

## The Total Phenolic Content, Total Flavonoids and the Antioxidant Capacity in Two Wild Species of Raspberry, *Rubus persicus* and *R. caesius*, at Different Maturity Stages of Fruits

Hamed Dadkhah Aghdash<sup>1\*</sup>, Mahdi Daemi Saeidabad<sup>2</sup> and Mohsen Falahati Anbaran<sup>3</sup>

- 1- **\*Corresponding Author:** Ph.D. Student of Plant Physiology, Department of Plant Sciences, Faculty of Biology science, University of Tarbiat Modares, Tehran, Iran
- 2- M.Sc. of Plant Sciences, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran
- 3- Assistant Professor, Department of Plant Sciences, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran

Received: 24 May, 2018

Accepted: 9 February, 2019

### Abstract

#### Background and Objectives

Antioxidants can harness the oxidative stress caused by free radicals by releasing single electrons and hydrogen ions. Myriad plants including vegetables and fruits express enzymatic and non-enzymatic antioxidant properties which are used by humans to maintain health.. In this study we aim to compare the level of antioxidants and the amount of total phenolic and flavonoid compounds at three different stages of fruit ripening including immature, semi-ripen and fully matured fruits in two species of raspberry after a period of storage at freezer.

#### Materials and Methods

Fruits of *Rubus persicus* and *R. caesius* were collected at different maturity stages including immature, semi-ripen and fully matured stages from natural habitats. The extracts of fruits were stored at -20 °C for 6 months. The antioxidant activities of extracts were determined using DPPH free radical purification and ferric iron regeneration ability (FRAP) methods in June, 2013 in Research Laboratory of Science and Technology Park of East Azerbaijan province. The content of phenolic and flavonoid compounds was also quantified according to Folin–Ciocalteu’s phenol and aluminum chloride methods, respectively. The antioxidant activity and total phenolic and flavonoid contents were compared between species at three maturity stages in a completely randomized factorial design with three replicates.

#### Results

Both methods applied to examine the antioxidant activity revealed a high mean value in extracts from fully matured fruits compared with immature and semi-ripen fruits. The magnitude of antioxidant activity was significantly higher in *R. caesius* than *R. persicus* except that the amount measured by DPPH free radical purification level was similar between species at only fully matured stage. A significant difference was observed in both total phenolic and flavonoid contents between immature, semi-ripen and fully matured stages in both species ( $P < 0.05$ ) except that the total flavonoid content was similar between semi-ripen and fully matured fruits in *R. caesius*.



**Discussion**

Results showed that the highest antioxidant capacity was found in the fully matured stage of fruits in both species and thus the fully matured fruits might be capable of counteracting and even neutralizing free radicals. The results also showed that different species had different level of antioxidant activity. The level of total phenolic and flavonoid content at fully matured fruits was also higher than immature fruits in both species. Our results suggest that the antioxidant potential of raspberry can have several medicinal applications and play an important role by reducing the oxidative stress.

**Keywords:** DPPH, FRAP, Free radical, Matured stage, *Rubus caesius*, *Rubus persicus*

## بررسی محتوی فنل کل، فلاونوئید کل و ظرفیت آنتی اکسیدانی دو گونه وحشی تمشک *Rubus persicus* و *R. caesius* در مراحل مختلف رسیدگی میوه

حامد دادخواه آغداش<sup>۱\*</sup>، مهدی دائمی سعیدآباد<sup>۲</sup> و محسن فلاحتی عنبران<sup>۳</sup>

۱ - \*نویسنده مسئول: دانشجوی دکتری فیزیولوژی گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران  
(hameddadhah71@yahoo.com)

۲- کارشناس ارشد علوم گیاهی، دانشکده زیست شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۳- استادیار، گروه علوم گیاهی، دانشکده زیست شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۱۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۳/۲۲

### چکیده

آنتی اکسیدان‌ها با آزادسازی الکترون‌های منفرد و اتم‌های هیدروژن با تنش اکسیداتیو ناشی از رادیکال‌های آزاد مقابله می‌کنند. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که ترکیبات فنلی و فلاونوئیدهای موجود در گیاهان می‌توانند خاصیت آنتی اکسیدانی داشته باشند. در این آزمایش، عملکرد آنتی اکسیدانی، محتوی فنل کل و فلاونوئید کل در مراحل مختلف رسیدگی میوه شامل نارس، نیمه رسیده و رسیدگی کامل در دو گونه وحشی تمشک *Rubus caesius* و *R. persicus* در خردادماه سال ۱۳۹۲ در آزمایشگاه تحقیقاتی پارک علم و فناوری استان آذربایجان شرقی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار مقایسه شدند ارزیابی شدند. میزان فعالیت آنتی اکسیدانی اندازه گیری شده با روش‌های درصد پاک‌سازی رادیکال آزاد DPPH و توانایی احیای یون آهن فریک (FRAP) در مرحله رسیدگی کامل به طور معنی داری نسبت به مراحل نارس و نیمه رسیده در هر دو گونه وحشی تمشک بیشتر بود. فعالیت آنتی اکسیدانی اندازه گیری شده در مراحل مختلف رسیدگی میوه به استثنای رسیدگی کامل در گونه *R. caesius* بیشتر از *R. persicus* بود. به طور مشابه محتوی فنل کل در مراحل مختلف رسیدگی میوه تفاوت معنی داری نشان داد به طوری که مرحله رسیدگی کامل، محتوی فنل کل بالاتری نسبت به سایر مراحل نشان داد. محتوی فلاونوئید کل در مرحله رسیدگی میوه در گونه *R. persicus* بیشتر از مرحله نارس و نیمه رسیده بود ولی این ترکیب در گونه *R. caesius* در مراحل رسیدگی کامل و نیمه رسیده تفاوت معنی داری نشان نداد. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که مرحله رسیدگی کامل میوه محتوی فنلی و فلاونوئیدی بالاتری نسبت به مراحل نارس و نیمه رسیده دارد که با الگوی تفاوت فعالیت آنتی اکسیدانی در بین مراحل رسیدگی مختلف مطابقت دارد. به طور مشابه گونه *R. caesius* با محتوی فنل کل و فلاونوئید کل بیشتر نسبت به گونه *R. persicus*، فعالیت آنتی اکسیدانی بیشتری نیز نشان می‌دهد.

