش مؤثری در جلوگیری از رشد همه باکتری‌های مورد آزمون داشت که به مقادیر بالاتر ترکیبات فنولی این عصاره نسبت داده شد (Karthikumar et al, 2007). عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی می‌توانند عملکردهای مختلفی را در مقابل سویه‌های باکتریایی از خود نشان دهند که از آن جمله می‌توان به تداخل با غشای فسفولیپیدی دو لایه‌ای سلول اشاره کرد که به دنبال آن نفوذ پذیری غشاء افزایش و مواد درون سلولی کاهش می‌یابد. از سایر مکانیسم‌ها می‌توان به آسیب به آنزیم‌های دخیل در تولید انرژی و ترکیبات ساختاری سلول و نیز غیر فعال کردن ترکیبات ژنتیکی اشاره کرد (Kotzekidou et al, 2008). فعالیت ضد میکروبی عصاره متانولی پوسته خارجی میوه بلوط (*Q. branti*) بر روی تعدادی از باکتری‌های گرم منفی با روش دیسک دیفوزیون مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد، تاثیر عصاره روی باکتری‌های اشرشیاکلی و سودوموناس میرابیلیس قابل ملاحظه و وابسته به غلظت بوده، اما تاثیر چندانی روی باکتری شیگلا فلکسنری نداشته است. خسروی و بهزادی (2008) فعالیت ضد میکروبی پوسته بلوط را به حضور ترکیبات تاننی در آن نسبت دادند. در پژوهش دیگری فعالیت ضد میکروبی عصاره اتانولی (۵۰٪) میوه بلوط با روش انتشار دیسک ارزیابی و با تعدادی از آنتی بیوتیک‌های رایج مقایسه شد. نتایج نشان داد که اثر عصاره‌ها بر روی باکتری‌ها وابسته به غلظت بوده است. در مقایسه با آنتی بیوتیک‌ها نیز غلظت ۷۵ mg/ml عصاره‌ها بر استافیلوکوکوس اورئوس مشابه جنتامایسین بوده است. این اثر بر روی باکتری اشرشیاکلی کمتر از جنتامایسین و کانامایسین و بیشتر از ثوبرامایسین بوده است (ابراهیمی و همکاران، ۱۳۸۸). شهیدی و همکاران (2004) فعالیت ضد میکروبی عصاره متانولی *Q. acerifolia* را در غلظت ۲۰ mg/ml مورد بررسی قرار دادند اما هیچ گونه منطقه مهاری برای باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و اشرشیاکلی گزارش نکردند. در نتیجه در مقایسه با عدم خاصیت ضد میکروبی عصاره گونه فوق، اثر عصاره متانولی وارپته‌های مورد بررسی در این تحقیق بر روی باکتری‌های نامبرده بسیار بیشتر بوده است. سالاری و همکاران (۱۳۸۷) فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های مختلف هسته انگور را با تعیین حداقل غلظت کشندگی عصاره‌ها مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاکی از توانایی بالای این عصاره‌ها در از بین بردن باکتری‌های مورد بررسی بود. از نظر میزان MBC بین عصاره‌های مختلف اختلاف معنی‌داری وجود نداشته و در مورد باکتری‌های سالمونلا انتریدیس، اشرشیاکلی و انتروباکتر آئروژنز این میزان ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام و برای استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا مونوسیتوژنز، ۵۰۰ پی‌پی‌ام بود. تاثیر ۱۸ عصاره گیاهی مختلف را بر روی تعدادی از باکتری‌ها با روش انتشار دیسک مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد، اشرشیا

