نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد 31، شماره 1، بهار 1396، ص. 166-158
شاپا: 4730 - 2008

Journal of Horticultural Science
Vol. 31, No. 1, Spring 2017, P. 158-166
ISSN: 2008 - 4730

تاثیر حلال‌های مختلف بر میزان ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی اکسیدانی میوه عناب (*Ziziphus jujube* Miller)

غلامحسین داوری نژاد [1*] - سیده فائزه تقی زاده [2] - جواد اصیلی [3]

تاریخ دریافت: 1394/04/21
تاریخ پذیرش: 1395/08/10

چکیده

این تحقیق به منظور بررسی اثر تیمار حلال‌های متانول، اتانول، استون (50، 90 و 100 درصد) و آب مقطر بر روی میزان ترکیبات آنتی اکسیدانی (فنل کل، تانن ها، فلاونوئیدها، آنتوسیانین ها) میوه عناب (*Ziziphus jujube* Miller)، انجام شد. فعالیت آنتی اکسیدانی هر یک از عصاره‌ها نیز به روش‌های DPPH وFRAP مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که استون 50 درصد در استخراج ترکیبات فنل و فلاونوئید کل به ترتیب با مقادیر (798/20 میلی گرم گالیک اسید در 100 گرم ماده خشک) و (1871/73 میلی گرم کوئرستین در 100 گرم ماده خشک)، بهترین عملکرد را در میان سایر حلال‌ها داشته است. استخراج آنتوسیانین، با متانول 50 درصد (6/31 میلی گرم سیانیدین 3- گلوکوزید در 100 گرم ماده خشک) و استخراج تانن با متانول 100 درصد (669/4 میلی گرم کاتکین در 100 گرم ماده خشک)، دارای بالاترین بازده استخراج بوده است. در تمامی موارد آب از حداقل قابلیت استخراج متابولیت‌های ثانویه در بین سایر حلال‌ها برخوردار بود. در بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی میوه عناب به دو روش DPPH و FRAP مشخص گردید که خاصیت آنتی اکسیدانی آن‌ها مستقیما تحت تاثیر مقادیر ترکیبات فنلی قرار گرفته است. در میان حلال‌های مورد استفاده، استون 50 درصد بهترین بازده را در روش DPPH (IC50=29/02) و روش FRAP (5/11 میلی مول آهن II در 100 گرم ماده خشک) نسبت به سایر حلال‌ها داشت. بر اساس نتایج می‌توان گفت درصد مهار کنندگی DPPH و FRAP با کاهش غلظت حلال‌های متانول و استون رابطه مستقیم دارد. نتایج این تحقیق نشان داد که تفاوت در نوع، خلوص و قطبیت حلال‌ها و تفاوت در جزئیات روش استخراج عصاره (مانند زمان استخراج، سرعت اختلاط، نسبت میزان پودر به حلال و اندازه ذرات پودر) بر میزان استخراج متابولیت‌های ثانویه تاثیر می‌گذارند.

واژه‌های کلیدی: آنتوسیانین، تانن، روبشگری رادیکال‌های آزاد، فلاونوئید، فنل

مقدمه

عناب[4] یکی از چهل گونه متعلق به خانواده رامناسه[5] می‌باشد. میوه ی آن ملایم و شیرین است. عناب از گذشته‌های دور به عنوان گیاه دارویی مصرف داشته و در کشورهای شرق آسیا از آن در درمان بیماری‌هایی از قبیل اختلالات کبدی، کم خونی و تنگی نفس استفاده می‌شده است (42 و 49). از میوه گیاه عناب ترکیب‌های تری ترپنوئیدی، فلاونوئیدی و آلکالوئیدی استخراج شده است. همچنین نوعی ترکیب فنیل گلیکوزیدی با عنوان ژوژوفنوزید نیز از میوه عناب به دست می‌آید، استخراج 8 نوع فلاونوئید از میوه عناب بخشی از ویژگی‌های دارویی آن را به خواص آنتی اکسیدانی این ترکیب‌ها نسبت می‌دهد (5). آنتی اکسیدان‌ها موادی هستند که در غلظت‌های کم، قادر به پیشگیری و یا به تاخیر انداختن اکسیداسیون ناشی از رادیکال‌های آزاد می‌باشند و به این ترتیب روند پیشرفت بیماری‌های ذکر شده را کند یا متوقف می‌سازند. امروزه استفاده از آنتی اکسیدان‌های مصنوعی بسیار رواج یافته است. لیکن مطالعات متعدد حاکی از سمیت این آنتی اکسیدان‌ها می‌باشد (8). بر اساس یافته‌های موجود اثرات حفاظتی آنتی اکسیدان‌ها که بسیار بیشتر از ویتامین‌ها نیز می‌باشد بر اهمیت بالقوه این مواد در بین میوه‌ها تاکید دارد. از مواد آنتی اکسیدانی مهم موجود در میوه‌ها می‌توان به پلی فنل‌ها (فلانون، فلاون، ایزوفلاون، فلاونول، کاتکین، فلاوان، بی فلاوان

1 و 2 - استاد و دانشجوی دکتری گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: (Email: Davarynej@um.ac.ir
3- دانشیار گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
DOI: 10.22067/jhorts4.v0i0.47986
4- *Ziziphus jujuba* Miller
5- Rhamnaceae

و...) و آنتوسیانین‌ها اشاره کرد (46). اکثرگیاهانی که حاوی مشتقات فنلی هستند قابلیت‌های آنتی اکسیدانی بالایی را نیز از خود نشان می‌دهند (12). تحقیقات نشان داده اند که کمیت و کیفیت آنتی اکسیدان‌های پلی فنلی میوه‌ها به طور معنی‌داری بیشتر از سبزیجات بوده است (37).