کلیدواژه‌ها: حالت رسیده، رادیکال آزاد، DPPH، FRAP، *Rubus caesius*، *Rubus persicus*

### مقدمه

ایجاد می‌کنند. برای مقابله با استرس اکسیداتیو، آنتی اکسیدان‌ها مولکول‌هایی که الکترون‌های منفرد یا اتم‌های هیدروژن به رادیکال‌های آزاد واکنشگر می‌دهند در سلول‌ها و بافت‌های اکسید شده بیشتر بیان می‌شوند (Willett,

رادیکال‌های آزاد الکتروفیل‌هایی هستند که باعث صدمه زدن به اجزای سلولی و تخریب پروتئین‌ها، لیپیدها و از همه مهم تر اسیدهای نوکلئیک شده و استرس اکسیداتیو

عطرمايه‌های گیاهی شامل متابولیت‌های ثانویه هستند که در بیشتر موارد دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت ضد میکروبی هستند (Golestani and Rastegar, 2017). در ایالات متحده آمریکا و برخی کشورهای اروپایی، میوه تمشک سیاه (*Rubus fruticosus*) پس از توت‌فرنگی (*Fragaria ananassa*)، بلوبری (گونه‌های سرده *Vaccinium*) و تمشک فرنگی قرمز (*Rubus idaeus*) چهارمین ریز میوه‌ی مهم در بازار محصولات تازه تبدیل شده است. همچنین تولید تمشک سیاه در ۲۰-۱۵ سال گذشته توسعه یافته است و به محصولی مهم تبدیل شده است (Haddadinejad et al., 2017).

فلاونوئیدهای موجود در تمشک با غیرفعال کردن رادیکال‌های آزاد، خسارت‌های ناشی از استرس اکسیداتیو در سامانه‌های بیولوژیکی را کاهش داده و همچنین از بروز انواع سرطان‌ها و بیماری‌های مزمن جلوگیری می‌کنند (Cho et al., 2004). به‌طور مشابه ترکیبات فنلی تمشک، ظرفیت بالایی جهت از بین بردن رادیکال‌های آزاد دارند و از اکسیداسیون LDL و لیپوزوم در بدن جلوگیری می‌کنند (Dai et al., 2009). در طی تحقیقی ویژه‌ی ویژگی‌های فیزیوشیمیایی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی لاین‌های جهش‌یافته تمشک سیاه (*Rubus fruticosus*) در طی مراحل مختلف رسیدگی میوه شامل ۳ مرحله نارس، نیمه‌رسیده و رسیدگی کامل بررسی گردیدند و نشان داده شد که در گونه‌های مورد مطالعه فعالیت آنتی‌اکسیدانی و محتوی فنل کل و فلاونوئید در مرحله رسیدگی کامل افزایش معنی‌داری نسبت به سایر مراحل نارس و نیمه‌رسیده داشت (Ryu et al., 2016).

هدف از این پژوهش، مقایسه خاصیت آنتی‌اکسیدانی، محتوی فنل کل و فلاونوئید کل در مراحل مختلف رسیدگی میوه شامل مراحل نارس، نیمه‌رسیده، رسیدگی کامل در دو گونه *R. caesius* و *R. persicus* است. انتظار می‌رود از مرحله نارس به سمت حالت رسیدگی کامل میوه، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و محتوی فنل کل و فلاونوئید کل افزایش یابد.

با توجه به این که رادیکال‌های آزاد اثرات مضر بر روی مسیرهای متابولیسمی و واکنش‌های بیوشیمیایی دارند، دانشمندان همواره در تلاش هستند منابع طبیعی آنتی‌اکسیدان‌ها با پتانسیل چند عاملی را کشف کنند که با اثرات مضر رادیکال‌های آزاد مقابله نمایند (Zeidan and Oran, 2014). تحقیقات نشان داده است که انواع آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی استخراج‌شده از میوه‌ها و سبزی‌ها موجب حفظ سلامتی بدن و محافظت از بیماری‌های قلبی-عروقی و انواع سرطان‌ها می‌شوند (Hertog et al., 1993). مطالعات درون شیشه‌ای (*in vitro*)، نشان داده است اسید آسکوربیک و ترکیبات فنلی و به‌خصوص فلاونوئیدها فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی دارند به‌طوری که دستگاه‌های سلولی را از استرس‌های اکسیداتیو محافظت می‌کنند که می‌تواند خطر بروز بیماری‌های مزمن را کاهش دهند (Liu, 2003).