نتایج به دو شکل MIC و MBC در جداول ۳ نشان داده شده است. میزان MIC عصاره‌های MC و MP به ترتیب در محدوده غلظت ۵-۰/۳۱۲ و ۱۰-۱/۲۵ میلی گرم در میلی لیتر و میزان MBC آنها نیز ۱۰-۰/۳۱۲ و ۱۰-۱/۲۵ میلی گرم در میلی لیتر متغیر بود. نتایج نشان داد هر دو عصاره مورد بررسی در غلظت‌های مختلف توانستند روی پاتوژن‌ها اثرات ضد میکروبی داشته باشند. در کل باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی حساسیت بیشتری نشان دادند. باکتری‌های گرم منفی علاوه بر پپتیدوگلیکان، یک لایه دیگر به نام غشای خارجی در دیواره سلولی خود دارند. سطح هیدروفیلی این غشا که غنی از مولکول‌های لیپوبلی ساکاریدی می‌باشد به عنوان مانع در برابر آنتی بیوتیک‌ها عمل می‌کند. همچنین آنزیم‌های موجود در فضای پری پلاسمایی، قادرند مولکول‌های ورودی از بیرون را بشکنند اما در مورد باکتری‌های گرم مثبت، مواد ضد میکروبی به راحتی دیواره سلولی و غشای سیتوپلاسمی را تخریب کرده که منجر به نشت سیتوپلاسم و انعقاد آن می‌شوند (Duffy & Power, 2001). با توجه به موارد گفته شده علت MBC بالاتر در مورد باکتری‌های گرم منفی نسبت به انواع مثبت توجیه می‌شود.

نتایج حاکی از آن بود که عصاره MC بر اکثر باکتری‌های مورد بررسی اثر بازدارندگی بیشتری داشت. رشد تمامی باکتری‌های گرم مثبت در غلظت ۰/۳۱۲ mg/ml این عصاره مهار شد، این در حالیست که برای مهار رشد باکتری‌های نامبرده به غلظت‌های بیشتری از عصاره MP نیاز بود (۱/۲۵ mg/ml). از بین باکتری‌های گرم منفی نیز سیتروباکتر نسبت به بقیه مقاومت بیشتری داشت در حالی که یرسینیا انتروکولیتیکا مقاومت کمتری نشان داد. حداقل غلظت مهار کنندگی برای باکتری‌های گرم منفی در حضور عصاره MC برای اشرشیاکلی، سالمونلا تیفی و شیگلا دیسانتری مساوی بود اما در حضور عصاره MP به ترتیب سیتروباکتر و اشرشیاکلی، سالمونلا تیفی و شیگلا دیسانتری و در نهایت یرسینیا انتروکولیتیکا بیشترین غلظت مهار کنندگی را به خود اختصاص دادند. همانطور که در جدول ۴ مشاهده می‌شود، عصاره‌ها روی تمامی باکتری‌های مورد بررسی اثر کشندگی داشته‌اند. میزان MBC مربوط به MP در مقابل باکتری میکروکوکوس و استافیلوکوکوس اورئوس مساوی MC بود، اما در مورد باسیلوس سرئوس عصاره MC تاثیر بیشتری داشت. در مورد عصاره MP کمترین اثر باکتری‌کشی مربوط به سیترو باکتر بود در حالی که بیشترین میزان MBC برای عصاره MC در برابر شیگلا دیسانتری بود به طوری که تنها غلظت‌های بالای این عصاره‌ها (۱۰ mg/ml) اثر کشندگی داشتند. در مورد سایر باکتری‌های گرم منفی، غلظت‌های پائین تری عصاره MC تاثیر قابل ملاحظه‌تری نسبت به MP داشتند. فعالیت ضد میکروبی بالاتر عصاره MC را می‌توان به مقادیر بالاتر ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی این عصاره در