فنل‌ها از ترکیبات بسیار مهم گیاه هستند چون این ترکیبات توانایی جاروب کردن رادیکال‌های آزاد را دارند که به علت وجود گروه هیدروکسیلی می‌باشد. وجود ترکیبات فنلی ممکن است مستقیما در اثر آنتی اکسیداتیو نمونه دخیل باشد (11). مکانیسم عمل ترکیبات فنلی گیاه (که بعنوان آنتی اکسیدان عمل می‌کنند) عمدتا شامل فعالیت جاروب کردن رادیکال‌های آزاد، خصوصیات کلات کنندگی فلز، توانایی تنظیم بیان ژن و نقش کوآنتی اکسیدانی است (31). به نظر می‌رسد که رابطه نزدیکی میان خاصیت آنتی اکسیدانی با مقادیر ترکیبات فنلی وجود داشته باشد (6). مطالعات بسیاری در مورد ترکیبات آنتی اکسیدان صورت گرفته و حتی تعدادی آنتی اکسیدان سنتزی نیز به بازار عرضه شده است که به دلیل دارا بودن سمیت، مصرف آنها محدود گردیده است. به همین دلیل یافتن آنتی اکسیدان‌های طبیعی به ویژه از گیاهان و استفاده از آنها بخصوص در صنایع غذایی و دارویی بسیار مطلوب است تا علاوه بر داشتن اثرات بیولوژیک وسیع، احتمال ایجاد اثرات جانبی و مسمومیت با آنها بخصوص در غلظت‌های کنترل شده کاهش بیابد (28). قابل ذکر است که هیچ روش مورد آزمایشی به تنهایی جهت بررسی اثر آنتی اکسیدان کافی نیست و ترکیب چند روش متفاوت انتخاب خوبی جهت ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدان عصاره‌های مختلف می‌باشد (20). به طور کلی، برای استخراج پلی فنل‌ها از گیاهان، از آب و حلال‌های آلی مانند اتانول، متانول، استن و دی اتیل اتر استفاده می‌گردد (13، 43 و 45). در این میان تفاوت‌های آشکاری بین مقادیر ترکیبات فنلی در عصاره‌های مختلف مشاهده می‌شود که ناشی از نوع آماده سازی نمونه، روش و مدت زمان استخراج و خواص فیزیکوشیمیایی حلال‌های به کار رفته می‌باشد. در تحقیقی که توسط جیوانی و همکاران (17) به روی گیاه.*Etlingeraelatior* Jack انجام گرفت اثرات حلال‌های آلی متانول، استن (50 درصد، 90درصد و 100 درصد حجمی) و آب بر میزان ترکیبات فنلی و خاصیت آنتی اکسیدانی ارزیابی شد، اختلاف معنی‌دار بین نتایج به دلیل نوع حلال به کار رفته و ویژگی ترکیبات آنتی اکسیدانی موجود در گیاه گزارش شد. در مطالعه اثرات گروه‌های مختلف حلال (آب، متانول، اتانول، استن، اتیل استات، پترولئوم اتر، هگزان) بر خاصیت آنتی اکسیدانی، مقادیر فنل کل پوست بنه و بازده استخراج آن‌ها تفاوت معنی‌دار حاصل به قطبیت، ویسکوزیته و فشار بخارهای ویژه هر یک از حلال‌ها نسبت داده شد (36). از این رو معرفی یک نوع حلال با غلظت مشخص که دارای حداکثر عملکرد در استخراج ترکیبات فنلی بوده و بتواند بیشترین خاصیت آنتی اکسیدانی را در مورد گیاه معینی نشان دهد کار ساده ای نخواهد بود. در تحقیق حاضر به تعیین مقادیر ترکیبات فنلی و اثرات آنتی اکسیدانی عصاره‌های مختلف میوه عناب با دو روش DPPH و FRAPپرداختیم. حلال‌های مورد استفاده در این مطالعه با قدرت انتخابگری مختلف گزینش شدند. کالیشراکا (18) مطالعه ای به روی اثر حلال‌های مختلف بر استخراج ترکیبات فنلی هسته انگور از حلال‌های آب، اتانول خالص، اتانول 75 درصد ، استون 75 درصد، متانول، n بوتانول، دی اتیل اترف اتیل استات و ترکیبی از دی اتیل اتر و اتیل استات انجام داد. ترکیبات گالیک اسید، (+) کاتکین و (-) اپی کاتکین، پروسیانیدین‌های دیمری و تریمری و اپی کاتکین گالات را به وسیله HPLC شناسایی نمود. نتایج نشان داد متانول به عنوان بهترین حلال برای استخراج (+) کاتکین، (-) اپی کاتکین و و اپی کاتکین گالات می‌باشد، همچنین استون 75 درصد بیشترین پروآنتوسیانیدین را استخراج نموده است و اتانول 75 درصد سبب استخراج حداکثری مقادیر گالیک اسید شده است و در مجموع استون 75 درصد ترکیبات فنلی بیشتری را استخراج کرده است. پکیک و همکاران (33) نیز عصاره انگور را به وسیله حلال‌های استون- آب و اتیل استات –آب استخراج کردند. نتایج نشان داد که پروآنتوسیانیدین نمی تواند در غیاب آب به خوبی استخراج شود و افزایش آب به حلال راندمان استخراج را بالا می‌برد. اما افزایش بیش از حد آب سبب کاهش انتخابی بودن استخراج می‌شود. نتیجه کلی نشان داد که اتیل استات با 1 درصد آب به طور کاملا انتخابی پروآنتوسیانیدین‌ها را استخراج می‌کند.

مواد و روش ها

آماده سازی نمونه‌ها و تهیه عصاره‌های مختلف

میوه‌های تازه عناب[1] در اواخر تابستان سال 1393 از باغی در منطقه خنگ واقع در شهرستان بیرجند با موقعیت جغرافیایی 59 درجه و 48 دقیقه طول جغرافیایی و 32 درجه و 34 دقیقه عرض جغرافیایی و ارتفاع 1550 متر از سطح دریا جمع آوری شدند و به مدت 15 روز در دمای اتاق و در تاریکی خشک شدند، سپس به آزمایشگاه فارماکوگنوزی دانشکده داروسازی مشهد منتقل گردیدند. در آزمایشگاه شستشوی سطحی میوه‌ها با آب مقطر انجام شد. پس از جدا کردن هسته، به مدت 15 روز در دمای اتاق و تاریکی خشک شد، بعد از خشک شدن کامل، در دستگاه آسیاب برقی (توس شکن خراسان، ساخت ایران) پودر شدند. برای عصاره گیری از آب مقطر و غلظت‌های مختلف متانول، اتانول و استون (50 90و 100 درصد حجمی/حجمی) و روش پرکولاسیون استفاده گردید. برای بدست

1- *Ziziphus jujube* Miller

آوردن عصاره تام، 500 گرم از پودر خشک میوه خیسانده شده در پرکولاتور قرار داده شد. نقطه ی ختم عمل پرکولاسیون زمانی در نظر گرفته شد که حلال زلال و بی رنگ از پرکولاتور خارج گردید (35، 38، 39). حذف حلال برای حلال‌های متانول، اتانول و استن توسط دستگاه تبخیر در خلا[1](ساخت کشور سوئیس) انجام گرفت و در مورد آب مقطر حذف حلال با دستگاه فریز دراینگ[2](ساخت کشور دانمارک) انجام شد. سپس عصاره‌های خشک شده به ویال های شیشه‌ای منتقل شده و تا هنگام تحقیقات بعدی در دمای 4 درجه سانتی گراد نگه‌داری شد.