تمشک (*Rubus*) از تیره *Rosaceae* یکی از متنوع‌ترین سرده‌های گیاهان دولپه‌ای حقیقی است که شامل ۱۲ زیر سرده و حدود ۴۲۹ گونه است که ۴ گونه آن به‌عنوان گونه‌های میوه‌ده بیشترین ارزش اقتصادی را دارند. این تنوع ناشی از تیپ‌های گسترده میوه و رنگیزه‌هایی مثل آنتوسیانین در این سرده هستند که موجب ایجاد رنگ‌های قرمز، آبی و بنفش در این میوه‌ها می‌شوند (Giovannelli and Buratti, 2009; Jennings, 1988). میوه تمشک از نوع مجتمع است و پس از گرده‌افشانی به‌صورت میوه‌ای کوچک بنام جفتک به وجود می‌آید. میوه به‌صورت مخروطی بوده و دانه‌های کمتری تولید می‌کند و گاهی اوقات روی شفتک‌ها، کرک‌های ترش‌چی وجود دارند. گونه‌های تمشک پراکنش گسترده جهانی دارند و دارای گونه‌های وحشی، کاشته‌شده و ژنوتیپ‌های مختلف بوده که از قطب شمال تا استرالیا پراکنش یافته‌اند (Prior et al., 1998).

استفاده از عصاره طبیعی یا عطرمايه‌های گیاهی یکی از روش‌های سالم و بی‌خطر برای کنترل بیماری‌ها است.

## مواد و روش‌ها

میوه‌های دو گونه وحشی تمشک *Rubus persicus* و *R. caesius*، در مراحل مختلف رسیدگی میوه (نارس، نیمه‌رسیده و رسیده و رسیدگی کامل) از رویشگاه طبیعی جمع‌آوری شد. مشخصات محل جمع‌آوری و شرایط اقلیمی محل رویش گونه‌ها در (Rezai Ghivi 2013) گزارش شده است.

مقدار ۱ گرم از میوه‌های برداشت‌شده را در ۲۰ میلی‌لیتر حلال متانول خیسانده و له گردید، سپس با کاغذ صافی صاف گردید و بدین منظور عصاره متانولی میوه‌های تمشک جهت انجام آزمایش‌ها مربوط به سنجش آنتی‌اکسیدانی و محتوی فنل کل و فلاونوئید کل آماده گردید. عصاره‌های حاصل در میکروتیوب‌های دو میلی‌لیتری در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد در آزمایشگاه تحقیقاتی پارک علم و فناوری تبریز تا زمان شروع آزمایش‌ها به صورت منجمد حدود ۶ ماه نگهداری گردیدند.

## بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی

به منظور بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی از دو روش ۲ و ۲- دی فنیل-۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH) و توانایی احیای یون آهن فریک (FRAP) استفاده گردید.

## روش ۲ و ۲- دی فنیل-۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH)

در این روش ۳/۹ میلی‌لیتر از محلول DPPH (۰/۰۴) گرم DPPH در ۱۰۰ میلی‌لیتر حلال متانول) و ۰/۱ میلی‌لیتر از هر عصاره را به داخل لوله‌های آزمایش ریخته و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار داده شدند و میزان جذب محلول در ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. درصد مهار رادیکال آزاد DPPH با استفاده از رابطه (۱) محاسبه گردید (Brand-Williams et al., 1995).

رابطه (۱)

$$SA (\%) = 100 \times (A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{blank}}$$

SA (%),  $A_{\text{sample}}$  و  $A_{\text{blank}}$  به ترتیب بیانگر درصد پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد، جذب شاهد و جذب نمونه است.

## روش FRAP Ferric Reducing Ability of Plasma

طبق این روش معرف TPTZ (2,2',6,6'-Tetrapyridyl-S-) در حضور آنتی‌اکسیدان موجب احیای یون‌های فریک ( $Fe^{3+}$ ) به فرو ( $Fe^{2+}$ ) می‌شود و محلول به رنگ بنفش درمی‌آید. نسبت به میزان قدرت احیاکنندگی، جذب به صورت وابسته به غلظت آنتی‌اکسیدان افزایش می‌یابد. با استفاده از این تغییر جذب (افزایش جذب در طول موج ۵۹۳ نانومتر) می‌توان خاصیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات مختلف را سنجید (Lahlou, 2004; Rasheed et al., 1995). برای این منظور ۱/۵ میلی‌لیتر از معرف FRAP، ۲۵ میلی‌لیتر بافر استات، ۲/۵ میلی‌لیتر محلول کلرید آهن III و ۲/۵ میلی‌لیتر محلول TPTZ با هم مخلوط شدند و به لوله‌های آزمایش حاوی عصاره‌های مورد مطالعه تمشک اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از سولفات آهن به لوله‌های مربوطه اضافه شد و مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. شدت رنگ آبی (بنفش مایل به آبی) با اندازه‌گیری میزان جذب در طول موج ۵۹۳ nm در مقابل شاهد حاوی  $H_2O$  اساس غلظت‌های مختلف استاندارد و میزان جذب خوانده شده رسم گردید. رنگ محلول FRAP آبی روشن است که با افزودن نمونه‌های دارای خاصیت آنتی‌اکسیدان رنگ آن تیره می‌گردد (Kordali et al., 2005).