می‌باشد. حضور این ترکیب تنها در عصاره‌ی MC تشخیص داده شد. تعداد و موقعیت گروه‌های هیدروکسیل فاکتور کلیدی در فعالیت ضد میکروبی ترکیبات فنولی به شمار می‌آید. با افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل، فعالیت میکروبی افزایش می‌یابد (Cowan, 1999). فعالیت‌های ضد میکروبی فلاونوئیدها در نتیجه توانایی تشکیل کمپلکس با دیواره سلولی باکتری‌ها می‌باشد و بنابراین از این طریق از رشد میکروارگانیسم جلوگیری می‌کنند. ترکیبات فنولی از طریق واکنش با گروه‌های سولفیدریل یا بر هم کنش‌های غیر اختصاصی با پروتئین‌ها، از فعالیت آنزیمی جلوگیری به عمل آورده و بدین ترتیب فعالیت ضد میکروبی خود را اعمال می‌کنند. ترکیبات فنولی میوه و پوست سه گونه بلوط کوثرکوس سوبر، الیکس و روتوندیفولیا را با روش کروماتوگرافی مایع مجهز به آشکارسازهای دیوداری بررسی شد. ۳۲ ترکیب فنولی مختلف در نمونه‌ها شناسایی گردید که اکثر آنها از نوع استرهای گالویل گلوز یا از مشتقات الایک اسید بودند. نوع و میزان ترکیبات فنولی در دو گونه‌ی الیکس و روتوندیفولیا مشابه و از نوع مشتقات اسید گالیک بودند، در حالی که ترکیبات فنولی گونه سوبر از مشتقات الایک اسید تشخیص داده شدند. پوست گونه سوبر نیز نسبت به دو گونه دیگر مقدار بیشتری از ترکیبات فنولی را دارا بود (Cantos et al, 2003). در زمینه‌ی اندازه‌گیری مقدار و نیز شناسایی نوع ترکیبات فنولی میوه‌ی بلوط به ویژه گونه‌های ایرانی، بررسی‌های اندکی انجام شده است و اکثر تحقیقات در این زمینه بیشتر به اندازه‌گیری و تعیین درصد تانن این میوه محدود شده‌اند. مسعودی نژاد و رضازاده آذری (۱۳۸۲) میزان تانن ده گونه‌ی بلوط ایران را اندازه‌گیری و گزارش کردند میزان تانن گونه‌ها از ۳/۲ تا ۷/۵٪ متغیر بود. اکثر محققین فعالیت ضد میکروبی عصاره بخش‌های مختلف گیاه بلوط را به تانن‌های آن نسبت داده‌اند.

مهم‌ترین عاملی که فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولی را تحت تاثیر قرار می‌دهد، ساختار شیمیایی آنهاست. توانایی اهداء الکترون یا هیدروژن، تشکیل کمپلکس با فلزات و فعالیت ضد رادیکالی این ترکیبات با تعداد گروه‌های هیدروکسیل موجود در حلقه آروماتیک و موقعیت قرار گرفتن آنها مرتبط است. علاوه بر این حضور سایر گروه‌ها نظیر استیل و متوکسیل و موقعیت آنها نسبت به گروه‌های هیدروکسیل نیز عامل مهمی است که در ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولی است باید به آن توجه نمود (Sroka & Cisowski, 2003). اسید گالیک با دارا بودن ۳ گروه هیدروکسیل فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی از خود نشان می‌دهد. جایگزین شدن دو گروه هیدروکسیل آن با دو گروه متوکسیل از قدرت آنتی‌اکسیدانی آن می‌کاهد. بنابراین اسید سیرینجیک نسبت به اسید گالیک توانایی کمتری در اهداء الکترون از خود نشان می‌دهد. در کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی هیدروکسی سینامیک اسیدها نسبت به هیدروکسی-بنزوئیک‌ها بیشتر است محققین زیادی با مقایسه فعالیت آنتی

کلی حساس ترین سوبه باکتری بود و رشد آن توسط تمامی عصاره‌ها مهار شد و به دنبال آن سالمونلا تیفی موریوم و استافیلوکوکوس اورئوس قرار گرفتند (Kotzekidou et al, 2008). اسانس‌های گیاهی نیز دسته دیگری از ترکیبات دارای خواص ضد میکروبی می‌باشند. برومند و همکاران (۱۳۸۷) خاصیت ضد میکروبی اسانس بذرهای شوید و گشنیز را بر روی تعدادی از باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت بررسی کردند. نتایج نشان داد که استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا تیفی موریوم به ترتیب حساس‌ترین و مقاوم‌ترین باکتری به هر دو اسانس بودند و اسانس بذر گشنیز نسبت به شوید اثر کشندگی بیشتری بر باکتری‌های گرم منفی داشت. مقایسه نتایج حاصل از مطالعات مختلف پیچیده به نظر می‌رسد چرا که نتایج با فاکتورهای نظیر دما، زمان انکوباسیون، pH محیط و نوع محیط کشت، فاز رشد میکروارگانیسم و حجم محیط کشت مورد استفاده تحت تاثیر قرار می‌گیرد. همچنین، ترکیب شیمیایی، نوع و مکانیسم عمل ترکیبات فنولی هر یک از عصاره‌ها از عوامل مؤثر در ایجاد اختلاف نتایج در فعالیت ضد میکروبی حلال‌ها می‌باشند (Wen et al, 2003).