تعیین مقادیر فنل کل

طبق روش آنونیموس (1)، میزان فنل کل با استفاده از فولین سیو کالتو[3] تعیین شد. برای تهیه این معرف، محلول فولین سیوکالتو 2 نرمال ساخت کشورآلمان [4]با هم حجم خودش آب مقطر رقیق گردید.20 گرم کربنات سدیم (Na_2CO_3) ساخت کشور آلمان توزین و با آب مقطر به حجم 100 میلی‌لیتر رسانده شد، سپس توسط دستگاه سونیکاتور ساخت کشور انگلستان[5] به صورت محلول درآمد.100میکرولیتر از نمونه (غلظت‌های مختلف گالیک اسید یا عصاره) به لوله آزمایش منتقل و توسط آب مقطر حجم آن به 0/5 لیتر رسانده شد، سپس به ترتیب 0/25 میلی‌لیتر از معرف فولین سیوکالتو و 1/25 میلی‌لیتر سدیم کربنات 20 درصد به هر لوله افزوده شد. بعد از مخلوط کردن کامل محتویات لوله‌ها و بعد از گذشت 40 دقیقه در دمای اتاق و رسم منحنی استاندارد گالیک اسید با استفاده از غلظت‌های مختلف، جذب هر نمونه در طول موج 725 نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر UV/visساخت کشور انگلستان[6] اندازه‌گیری شد. میزان فنل کل هر نمونه با توجه به نمودار استاندارد برحسب معادل گالیک اسید (GAE) بیان می‌شود.

تعیین مقادیر فلاونوئید کل

طبق روش هونگو همکاران (14) میزان فلانونوئیدها براساس تشکیل کمپلکس فلاونوئید ـ آلومینیم که دارای جذب ماکزیمم در طول موج 430 نانو متر می‌باشند، تعیین شد. بدین منظور 2 گرم آلومینوم کلرید به دقت توزین و به بالن ژوژه 100 میلی‌لیتر منتقل و با متانول به حجم 100 میلی‌لیتر رسانده شد. برای رسم منحنی استاندارد غلظت های مختلف از کوئرستین استفاده شد. این غلظت‌ها شامل 100، 80، 40، 20 و10 میکروگرم در میلی‌لیتر بود. سپس، 1 میلی‌لیتر از نمونه با 1 میلی‌لیتر از محلول متانولی آلومینیوم کلراید 2 درصد مخلوط گردید و بعد از نگهداری در دمای اتاق به مدت 15 دقیقه، جذب محلول در طول موج 430 نانومتر توسط اسپکتروفتومتر UV/vis ساخت کشور انگلستان اندازه‌گیری شد. محتوای فلانوئیدها برحسب معادل کوئرستین (QE) بیان گردید.

تعیین مقادیر آنتوسیانین

بر اساس روشگیوستی و همکاران (10) مقادیر آنتوسیانین کل در عصاره‌های عناب مشخص شد. ابتدا 0/5 میلی گرم از عصاره با 3/5 میلی‌لیتر از محلول 0/025 مولار کلرید پتاسیم (pH=1) مخلوط شد. پس از 15 دقیقه جذب در طول موج 510 و 700 نانومتر توسط اسپکتروفتومتر UV/vis ساخت کشور انگلستان اندازه‌گیری شد. پس از آن عصاره‌ها به محلول بافر 0/025 استات سدیم در pH=4.5 اضافه گردید و مجددا جذب در طول موج 510 و 700 نانومتر قرائت شد. آنتوسیانین کل با استفاده از معادله 1 محاسبه گردید:

(1) آنتوسیانین کل(mg/ml) = $\frac{A \times MW \times DF \times 1,000}{\varepsilon \times C}$

روش محاسبه مقدار A از معادله 2 عبارت است از:

A= (A515- A700) pH1.0 - (A515- A700) pH4.5 (2)

MW وزن مولکولی سیانیدین 3- گلوکوزید است که آنتوسیانین غالب عناب می‌باشد و برابر 484/82 DF شاخص رقت نمونه‌ها بوده، ε ضریب جذب سیانیدین 3- گلوکوزید است و برابر 24825 و Cغلظت بافر بر حسب میلی گرم بر میلی‌لیتر[7] است. نتایج بر حسب معادل میلی گرم سیانیدین 3- گلوکوزید (c-3-gE) برای 100 گرم نمونه گزارش شد.

تعیین مقادیر تانن

برای تعیین مقادیر تانن در نمونه‌ها از روش vanillin – HCL که توسط برود هورست و همکاران (3) معرفی شد استفاده گردید. ابتدا 0/5 میلی گرم از عصاره به 3 میلی‌لیتر از معرف وانیلین (4 درصد وزنی/ حجمی، وانیلین در متانول) اضافه شد و کاملا مخلوط گردید. سپس 1/5 میلی‌لیتر HCL افزوده و خوب به هم زده شد. مخلوط به مدت 15 دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق نگهداری و بعد از آن جذب در طول موج 500 نانومتر توسط اسپکتروفتومتر UV/vis مدل Cecil ساخت کشور انگلستان اندازه‌گیری شد. مقادیر تانن نمونه‌ها بر حسب معادل کاتکین (CE) در 100 گرم نمونه بیان گردید.