## سنجش محتوی فنل کل

محتوی فنل کل نمونه با استفاده از واکنش گر Folin-Ciocalteu's phenol اندازه‌گیری شد. ۰/۱ میلی‌لیتر از نمونه‌های رقیق شده همراه با ۲ میلی‌لیتر  $Na_2CO_3$  (2% W/V) در لوله آزمایش ریخته و به مدت دو دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر واکنش گر Folin-Ciocalteu's phenol (50%) به آن اضافه شد. مخلوط واکنش به مدت ۳۰ دقیقه در

نیمه‌رسیده و رسیدگی کامل در هر دو گونه مورد مطالعه، اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ( $P < 0/05$ ) ولی بین دو گونه مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری از نظر درصد پاک‌سازی رادیکال آزاد DPPH فقط در مرحله رسیدگی کامل مشاهده نشد ( $P > 0/05$ ).

#### فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها بر اساس روش FRAP

فعالیت آنتی‌اکسیدانی اندازه‌گیری شده بر اساس توانایی احیای یون آهن فریک (FRAP) در بین مراحل مختلف نارس، نیمه‌رسیده و رسیدگی کامل در هر دو گونه مورد مطالعه به ترتیب ۴۰۰، ۴۱۰، ۴۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای *R. persicus* و ۴۳۰، ۴۴۵ و ۴۵۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای *R. caesius*، اختلاف معنی‌داری نشان داد (شکل ۲،  $P < 0/05$ ). علاوه بر این بین دو گونه مورد مطالعه نیز اختلاف معنی‌داری در هر سه مرحله رسیدگی میوه مشاهده شد به طوری که فعالیت آنتی‌اکسیدانی در گونه *R. caesius* نسبت به گونه *R. persicus* بیشتر بود.

#### میزان فنل کل

محتوی فنل کل در بین مراحل مختلف نارس، نیمه‌رسیده و رسیدگی کامل در هر دو گونه مورد مطالعه (به ترتیب با ۸۱/۶۶، ۹۰/۱۶ و ۹۳/۶۶ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم برای *R. persicus*، ۱۲۱، ۱۲۴ و ۱۸۸/۸۳ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم برای *R. caesius*) اختلاف معنی‌داری نشان داد (شکل ۳،  $P < 0/05$ ).

محتوی فنل کل در بین دو گونه مورد مطالعه نیز اختلاف معنی‌داری در هر سه مرحله رسیدگی میوه نشان داد به طوری که در گونه *R. caesius* نسبت به گونه *R. persicus* بیشتر بود (شکل ۳،  $P < 0/05$ ).

#### میزان فلاونوئید کل

میزان فلاونوئید کل در بین مراحل مختلف نارس، نیمه‌رسیده و رسیدگی کامل (به ترتیب با ۶، ۷ و ۸ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم) در گونه *R. persicus*، اختلاف معنی‌داری نشان داد (شکل ۴،  $P < 0/05$ ).

دمای اتاق و در تاریکی نگهداری و سپس میزان جذب آن در ناحیه مرئی طول موج ۷۲۰ نانومتر خوانده شد. منحنی استاندارد از مقدار جذب غلظت‌های مختلف اسید گالیک به دست آمد. با مقایسه منحنی استاندارد اسید گالیک و میزان جذب نمونه‌ها، محتوای فنل بر اساس میلی‌گرم در گرم اسید گالیک در حلال متانول محاسبه گردید (Hayouni et al., 2007).

#### اندازه‌گیری میزان فلاونوئید کل

محتوی فلاونوئید کل با روش رنگ‌سنجی کلرید آلومینیوم ارائه‌شده توسط (Kaijv et al., 2006) انجام شد. به طوری که بر روی ۲۵۰ میکرولیتر عصاره، ۷۵ میکرولیتر (5% w/v)  $\text{NaNO}_2$ ، ۱۵۰ میکرولیتر (10%  $\text{AlCl}_3$  w/v) و ۵۰۰ میکرولیتر (5% w/v)  $\text{NaOH}$  اضافه شد. با افزودن آب مقطر حجم نهایی به ۲/۵ میلی‌لیتر رسانده شد. جذب محلول پس از ۵ دقیقه در طول موج ۵۰۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل USA-Perklin elmer خوانده شد.