## تعیین نوع ترکیبات فنولی عصاره‌ها با کروماتوگرافی مایع با کارائی بالا

ترکیبات فنولی موجود در عصاره‌ها با مقایسه‌ی زمان بازداری پیک-های نمونه با زمان بازداری پیک‌های مربوط به استانداردهای اسیدهای فنولی تعیین گردید. جدول ۵ نوع ترکیبات فنولی هر عصاره را نشان می‌دهد. همانطور که در جدول ۵ دیده می‌شود، ترکیب مشترک بین عصاره‌ها اسید گالیک، اسید کلروژنیک و اسید کافئیک بود. اسید گالیک از مشتقات هیدروکسی بنزوئیک اسیدهای فنولی بوده و در ساختار خود دارای ۳ گروه هیدروکسیل می‌باشد و به دلیل قطبیت بالا زودتر از سایر ترکیبات از ستون خارج می‌شود. عصاره‌ی MP حاوی مقادیر جزئی از اسید سیرینجیک بودند. این ترکیب نیز یکی از مشتقات هیدروکسی بنزوئیک اسیدهای فنولی محسوب می‌شود که در ساختار خود دارای ۲ گروه متوکسیل و یک گروه هیدروکسیل می‌باشد. مشتقات هیدروکسی سینامیک اسید دسته‌ی دیگری از اسیدهای فنولی موجود در گیاهان می‌باشند که تفاوت آنها با مشتقات بنزوئیک اسید حضور یک گروه کربوکسیل در ساختار آنها است. اسید p-کوماریک، اسید کلروژنیک، اسید کافئیک و اسید فرولیک در این گروه قرار دارند. اسید کافئیک در ساختار خود دارای دو گروه هیدروکسیل است و از استری شدن آن با اسید کوئینیک، اسید کلروژنیک حاصل می‌گردد. از بین ترکیبات مورد بررسی اسید p-کوماریک بیشترین زمان بازداری را داشت و آخرین پیک موجود در کروماتوگرام مربوط به مخلوط استانداردها مربوط به این ترکیب



فعالیت آنتی‌اکسیدانی را تأیید می‌نماید. در عصاره‌ی MC حضور اسید گالیک، اسید کافئیک، اسید کلروژنیک و اسید p-کوماریک، با فعالیت ضد رادیکالی بالای آن همراه است. در زمان بازداری ۹/۴ پیک بزرگی در کروماتوگرام این عصاره مشاهده شد، که با زمان بازداری هیچ کدام از استانداردهای مورد استفاده در این بررسی مطابقت نداشت. احتمالاً فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالای این عصاره علاوه بر ترکیبات نامبرده، با حضور این ترکیب ناشناخته نیز مرتبط است. وجود ترکیباتی نظیر اسید کافئیک، اسید گالیک، اسید کلروژنیک و اسید سیرینجیک قدرت آنتی‌اکسیدانی بالای عصاره متانولی وارپته‌ی Qb را تأیید می‌کند.

اکسیدانی اسید کافئیک و اسید کلروژنیک گزارش کردند، استری شدن اسید کافئیک با اسید کوئینیک از قدرت آنتی‌اکسیدانی و توانایی مهار رادیکال‌های آزاد هیدروپراکسید و DPPH آن می‌کاهد. قدرت آنتی‌اکسیدانی بالاتر اسید کافئیک با حضور دو گروه هیدروکسیل در ساختار آن مرتبط است. اسید p-کوماریک اسید نیز با داشتن یک گروه هیدروکسیل می‌تواند نقش به‌سزائی در مهار رادیکال‌های آزاد داشته باشد اما قدرت آنتی‌اکسیدانی آن کمتر از اسید فرولیک و اسید کافئیک است (Andreasen et al, 2001). نتایج به دست آمده در آنالیز ترکیبات فنولی عصاره‌ها، نتایج حاصل از آزمون‌های ارزیابی