1- Rottarry Buchi
2- Heto
3- Folin-Ciocalteu
4- Merck
5- Kerry
6- Cecil
7- mg/ml

تعیین فعالیت روبشگری رادیکال DPPH

2 میلی گرم از نمونه با 1 میلی‌لیتر محلول متانولی DPPH (0/2mM) مخلوط شد و این مخلوط به شدت تکان داده شد (22)، سپس همه نمونه‌ها در دمای اتاق و تاریکی به مدت 30 دقیقه نگهداری و جذب آنها در طول موج 517 نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر UV/vis اندازه‌گیری شد (38). درصد رنگ بری محلول DPPH طبق معادله 3 محاسبه می‌شود.

(3) $100\times(B_0 - B_1/B_0)$ = درصد مهار B_0 = جذب محلول کنترل منفی

B_1 = جذب مخلوط واکنش

ویتامینC و BHT به عنوان کنترل مثبت استفاده شدند.

تعیین میزان آنتی اکسیدان کل به روش FRAP

به منظور تهیه محلول استوک 3/1 گرم استات سدیم و 16 میلی‌لیتر اسید استیک گلایسیال در یک لیتر آب مقطر حل شد و pH محلول در حدود 3/6 تنظیم شد (بافر استات) سپس 31 میلی گرم TPTZ در 10 میلی‌لیتر اسید کلریدریک 40 میلی مولار حل شد و به منظور تهیه محلول 20 میلی مولار کلرید آهن، 5/41 گرم کلرید آهن در یک لیتر آب مقطر حل گردید. برای تهیه محلول استاندارد از سولفات آهن استفاده شد که 0/278 گرم سولفات آهن در یک لیتر آب مقطر حل شد و در نهایت محلول‌های استاندارد 125، 250، 500، 1000 میکرومولار بر لیتر تهیه گردید. محلول نهایی FRAP با مخلوط کردن 25 میلی‌لیتر بافر 2/5 میلی‌لیتر TPTZ و 2/5 میلی‌لیتر کلرید آهن آماده شد. سپس 250 میکرولیتر از محلول کار داخل ظروف پیلت ریخته شد و به آن 10 میکرولیتر از عصاره میوه (که حاوی 2/5 میلی‌لیتر عصاره و 6 میلی‌لیتر بافر فسفات بود) اضافه شد و به مدت 10 دقیقه در دمای 37 درجه سانتی گراد قرار گرفت و سپس میزان جذب در طول موج 593 نانومتر خوانده شد و در نهایت با رسم منحنی استاندارد میزان آنتی اکسیدان کل به دست آمد و بر اساس معادل میلی مول آهن در 100 گرم وزن تر بیان گردید (2).

تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی و با 3 تکرار انجام شد. آنالیز آماری با استفاده از نرم افزارSAS نسخه 9/1 و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD ($p<0.01$) صورت گرفت.

نتایج و بحث

فنل کل

اثر تیمار نوع حلال بر روی مقادیر فنل کل در سطح 5 درصد معنی‌دار بود (جدول 1). نتایج نشان داد که در عصاره‌های متانولی و استونی 50 درصد میوه عناب بیشترین مقادیر فنل کل گزارش شد. به طور کلی، استون 50 درصد بهترین عملکرد (798/20 میلی گرم گالیک اسید در 100 گرم ماده خشک) را در میان سایر حلال‌ها داشته و آب کمترین تاثیر را در آزاد سازی فنل کل داشته است. (جدول 1).

جدول 1- مقایسه میانگین اثر تیمارهای نوع حلال بر روی مقادیر فنل کل، فلاونوئید کل، آنتوسیانین و تانن کل میوه عناب

Table1- Mean comparation of selected solvent effects on total phenols, flavonoids, anthocyanin and tannins of *Ziziphus jujube* Miller fruit

حلال Solvent	غلظت Concentration	فنل کل Total phenol (mg GA/100g DW)	فلاونوئید کل Total Flavonoid (mg QE/100g DW)	آنتوسیانین Anthocyanin (mg C-3-gE/100g DW)	تانن کل Total Tannin (mg CA/100g DW)
متانول Methanol	100%	417.1±0.9f	884.00±0.01c	5.03±0.01c	669.4±0.02a
	90%	518.00±0.00d	733.11±0.02e	5.82±0.02b	603.46±0.00b
	50%	703.83±0.11b	807.24±0.01d	6.31±0.00a	382.14±0.03e
اتانول Ethanol	100%	205.1±0.18h	639.40±0.03g	3.08±0.005d	556.11±0.01c
	90%	350.07±0.71g	551.65±0.01ef	3.96±0.01c	482.11±0.03d
	50%	591.19±0.38c	719.41±0.02ef	5.01±0.02c	276.14±0.02f
استون Acetone	100%	187.28±0.005i	409.72±0.00h	0.89±0.01f	311.4±0.03e
	90%	601.42±0.02c	1109.11±0.00b	2.75±0.005e	236.07±0.01f
	50%	798.20±0.005a	1871.73±0.05a	4.00±0.00d	429.49±0.005c
آب Water		93.4±0.3h	206.12±0.00i	0.81±0.00i	49.5±0.00i

حروف مشابه در هر ستون نشاندهنده‌ی عدم معنی‌داری با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال 1% می‌باشد

Similar letters in each column show that there were no significant differences at P< 0.01

ممشلو و همکاران (25) نیز نتایجی را در میوه ازگیل گزارش نمودند، و بیشترین مقدار ترکیبات فنلی را توسط حلال استون 80