#### تجزیه آماری

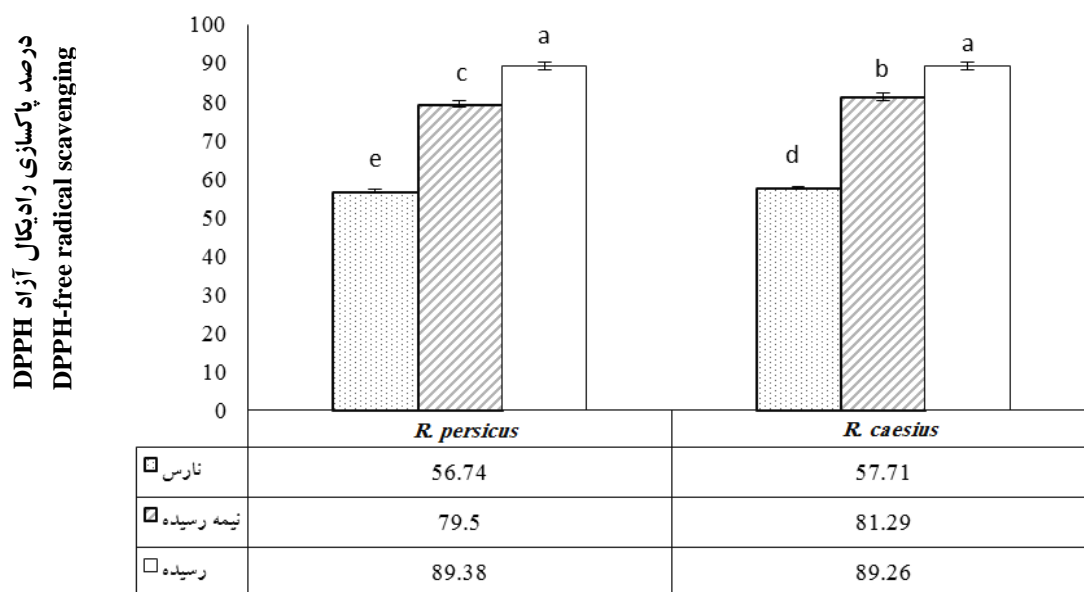
آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار برای هر تیمار در مراحل مختلف رسیدگی میوه صورت گرفت. نتایج هر سنجش به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد نشان داده شده است. برای مقایسه مراحل رسیدگی از تجزیه واریانس استفاده گردید. مقایسه میانگین مراحل رسیدگی با آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد با نرم‌افزار SPSS-24 انجام گرفت.

#### نتایج و بحث

##### فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها بر اساس روش

##### پاک‌سازی رادیکال DPPH

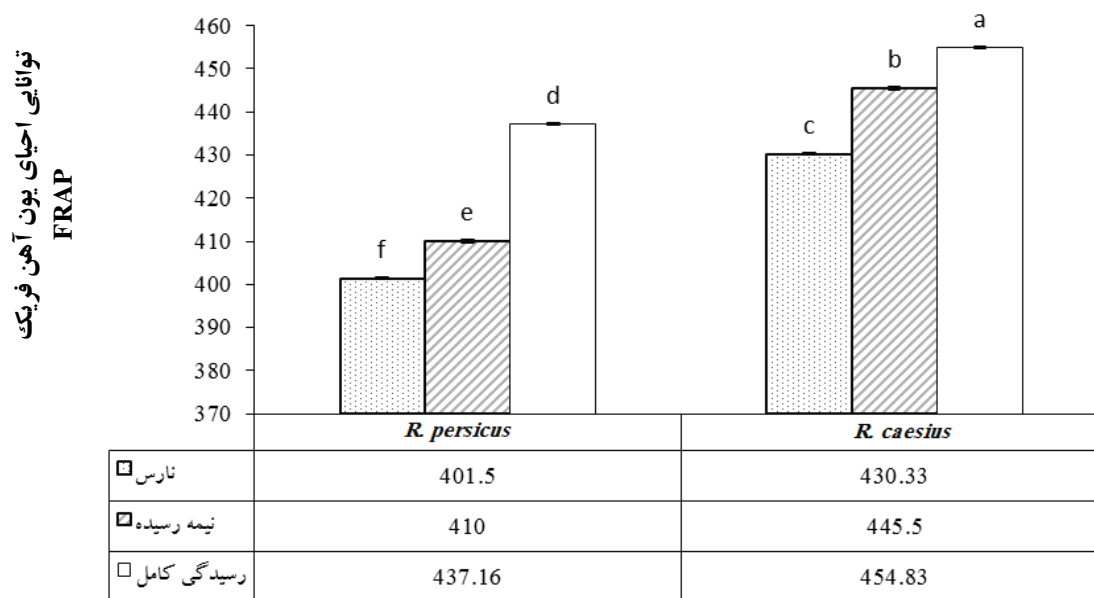
درصد پاک‌سازی رادیکال آزاد DPPH در گونه *R. persicus* از ۵۶/۷ تا ۸۹/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ترتیب در مرحله نارس تا رسیدگی کامل متغیر بود (شکل ۱). این متغیر در گونه *R. caesius* نیز از ۵۷/۷ تا ۸۹/۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ترتیب در مرحله نارس تا رسیدگی کامل متغیر بود. در بین مراحل مختلف نارس،



مراحل مختلف رسیدگی میوه تمشک  
Different maturity stages of raspberry fruit

شکل ۱- میزان فعالیت آنتی اکسیدانی (میانگین ± خطای استاندارد) با روش درصد پاک سازی رادیکال آزاد DPPH در مراحل مختلف رسیدگی میوه در دو گونه وحشی تمشک *R. caesius* و *R. persicus*