جدول ۵- نوع ترکیبات فنولی موجود در عصاره‌های متانولی دو وارپته بلوط

عصاره		زمان بازداری (دقیقه)	نوع ترکیب
MP	MC		
+	+	۳/۴	اسید گالیک
+	+	۸/۴۷۳	اسید کلروژنیک
+	+	۱۲/۷۵	اسید کافئیک
+	-	۱۳/۳۲	اسید سیرینجیک
-	-	۲۲/۴۳	وانیلین
-	-	۱۳/۱۷۳	اسید فرولیک
-	+	۲۵/۳۷۳	اسید p-کوماریک

علامت + و - به ترتیب نشان دهنده حضور و عدم حضور ترکیبات فنولی در عصاره‌ها می‌باشد.

## نتیجه‌گیری

های سنتزی بر سلامت انسان و نیز مقاومت سویه‌های باکتریایی به آنتی‌بیوتیک‌ها، مطالعات بیشتر در زمینه کاربرد این عصاره‌ها در سیستم‌های غذایی فاسد شدنی پیشنهاد می‌گردد. بدین ترتیب با شناسایی ویژگی‌های ارزشمند میوه بلوط، از هدر رفتن مقادیر انبوهی از این میوه در مناطق جنگلی کشور جلوگیری به عمل می‌آید.

نتایج این پژوهش حاکی از آن بود که میوه بلوط دو وارپته مورد بررسی حاوی مقادیر قابل توجهی از ترکیبات فنولی می‌باشد. حضور ترکیبات فنولی نظیر اسید گالیک، اسید کافئیک، اسید کلروژنیک در عصاره میوه بلوط با فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی قابل توجه این عصاره‌ها همراه است. با توجه به اثرات نامطلوب آنتی‌اکسیدان-

## منابع

- ابراهیمی، ا.، خیامی، م. و نجاتی، و.، ۱۳۸۸، ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی عصاره هیدروالکلی میوه بلوط ایرانی در روش انتشار دیسک، فصلنامه گیاهان دارویی، ۳۳، ۳۴-۲۶.
- برومند، ع.، حامدی، م.، امام‌جمعه، ز.، رضوی، ه. و گل‌مکانی، م.ت.، ۱۳۸۷، بررسی خاصیت ضد میکروبی اسانس بذرهای شوید (*Anethum graveolens*) و گشنیز (*Coriandrum sativum*) بر روی استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی O157:H7، سالمونلا تیفی موریوم با استفاده از آزمایش حساسیت رقت در محیط مایع، مجله پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران، ۴ (۱)، ۶۸-۵۹.
- حاجی شریفی، ا.، ۱۳۸۲، اسرار گیاهان دارویی، انتشارات حافظ نوین، ۲۰۴-۲۰۰.
- سالاری، ا.، حبیبی نجفی، م.ب.، فرحوش، ر.، مرعشی، ح.، ۱۳۸۷، بررسی اثر سیستم‌های مختلف حلال بر استخراج عصاره هسته انگور و ارزیابی خواص ضد میکروبی آن، مجله پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران، ۴ (۲)، ۷۹-۷۱.
- مسعودی‌نژاد، م.ر. و رضازاده آذری، م.، ۱۳۸۲، مقایسه چهار روش استخراج تانن از میوه‌های گونه‌های مختلف بلوط ایران، مجله پژوهشی حکیم، ۱، ۸۱-۹۱.

- Alothman, M., Bhat, R. & Karim, A.A., 2009, Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. *Food Chemistry*, 115, 785-788.
- Andreasen, M. F., Landbo, A.K., Christensen, L. P., Hansen, A. & Meyer, A.S., 2001, Antioxidant effects of phenolic rye (*Secale cereale* L.) extracts, monomeric hydroxycinnamates, and ferulic acid dehydrodimers on human low-density lipoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4090-4096.