درصد استخراج کردند. نوع ترکیبات فیتوشیمیایی ویژه هر گیاه و مدت زمان استخراج می‌تواند نقش مهمی در انتخاب نوع حلال و غلظت آن داشته باشد. جیوانی و همکاران (17) در مطالعه ای به روی گیاه.*Etlingeraelatior* Jack بیشترین میزان ترکیبات فنلی را در عصاره استونی 50 درصد (687/00 میلی گرم گالیک اسید در 100 گرم ماده خشک) گزارش کردند. محمدی و همکاران (29) در نتایج بررسی‌های خود به روی میزان ترکیبات فنلی و قدرت آنتی اکسیدانی پوست میوه خرمالو نشان دادند که عصاره اتانولی از مقدار ترکیبات فنلی بیشتری نسبت به عصاره متانولی برخوردار بوده است. همچنین عصاره متانولی از راندمان استخراج بالاتری برخوردار بوده است. قادری قهفخری و همکاران (9) بیان نمودند که بیشترین مقدار ترکیبات فنلی به ترتیب در عصاره‌های متانولی (80 درصد)، اتانولی (70درصد) و آبی یک واریته بلوط[1] حاصل گردید و عصاره‌های حاصل، از این نظر اختلاف معنی‌داری داشتند. همچنین مقایسه میزان ترکیبات فنلی عصاره‌ها نشان داد، عصاره استونی، اتانولی و متانولی به ترتیب حاوی بیشترین مقدار ترکیبات فنلی و پروآنتوسیانیدین می‌باشند (23). تفاوت‌های موجود در مقادیر فنل کل در عصاره‌های گوناگون به واسطه نحوه آماده سازی نمونه‌ها و روش‌های استخراج است. اما آنچه از این نتایج بر می‌آید این است که قطبیت و ویسکوزیته بالای حلال در آزاد سازی مقادیر ترکیبات فنلی موثرند (13 و 45).

فلاونوئید کل

جدول 1 مقادیر فلاونوئید کل را در عصاره‌های مختلف میوه عناب نشان می‌دهد. حلال استون 50 درصد حداکثر مقدار فلاونوئید کل (1871/73 میلی گرم کوئرستین در 100 گرم ماده خشک) را در خود نشان دادند. با افزایش غلظت حلال کاهش معنی‌داری در مقادیر فلاونوئید مشاهده گردید، که در عصاره متانولی این افزایش مشاهده نگردید. محققین تفاوت‌های مشاهده شده بین عصاره‌های مختلف را به تفاوت در قطبیت حلال‌های مورد استفاده مربوط می‌دانند. استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی از مواد گیاهی به حلالیت این ترکیبات در حلال‌های مختلف بستگی دارد. به علاوه قطبیت حلال‌های مورد استفاده نقش کلیدی را در افزایش حلالیت این ترکیبات بازی می‌کند (15، 16 و 41). سلمانیان و همکاران (40) به این نتیجه رسیدند که نوع حلال مورد استفاده جهت استخراج تاثیر معنی‌داری ($p<0.05$) برمقدار ترکیبات فلاونوئیدی عصاره‌های اتانولی و متانولی زولنگ[2] داشته است بازده استخراج عصاره اتانولی سبزی زولنگ مورد بررسی در مقایسه با بازده استخراج عصاره اتانولی چندین گونه رشد یافته در ترکیه بالاتر بود (21). از آن جایی که هیچ یک از روش‌های رنگ سنجی نمی تواند همه انواع فلاونوئیدها را شناسایی کند و در روش رنگ سنجی آلومینیوم کلرید، تنها فلاون‌ها و فلاونول‌ها قادرند کمپلکس پایداری با آلومینیوم کلرید را تشکیل دهند و از نظر کمی اندازه گیری شوند (4)، لذا می‌توان نتیجه گرفت میزان این گروه از فلاونوئیدها در عصاره متانولی زولنگ بالاتر از سایر فلاونوئیدها است. عصاره متانولی سبزی زولنگ با بیشترین مقدار ترکیبات فلاونوئیدی از فعالیت مهار کنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH و قدرت احیا کنندگی آهن بالاتری نیز برخوردار بود (40). نظری و همکاران (30) در بررسی خواص آنتی اکسیدانی و میزان فنل و فلاونوئید کل پوست درختان اکالیپتوس[3] و کاج جنگلی[4] دریافتند که عصاره اتانولی اکالیپتوس دارای مقادیر بیشتری از فنل و فلاونوئید تام می‌باشد.

آنتوسیانین

اثرات تیمار نوع حلال بر روی مقادیر آنتوسیانین کل در سطح 5 درصد معنی‌دار بود (جدول 1). نتایج نشان داد که عصاره‌های متانولی 50 درصد (6/31 میلی گرم سیانیدین 3- گلوکوزید در 100 گرم ماده خشک)، بالاترین عملکرد را از لحاظ استخراج مقادیر آنتوسیانین نشان دادند و آب دارای حداقل بازده بود. (جدول 1). متیویر و همکاران (27) متانول را به عنوان موثرترین حلال برای استخراج آنتوسیانین از عصاره انگور معرفی و تاثیر آن را 73 درصد بیشتر از آب گزارش کردند. زارع زاده مهریزی و همکاران (48) در بررسی نتایج پژوهش انجام شده به روی عصاره پوست انار بیان کردند که در مقایسه با متانول اتیل استات و آب، اتانول به عنوان قطبی ترین حلال مورد استفاده در این تحقیق علاوه بر این که سبب بیشترین راندمان استخراج بوده بالاترین میزان آنتوسیانین را از پوست خشک انار استخراج نموده است. تحقیقات انجام شده به روی گیاه *Etlingeraelatior* Jack ازعملکرد بهتر استون 50 درصد در مقایسه با غلظت‌های مختلف اتانول و متانول خبر می‌دهد (17).

ژوو و همکاران (50) در بررسی به روی عصاره سبوس گندم و نیز تورکمن و همکاران (45) در مطالعه ای که به روی عصاره‌های مختلف چای صورت گرفت، استون 50 درصد را به عنوان موثرترین حلال گزارش کردند. این تفاوت ممکن است ناشی از اختلاف در روش‌های آماده سازی عصاره و زمان عصاره گیری باشد جیوانی و همکاران (17). قابلیت استخراج متابولیت‌های ثانویه و از جمله پلی فنل‌ها تا حد زیادی متاثر از قطبیت و ویسکوزیته حلال هاست (13و 45).