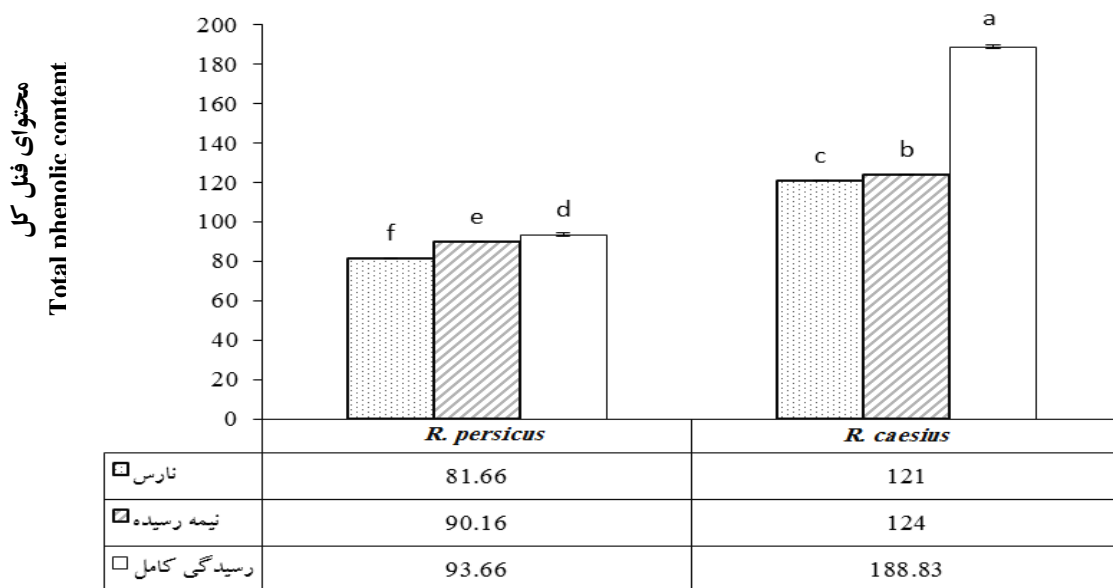
Figure 1. The level of antioxidant activity (Mean ± SE) obtained by DPPH-free radical scavenging activity at different fruit maturity stages in *R. persicus* and *R. caesius*



مراحل مختلف رسیدگی میوه تمشک  
Different maturity stages of raspberry fruit

شکل ۲- میزان فعالیت آنتی اکسیدانی (میانگین ± خطای استاندارد) به دست آمده با روش توانایی احیای یون آهن فریک (FRAP) در مراحل مختلف رسیدگی میوه در دو گونه وحشی تمشک *R. caesius* و *R. persicus*

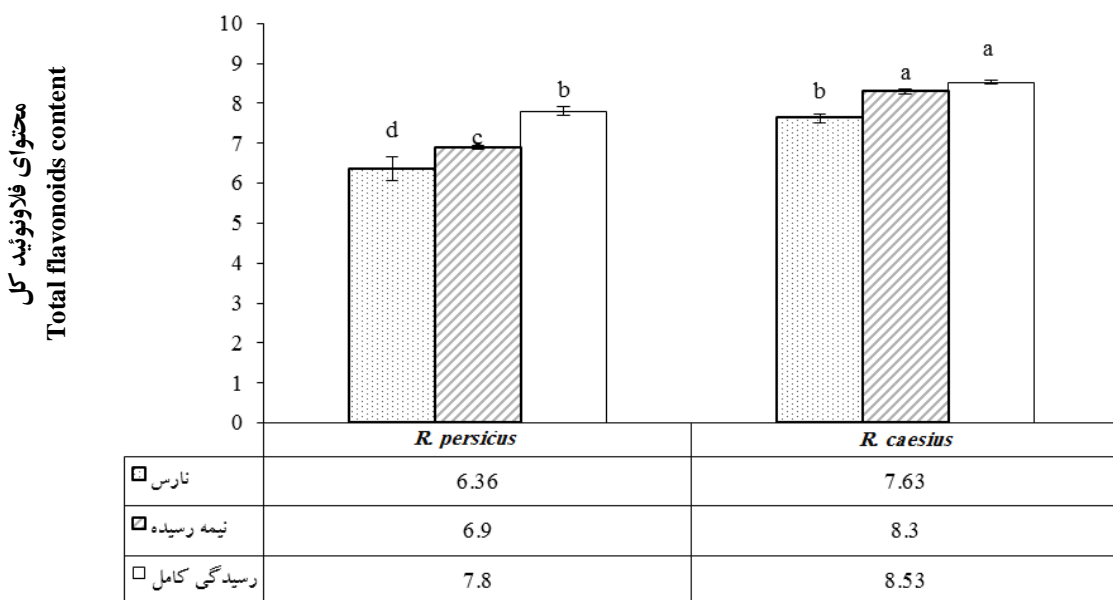
Figure 2. The level of antioxidant activity (Mean ± SE) obtained by FRAP at different fruit maturity stages in *R. persicus* and *R. caesius*