- Arabshahi, D.S., 2006, Studies on selected plant extracts with reference to their nutritional and pharmacological characteristics. PhD Thesis. Mysore India: University of Mysore, Department of Studies in Food Science and Nutrition.
- Burt, S., 2004, Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods – A review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223–253.
- Cantos, E., Espn, J.C., Lpez-Bote, C., Hoz, H., Ordez, J.A. & Toms-Barbern, F.A., 2003, Phenolic Compounds and Fatty Acids from Acorns (*Quercus* spp.), the Main Dietary Constituent of Free-Ranged Iberian Pigs. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 51, 6248-6255.
- Chang, C., Yang, M., Wen, H. & Chern, J., 2002, Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food & Drug Analysis*, 10, 178-182.
- Cowan, M.M., 1999, Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Review*, 12, 564-582.
- Demirci, F., Guven, K., Demirci, B., Dadandi, M. Y., & Baser, K. H. C., 2008, Antibacterial activity of two *Phlomis* essential oils against food pathogens. *Food Control*, 19, 1159–1164.
- Duffy, C.F. & Power, R.F., 2001, Antioxidant and antimicrobial properties of some Chinese plant extracts. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 17, 527-529.
- Ebrahimabadi, A.H., Ebrahimabadi, E.H., Jafari-Bidgoli, Z., Jookar Kashi, F., Mazoochi, A. & Batooli, H., 2010, Composition and antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and extracts of *Stachys inflata* Benth from Iran. *Food Chemistry*, 119, 452-458.
- Faller, A.L.K. & Fialho, E., 2009, The antioxidant capacity and polyphenol content of organic and conventional retail vegetables after domestic coking. *Food Research International*, 42, 210-215.
- Ferreira, I.C.F.R., Baptista, P., Vilas-Boas, M. & Barros, L., 2007, Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. *Food Chemistry*, 100, 1511-1516.
- Jung, C.H., Seog, H.M., Choi, I.W., Park, M.W. & Cho, H.Y., 2006, Antioxidant properties of various solvent extracts from wild ginseng leaves. *LWT*, 39, 266-274.
- Karthikumar, S., Vigneswari, K. & Jegatheesan, K., 2007, Screening of antibacterial and antioxidant activities of leaves of *Eclipta prostrata* (L). *Scientific Research & Essay*, 2, 101-104.
- Khosravi A. D. & Behzadi A., 2006. Evaluation of The Antibacterial Activity of The Seed Hull of *Quercus Branti* on some Gram Negative Bacteria. *Pakistanian Journal of Medicine Science*, 22, 429 - 32.
- Kotzekidou, P., Giannakidis, P. & Boulamatsis, A., 2008, Antimicrobial activity of some plant extracts and essential oils against foodborne pathogens in vitro and on the fate of inoculated pathogens in chocolate. *LWT*, 41, 119–127.
- Liu, Q. & Yao, H., 2007, Antioxidant activities of barley seeds extracts. *Food Chemistry*, 102, 32–737.
- Majhenic, L., Skerget, M. & Knez, Z., 2007, Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chemistry*, 104, 1258–1268.
- Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Dominguez, M., Sineiro, J. & Dominguez, H., 2001, Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72, 145–171.
- National committee for clinical laboratory standards., 2000, Methods for dilution antimicrobia susceptibility tests for bacteria that grow aerobically (5th ed.). Approved standard, M7-A5. Pennsylvania: Wayne.
- Oroojalian, F., Kasra-Kermanshahi., Azizi, M. & Bassami, M. R., 2010, Phytochemical composition of the essential oils from three *Apiaceae* species and their antibacterial effects on food-borne pathogens. *Food Chemistry*, 120, 765–770.
- Prasad, K.N., Yang, B., Dong, X., Jiang, G., Zhang, H., Xie, H. & Jiang, Y., 2009, Flavonoid contents and antioxidant activities from *Cinnamomum* species. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10, 627-632.
- Rakic, S., Petrovic, S., Kukic, J., Jadranin, M., Tesevic, V., Povrenovic, D. & Siler-Marinkovic, S., 2007, Influence of thermal treatment on phenolic compounds and antioxidant properties of oak acorns from Serbia. *Food Chemistry*, 104, 830-834.
- RuMPaoa, R.G.O., Cornago, D.F. & Geronimo, I.M., 2009, Phenolic content and antioxidant capacity of Philippine potato (*Solanum tuberosum*) tubers. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22, 546-550.
- Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J. A. & Saura-Calixto, F., 1999, Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. *Food Research International*, 32, 407–412.
- Shahidi, B.G., Aghighi, S. & Karimi Nik, A., 2004, Antibacterial and Antifungal Survey in Plants used in Indigenous Herbal-Medicine of South East Regions of Iran. *Journal of Biological Science*, 4, 405 - 12.
- Singh, S. & Singh, R.P., 2008, In Vitro Methods of Assay of Antioxidants: An Overview. *Food Reviews International*, 24, 392-415.
- Slinkard, K. & Singleton, V. L., 1977, Total phenol analysis; automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology & Viticulture*, 28, 49-55.
- Sroka, Z. & Cisowski, W., 2003, Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food & Chemical Toxicology*, 41, 753-758.
- Thoo, Y.Y., Ho, S.K., Liang, J.Y., Ho, C.W. & Tan, C.P., 2010, Effect of binary solvent extraction system, extraction