1- *Q.branti var.persica*
1- *Eryngium caucasicum*Trautv

2- *Eucalyptus camaldulensis*
3- *pinus sylvestris*

جدول 2- مقایسه میانگین اثر تیمارهای نوع حلال بر روی خاصیت آنتی اکسیدانی میوه عناب
Table 2-Mean comparation of selected solvent effects on antioxidant activity of *Ziziphus jujube* Miller fruit

حلال Solvent	غلظت Concentration	IC50	FRAP (mmol Fe^{2+}/100g DW)
متانول Methanol	100%	39.86±0.01h	2.05±0.01f
	90%	34.24±0.01h	2.18±0.01f
	50%	25.93±0.01i	3.89±0.005e
اتانول Ethanol	100%	57.79±0.02f	1.25±0.04f
	90%	42.75±0.02g	1.87±0.01f
	50%	30.65±0.02hi	2.49±0.01f
استون Acetone	100%	87.03±0.02c	1.01±0.01f
	90%	39.60±0.01h	4.56±0.3e
	50%	25.09±0.02ij	5.11±0.04e
آب Water		132.01±0.04a	1.57±0.00f
BHT		13.47±0.00j	15.06±0.01a
Vit C		9.17±0.00k	10.33±0.00b

حروف مشابه در هر ستون نشاندهنده‌ی عدم معنی‌داری با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال 1% می‌باشد.
Similar letters in each column show that there were no significant differences at P< 0.01.

تانن کل

اثر تیمار حلال‌های به کار رفته در آزمایش بر روی مقادیر تانن کل در سطح 5 درصد معنی‌دار بود (جدول 1). مقادیر تانن نیز در عصاره‌های آبی در مقایسه با سایر عصاره‌ها در کمترین سطح گزارش شد. اما در عصاره‌های متانولی بیشتر از بقیه بود. سطوح تانن با کاهش غلظت از (669/4 میلی گرم کاتکین در 100 گرم ماده خشک) در عصاره متانولی 100 درصد به (382/14 میلی گرم کاتکین در 100 گرم ماده خشک) در عصاره متانولی 50 درصد کاهش یافته است، که این مقادیر تفاوت معنی‌داری را در مقایسه با عصاره‌های استونی نشان می‌دهند. نلس میلوآ و همکاران (30) نیز گزارش کردند که حلال اتانول به منظور استخراج تانن برگ گیاه گواوا[1] عملکرد بهتری نسبت به استون داشته است. نتایج حاصل نشان می‌دهند که تانن‌ها به دلیل دارا بودن حلقه‌های بنزنی در مولکول خود، نوعی ویژگی آبگریزی دارند. از این رو به نظر می‌رسد که مناسب ترین حلال برای استخراج تانن ها، حلال‌هایی هستند که خاصیت آبدوستی دارند. در این میان و به منظور استخراج حداکثری ترکیبات حاوی تانن، متانول و استون بالاترین بازده را در مقایسه با حلال‌های آبی دارا می‌باشند.

فعالیت آنتی اکسیدانی به دو روش DPPH و FRAP

نتایج حاصل از بررسی‌ها به دو روش DPPH و FRAP در این تحقیق نشان داد که خاصیت آنتی اکسیدانی مستقیما تحت تاثیر مقادیر ترکیبات فنلی قرار گرفته است. از شاخص IC50 به منظور بیان اثرات مهار کنندگی رادیکال‌های آزاد در روش DPPH استفاده گردید. بر این اساس هر چه مقدار IC50 کمتر باشد قدرت بازداری عصاره بیشتر بوده است. در میان حلال‌های مورد استفاده نیز استون 50 درصد بهترین بازده را در روش DPPH نشان داد (IC50=29/02). در مورد روش FRAP نیز غلظتی از حلال مذکور با عملکرد (5/11 میلی مول آهن IIدر 100 گرم ماده خشک) به مراتب از سایر حلال‌ها عملکرد بهتری داشت. بر اساس نتایج جدول 2 می‌توان گفت درصد مهار کنندگی DPPH و FRAP با کاهش غلظت حلال‌های متانول و استون رابطه مستقیم دارد.

ممشلو و همکاران (25) در بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی میوه ازگیل به این نتیجه رسیدند که عصاره استونی پس از آنتی اکسیدان سنتزی BHT در تمام غلظت‌ها دارای قدرت مهار کنندگی بالاتری نسبت به عصاره‌های دیگر داشت.

خانوی و همکاران (19) در مطالعه ای که به روی خواص آنتی اکسیدانی گونه‌های مختلفی خانواده لامیاسه[1] انجام داد، بیان کرد که مقادیر ترکیبات فنلی در عصاره اتانولی نسبت به عصاره متانولی بیشتر

1- Psidium guava

بوده است.

در مطالعه ای به روی جاروب کردن رادیکال‌های آزاد عصاره‌های آنتی اکسیدانی پوست فندق که به وسیله حلال‌های مختلفی مورد استخراج قرار گرفته بودند نیز مشخص گردید که عصاره متانولی هر چند راندمان استخراج بالاتری نسبت به عصاره‌های اتانولی داشت اما دارای ترکیبات فنلی و قدرت رادیکال گیرندگی کمتری نسبت به عصاره به دست آمده از حلال اتانول بود (24). پشل و همکاران (34) با بررسی اثر پنج حلال آب، متانول، اتانول، استون و هگزان در استخراج عصاره از 13 نوع ضایعات میوه و سبزی و واحدهای فرآوری مواد گیاهی نشان دادند مطابق انتظار حلال‌های قطبی آب و متانول بیشترین بازده استخراج را داشتند. یائو و همکاران (47) به وسیله حلال‌های با قطبیت متفاوت (استون، اتانول، متانول) عصاره ی دانه‌های جو را استخراج کردند. نتایج تحقیقات آن‌ها نشان داد که بیش ترین راندمان عصاره گیری مربوط به عصاره ی متانولی است.تینگ و همکاران (44) به بررسی خصوصیات آنتی رادیکالی و آنتی اکسیدانی گندم سیاه به وسیله ی حلال‌های متفاوت (استون، بوتانول، اتانول، متانول، اتیل استات) پرداختند. نتایج مطالعات آن‌ها نشان داد که بیشترین راندمان استخراج مربوط به عصاره ی متانولی است. ماساکو و همکاران (26) راندمان استخراج عصاره استونی ریشه گیاه سنا را 1/87 درصد گزارش دادند. فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های متانولی، اتانولی و استونی دانه‌های جو نیز با دو روش مهار رادیکال‌های آزاد و قدرت احیاکنندگی مورد بررسی قرار گرفت و با اسید آسکوربیک و BHT مقایسه شد. نتایج حاکی از آن بود که در هر دو روش به ترتیب اسید اسکوربیک، BHT و عصاره استونی بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی را داشته و اختلاف معنی‌داری بین عصاره‌های اتانولی و متانولی مشاهده نگردید (23).