مراحل مختلف رسیدگی میوه تمشک  
Different maturity stages of raspberry fruit

شکل ۳- محتوی فنل کل (میانگین ± خطای استاندارد) در مراحل مختلف رسیدگی میوه در دو گونه وحشی تمشک *R. caesius* و *R. persicus*

Figure 3. The total phenolic content (Mean ± SE) at different fruit maturity stages in *R. persicus* and *R. caesius*



مراحل مختلف رسیدگی میوه تمشک  
Different maturity stages of raspberry fruit

شکل ۴- محتوی فلاونوئید کل (میانگین ± خطای استاندارد) در مراحل مختلف رسیدگی میوه در دو گونه وحشی تمشک *R. caesius* و *persicus*

Figure 4. The total flavonoids content (Mean ± SE) at different fruit maturity stages in *R. persicus* and *R. caesius*



نتایج به دست آمده برای بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی در هر دو روش پاک سازی رادیکال آزاد DPPH و FRAP مشابه است. به طوری که در هر دو روش در دو گونه مورد مطالعه از حالت نارس به سمت مرحله رسیدگی کامل خاصیت آنتی اکسیدانی افزایش یافت. همچنین در هر دو روش FRAP و DPPH علاوه بر داشتن تفاوت معنی دار از نظر خاصیت آنتی اکسیدانی بین مراحل مختلف رسیدگی در هر گونه، گونه *R. caesius* افزایش معنی داری ( $P < 0/05$ ) نسبت به *R. persicus* از نظر خاصیت آنتی اکسیدانی نشان دادند.

پلی فنل ها به عنوان دهنده الکترون از گروه های هیدروکسیل تشکیل شده اند که رادیکال های آزاد را به شکل رادیکال های پایدار درمی آورند و از ایجاد تنش اکسیداتیو جلوگیری می کنند. در این پژوهش مقدار ترکیبات فنلی به تدریج از حالت نارس به سمت رسیدگی کامل در هر دو گونه مورد مطالعه افزایش معنی داری داشت. همچنین میزان ترکیبات فنلی در بین گونه مورد مطالعه اختلاف معنی داری نشان داد ( $0/05 < P$ ). افزایش مقادیر ترکیبات فنلی به سمت مرحله رسیدگی کامل میوه تمشک، نیز توسط سایر محققین گزارش شده است (Jennings, 1988).

فلاونوئیدها دارای گروه های هیدروکسیلی هستند که از طریق فرآیند کلاته کردن و یا غیرفعال کردن رادیکال های آزاد با تنش اکسیداتیو ایجاد شده توسط رادیکال های آزاد مثل ROS مقابله می کنند، بنابراین می توانند خواص آنتی اکسیدانی داشته باشند. این ترکیبات به طور گسترده در میوه ها و سبزی ها دیده می شوند. در پژوهش حاضر، بیشترین مقادیر فلاونوئید مربوط به حالت های نیمه رسیده و رسیدگی کامل در گونه *R. caesius* و کمترین مقدار فلاونوئیدی مربوط به حالت نارس در گونه *R. persicus* بود. میزان ترکیبات فلاونوئیدی در گونه *R. caesius* افزایش معنی داری نسبت به گونه *R. persicus* نشان داد. همچنین در هر دو

میزان فلاونوئید کل در مرحله نارس، نیمه رسیده و رسیدگی کامل در گونه *R. caesius* به ترتیب با ۷، ۸ و ۹ میلی گرم در ۱۰۰ گرم متغیر بود به طوری که در بین مرحله رسیدگی کامل و نیمه رسیده اختلاف معنی داری مشاهده نشد. همچنین بین دو گونه مورد مطالعه نیز اختلاف معنی داری در مراحل مختلف رسیدگی میوه مشاهده شد به طوری که در گونه *R. caesius* نسبت به گونه *R. persicus* بیشتر بود ( $p < 0/05$ ).

دما، رطوبت، سرعت تنفس بعد از رسیدن میوه، حساسیت به آلودگی های قارچی از عوامل مؤثر در کاهش زمان ماندگاری میوه ها از جمله تمشک هستند. روش های مختلف برای ماندگاری و انبارداری میوه تمشک وجود دارد که از جمله آن ها می توان به بسته بندی اشاره نمود که نتایج آن زیاد رضایت بخش نیست (Bower, 2007; Joo et al., 2011). ولی با توجه به ارزش تغذیه ای بالای تمشک، استفاده از عصاره تمشک می تواند بدون ضربه زدن به خواص تغذیه ای، با کیفیت و سالم نگه داشته شود. در این پژوهش نیز عصاره میوه دو گونه در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد در حدود ۶ ماه ذخیره گردید و مطابق با سنجش های مختلف مشخص شد که عصاره میوه تمشک در مراحل مختلف رسیدگی خاصیت آنتی اکسیدانی را نشان داد، به طوری که فعالیت آنتی اکسیدانی در مرحله رسیدگی کامل از مراحل دیگر رسیدگی میوه در هر دو گونه (به استثنای مرحله رسیدگی کامل و نیمه رسیده در روش درصد پاک سازی رادیکال آزاد DPPH در گونه *R. caesius* بیشتر بود. به طور مشابه محتوی فنل کل و فلاونوئید کل نیز در مرحله رسیدگی کامل بیشتر از مراحل دیگر بود. همچنین فعالیت آنتی اکسیدانی، محتوی فنل کل و فلاونوئید کل در بین دو گونه *R. caesius* و *R. persicus* در مراحل مختلف رسیدگی میوه (به استثنای محتوی فلاونوئید کل در مرحله رسیدگی کامل) اختلاف معنی داری را نشان داد.