- time and extraction temperature on phenolic antioxidant capacity from mengkudu (*Morinda citrifolia*). *Food Chemistry*, 120, 290-295.
- Wen, A., Delaquis, P., Stanich, K. & Toivonen, P., 2003. Antilisterial activity of selected phenolic acids. *Food Microbiology*, 56, 305-311.
- Yildirim, A., Mavi, A. & Kara, A.A., 2001, Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 49, 4083-4089.
- Zhou, K. & Yu, L., 2004, Effects of extraction solvent on the wheat bran antioxidant activity estimation. *LWT*, 37, 717-721.

## Evaluation of Antiradical and Antimicrobial Activity of Methanolic Extract of Two Acorn Varieties and Detection of Phenolic Compound with High Performance Liquid Chromatography

M. Ghaderi<sup>1\*</sup>- A. Sadeghi Mahoonak<sup>2</sup>- M. Aalami<sup>3</sup> - M. Khomeiri<sup>4</sup>- R. Rezaei<sup>5</sup>

Received: 29-11-2010

Accepted: 25-7-2011

### Abstract

In this study, total phenolics and flavonoids content, antiradical and antimicrobial activity of methanolic extract of two Iranian acorn varieties, namely *Quercus.castaneifolia* var *castaneifolia* and *Quercus.branti* var *persica* were evaluated. Total phenolic and flavonoid content and extraction yield of methanolic extract of *castaneifolia* variety (MC) were significantly higher than that of the extract of *persica* variety (MP). Extracts were also tested for their antioxidant activities using scavenging activity of 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl and compared with synthetic antioxidant namely BHA and BHT. EC<sub>50</sub> values for MC, MP, BHA and BHT were 42.84, 70.40, 89.46 and 41.73 mg/ml, respectively. The extracts also showed good antimicrobial activity against all of tested microorganisms and the tested gram-negative bacteria was more resistant to the inhibitory effect of extracts. The ranges of minimum inhibitory concentration (MIC) of the extracts were 0.312-5 and 1.25-5 mg/ml for MC and MP, respectively. There was no difference between the MIC of MC and MB extract against *Salmonella typhi* and *Shigella dysenteriae* but MC extract showed the strongest activity on *Escherichia coli* and *Yersinia enterocolitica* at lower concentration. MP extract at concentration of 5mg/ml had bactericidal effect on all of gram negative bacteria (except *Citrobacter*). The most efficient bactericidal activity of MC extract was against *Bacillus cereus*, with MBC = 0.312 mg/ml while *Shigella dysenteriae* had the highest MBC (10mg/ml). A high-performance liquid chromatography was used for determination of phenolic acids of extracts. gallic, caffeic, *p*-coumaric and chlorogenic acid were found in MC and Gallic, caffeic, chlorogenic and sirinjjic acid were detected in MP extract.

**Keywords:** Acorn fruit, Antimicrobial activity, Gallic acid, Methanolic extract, Phenolic Compounds

1&5- Former MSc Students, Dept. of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural sciences & Natural Resources, Gorgan, Iran.

(\*- Corresponding author Email: mghaderi\_gh@yahoo.com)

2&3- Assistant Professor, Dept. of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Gorgan, Iran.

4- Associate Professor, Dept. of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Gorgan, Iran.