نتیجه گیری کلی

نتایج این تحقیق نشان داد که تفاوت در نوع و خلوص حلال ها، تفاوت در جزئیات روش استخراج عصاره (مانند زمان استخراج، سرعت اختلاط، نسبت میزان پودر به حلال و اندازه ذرات پودر) بر میزان استخراج ترکیبات فنولیک تاثیر می‌گذارند به طوری که در استخراج ترکیبات فنل و فلاونوئید کل استون 50 درصد بهترین عملکرد را در میان سایر حلال‌های به کار رفته داشته است و در مورد استخراج آنتوسیانین و تانن، به ترتیب متانول 50 درصد و متانول 100 درصد دارای بالاترین بازده استخراج بودند. در مورد استخراج متابولیت‌های ثانویه از میوه عناب آب از حداقل ظرفیت ممکن در بین سایر حلال‌ها برخوردار بوده است. بر این اساس می‌توان از استون 50 درصد به عنوان بهترین حلال در استخراج ترکیبات فنل و فلاونوئید و از متانول 50 درصد و 100 درصد به ترتیب به منظور استخراج آنتوسیانین و تانن استفاده نمود.

منابع

1-Anonymus. 2000. Quantification of Tannins in Tree Foliage. p. 4-5.

2-Benzie I.F., and Strain J.J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of Antioxidant Power: The FRAP assay. Analytical Biochemistry, 239: 70-76.

3-Broadhurst R.B., and Jones W.T. 1978. Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. Journal of the Science of Food and Agriculture, 29: 788-794.

4-Chang C., Yang M., Wen H., and Chern J. 2002. Estimation of total flavonoid contenting propolis by two complementary colorimetric methods. Food and Drug Analysis, 10:178-182.

5- Cheng Q. 2000. Flavonoids from *Ziziphus jujube* Mill var. *Spinosa*. Tetrahedron, 56:8915-8920.

6- Davarynejad G., 2012. Investigation of Antioxidant Capacity and Some Bioactive Compounds of Iranian Pistachio (*Pistachio vera*L.) Cultivars. Notulae Scientia Biologicae, 4 (4): 62-66.

7-Ebrahimi S., Sadeghi H., Pourmahmoudi A., Askariyan SH., and Askari S. 2010. Protective effect of *Zizphus Vulgaris* extract, on liver in laboratory rates. Journal of Science Souvenir, 16(2): 172-179. (In Persian with English abstract)

8-Gate L., Paul J., Nguyen Ba G., Tew D.K., and Tapiero H. 1999. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. Biomed &Pharmacother, 53:169-180.

9-Ghaderi Gh, farokhi M., Sadeghi Mahoonak A.R., Alami M., Ghorbani M., and Azizi M.H. 2012. Determination of antiradical activity, reducing power and total antioxidant activity of phenolic extracts of Acorn Fruit (*Q.brantiverpersica*). Journal of Research of Food Science and Technology, 21(1): 93-104. (in Persian with English abstract)

10-Giusti M.M., and Wrolstad R.E. 2001. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. In: Wrolstad, R.E. (Ed.), Current Protocols in Food Analytical Chemistry. John Wiley & Sons, New York. Unit F1. 2.1-13.

1- Lamiaceae

11- Gulcin I., Oktay M., Kufrevioglu I.Ö., and Aslan A. 2002.Determination of antioxidant activity of Lichen *Cetriariaislandca* (L) Ach, Journal of Ethnopharmacology, 79:325-329.
12- Guo C., Cao G., Sofic E., and Prior R. 1997. High performance liquid chromatography coupled with colometric array detection of electroactive components in fruits and vegetables: Relationship to oxygen radical absorbance capacity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54:1787-1796.
13- Hayouni A., Abedrabba M., Bouix M., and Hamdi M. 2007. The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercuscoccifera* L. and *Juniperusphoenicea* L. fruit extracts. Food Chemistry, 105:1126–1134.
14-Huang D.J., Chun-Der L., Hsien-Jung C., and Yaw-Huei L. 2004. Antioxidant and antiproliferative activities of sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] LamTainong 57') constituents. Botanical Bulletin of Academia Sinica, 45.
15-Huang D., Ou B., and Prior R.L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53:1841–1856.
16-JavanmardiL., Stushnoff C., Locke E., and Vivanco J.M. 2003. Antioxidant activity and total phenolic contents of Iranian *Ocimumaccessions*. FoodChemistry, 83:547–550.
17- JeevaniOsadeeWijekoon M.M., Bhat R., and KarimA.A. 2011. Effect of extraction solvents on the phenolic compounds and antioxidant activities of bungakantan (*Etlingeraelatior* Jack.) inflorescence. Journal of Food Composition and Analysis, 24:615–619.
18- Kallithraka S., Viguera C. G. and Bakker, J. 1995. Survey of Solvents for the extraction of grape seed phenolics. Phytochemical analysis, 6:265-267.
19-KhanaviM., HajimahmoodiM. Cheraghi-NiroomandM., KargarZ. AjaniY.HadjiakhoondiA. andOveisi, M.R.2009. Comparisonoftheantioxidantactivityandtotalphenoliccontentsinsome Stachys species.AfricanJournalofBiotechnology, 8(6):1143-1147.
20-Kulisic T., Radonic A., Katalinic V. and Milos M. 2004.Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil.Food Chemistry, 85: 633-640.
21-KüpeliE., KartalM. AslanS. AndYesilada, E.2006.Comparativeevaluationoftheanti-inflammatoryandantinociceptiveactivityofTurkishEryngiumspecies.Journalof Ethnopharmacology, 107:32–37.
22-Liu X., Zhao M., Wang J., Yang B. and Jiang Y. 2008. Antioxidant activity of methanolic extract of emblica fruit (*Phyllanthusemblica* L.) from six region in China. Journal of Food Composition and Analysis, 21: 219-228.
23-Liu Q., and Yao H., 2007. Antioxidant activities of barley seeds extracts. Food Chemistry, 102: 732-737.
24-Locatelli M., Travaglia F., Coisson J.D., Martelli A., Stevigny C., and ArlorioM.2010. Analytical methods total antioxidant activity of hazelnut skin (*NocciolaPiemontePGI*): Impactof different roastingconditions.Food Chemistry, 119:1647-1655.
25-Mamashloo S., SadeghiMahoonak A.R., Ghorbani M., Alami M., and Khomeiri M. 2013.Theevaluation of antioxidant properties and stability of phenolic compounds from medlar (*Mespilusgermanica* L.) fruit. Journal of Research and Innovation in Food Science and Technology, 1(3): 219-228. (in Persian with English abstract)
26-MasokoD.,GalooloS.S.,MokgothoMP.,Eloff J.N.,HowardR.l., andMamparaL.J.2010.Evaluationof the antioxidant, antibacterial andanti-proliferativeactivitiesoftheacetoneextractoftherootsofsennaitulical(fabaceue).Journal of TraditionalComplementary and Alternative Medicine, 7(2):138-148.
27-Metivier R.P., Francis F.J., and Clydesdale F.M. 1980.Solvent extraction of anthocyanins from wine pomace. Journal of Food Science, 45: 1099-1100.
28-Milos M., Mastelic J., and Jerkovic I. 2000. Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from oregano (*Origanum vulgar* L. ssp. hirtum). Food chemistry, 71: 79-83.
29-Mohamadi M., ElhamiRad A.H., and Pourfallah Z. 2012.Determinationof total phenolic compound contents and antioxidant capacity of persimmon skin.Graduated of Food Science, 2(5): 41-55.(In Persian with English abstract)
30-Nazari S., Nazarnezhad N.J., and Ebrahimzadeh M.A. 2013.Evaluationof antioxidant properties andtotal phenolic and flavonoidscontentof *Eucalyptuscamaldulensis*and *Pinussylvestris*bark. IranianJournal of Wood and PaperScienceResearch, 28(3): 522-533. (In Persian with English abstract)
31- Neergheen S.V., Bahorun T., Jen S.L. and Arouma, I.O. 2007.Bioefficacy of Mauritian endemic medicinal plant: Assessment of their phenolic contents and antioxidant potential. Pharmaceutical Biology, 45:9-17.
32-MailoaMeigy N., Meta M., Amran L., and Natsir D. 2013. Tannin Extract of guava leaves (*PsidiumGuajava*L) variationwithconcentrationorganic solvents. International Journal of Scientific & Technology Research, 2 (9):106-110.
33- Pekic B. and Kovac V. 1997. Study of the extraction of Proanthocyanidins from grape seeds. Food Chemistry, 61:201-206.
34- Peschel W., Rabaneda F., Diekmann W., PlescherA.,GartzıaI.,Jimenez D.,Raventos L., Buxaderas S., and CodinaC.2006. Anindustrialapproachinthesearchofnaturalantioxidants from vegetable and fruit wastes. Food Chemistry,97(1):137 –50.
35- Prachayasittikul S., Buraparuangsang P., Worachartcheewan A., Isavankura-Na-Ayudhya C., Ruchirawat S. and Prachayasttikul V. 2008. Antimicrobial and antioxidative activities of bioactive constituents from

Hydnophytumformicarum Jack. Molecules, 13: 904-921.
36- Rezaie M., Farhoosh R., Iranshahi M., Sharif A., and Golmohamadzadeh S. 2015. Ultrasonic-assisted extraction of antioxidative compounds from Bene (*Pistaciaatlantica* subsp. mutica) hull using various solvents of different physicochemical properties. Food chemistry, 173:577-583.
37-Rimpapa Z., Toromanovic J., Tahirovic I., Sapcanin A., and Sofic E. 2007.Total content of phenols and anthocyanin in edible fruits from Bosnia. Bosnia journal of basic medical sciences, 7(2):119-122.
38-Rojas G., Levaro J., Tortoriello J. and Navarro V. 2001. Antimicrobial evaluation of certain plants used in Mexican traditional medicines for the treatment of respiratory disease. Journal of Ethnopharmacology, 74: 97-101.
39-Saha K., Lajis N.H., Israf D.A., Hamzah A.S., Khozirah S., Khamis S. and Syahida A. 2004. Evaluation of antioxidant and nitric oxide inhibitory activities of selected Malaysian medicinal plant. Journal of Ethnopharmacology, 92: 263-267.
40- Salmanian Sh., SadeghiMahoonak A.R., Jamson M., and TabatabaeeAmid B. 2013. Identificationandquantificationofphenolicacids, radical scavenging activity andferric reducing power of *Eryngium caucasicum* Trautv.ethanolic and methanolic extracts. Journal of Research and Innovation in Food Science and Technology, 2(2):193-204. (In Persian with English abstract)
41-Silva E.M., Souza J.N.S., Rogez H., Rees J.F. and Larondelle Y .2006. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plants pecies from the Amazonian region.FoodChemistry, 101:1012–1018.
42-Samsam Shariat H. 2006. Herbalmedicine that classified according to their usage in traditional and modern medicine. Isfahan, Chaharbagh. P.137.
43- Sun T., and Ho H. 2005. Antioxidant activities of buckwheat extracts. Food Chemistry, 90:743–749.
44-Ting S. Chi-Tang H. 2005. Antioxidant activities of buckwheatextracts.Food Chemistry, 90:743- 749.
45- Turkmen, N., Sari F., and Velioglu Y.S. 2006. Effects of extraction solvents on concentrationand antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. Food Chemistry, 99:835–841.
46- Wang H., Cao G., and Prior R.L. 1996.Total antioxidant capacity of fruits.Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44:701-705.
47- Yao H., Qing L.2007. Antioxidantactivitiesofbarleyseedsextracts.FoodChemistry, 102:732-737.
48-Zarezadeh Mehrizi R.A., Emam-Djomeh Z., ShahediBaghKhandan M., Loni E., Akhavan H.R., and Biabani J. 2015. Identification and quantification of anthocyanin in pomegranate peel extract. Journal of Food Science and Technology, 49(12): 31-40. (in Persian with English abstract)
49-ZargariA.Herbalremedies.6th ed.Tehran: University Press, 1998:587-607.
50- Zhou K., and Yu L. 2004. Effects of extraction solvent on wheat bran antioxidant activity estimation.Lebensmittel-Wissenschaft und-Technology, 37:717–721.