آزمایش دارای بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی بود (Jennings, 1988).

همانند سایر پژوهش‌ها در این تحقیق نیز از روش‌های مختلف آزمایشگاهی جهت سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی میوه تمشک استفاده گردید که همگی به منظور نشان دادن ظرفیت آنتی‌اکسیدان عصاره‌های گیاهی، مورد استفاده قرار گرفتند (Deighton *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2003).

### نتیجه‌گیری

در هر دو گونه *R. caesius* و *R. persicus*، مرحله رسیدگی کامل میوه نسبت به سایر مراحل نمود میوه تمشک، خاصیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری را از خود نشان داد. همچنین گونه *R. caesius* بیشترین میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی را در بین گونه‌های مورد مطالعه داشت؛ بنابراین حالت رسیدگی کامل میوه تمشک جهت مقابله با تنش اکسیداتیو ایجادشده توسط رادیکال‌های آزاد مؤثرتر بوده و مصرف آن جهت بهبود سلامتی بدن و جلوگیری از بروز انواع بیماری‌ها و سرطان‌ها توصیه می‌گردد.

### سپاس‌گزاری

از پارک علم و فناوری استان آذربایجان شرقی که تجهیزات و دستگاه‌های لازم برای انجام این تحقیق را فراهم کرده است، تشکر می‌گردد.

گونه مورد مطالعه، رسیدگی کامل بیشتر از نارس‌ها ترکیبات فلاونوئیدی را نشان دادند؛ بنابراین مصرف میوه در مرحله رسیدگی کامل جهت مقابله با انواع سرطان‌ها و ایجاد بیماری‌ها توصیه می‌گردد.

آنتوسیانین‌ها که جزئی از ترکیبات فلاونوئیدی هستند، موجب ایجاد رنگ‌های مختلف در گونه‌های مختلف تمشک می‌شوند. آنتوسیانین‌ها در حالت رسیدگی کامل میوه تمشک سیاه (*Rubus occidentalis*)، به میزانی گزارش شده است که می‌تواند نشان‌دهنده بیشترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی در این مرحله رسیدگی باشد که می‌تواند با تنش اکسیداتیو ایجادشده توسط رادیکال‌های آزاد مقابله کرده و موجب حفاظت گیاه از عوامل استرس‌زا شود (Kim *et al.*, 2011; Tulio Jr *et al.*, 2008).

هر گیاه دارای طیف وسیعی از ترکیبات فنلی متفاوت است و خاصیت آنتی‌اکسیدانی هر کدام از این مواد وابسته به ساختار شیمیایی آن‌هاست. با افزایش ترکیبات فنل کل خاصیت آنتی‌اکسیدانی بیشتر می‌شود. ترکیبات فنلی توانایی زیادی برای پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد دارند و این بیشتر بستگی به تعداد حلقه‌های آروماتیک و ماهیت گروه‌های جابجاشونده هیدروکسیلی دارد. در این پژوهش گونه *R. caesius* به خاطر ترکیبات فنلی بیشتر در تمام روش‌های مورد

## References

- Bower, C. (2007). Postharvest handling, storage, and treatment of fresh market berries. In: Yanyun Zhao (Ed.), *Berry fruit: Value-added products for health promotion*. USA, Corvallis: Taylor & Francis Group, CRC Press.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. and Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Cho, M. J., Howard, L. R., Prior, R. L. and Clark, J. R. (2004). Flavonoid glycosides and antioxidant capacity of various blackberry, blueberry and red grape genotypes determined by high-performance liquid chromatography /mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(13), 1771-1782.
- Dai, J., Gupte, A., Gates, L. and Mumper, R. (2009). A comprehensive study of anthocyanin-containing extracts from selected blackberry cultivars: Extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms. *Food and Chemical Toxicology*, 47(4), 837-847.

- Deighton, N., Brennan, R., Finn, C. and Davies, H. V. (2000). Antioxidant properties of domesticated and wild *Rubus* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(9), 1307-1313.
- Giovanelli, G. and Buratti, S. (2009). Comparison of polyphenolic composition and antioxidant activity of wild Italian blueberries and some cultivated varieties. *Food Chemistry*, 112(4), 903-908.
- Golestani, A. and Rastegar, S. (2017). Effect of rosemary and artemisia essential oil on decay control and quality characters of mango fruit during storage. *Plant Productions*, 40(2), 53-62.
- Haddadinejad, M., Ghasemi, K. and Mohammadi, A. (2017). Evaluation of temperature and container material effects on summer wild blackberry postharvest life. *Plant Productions*, 40(2), 99-112.
- Hayouni, E. 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 *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chemistry*, 105(3), 1126-1134.
- Hertog, M. G., Feskens, E. J., Kromhout, D., Hollman, P. and Katan, M. (1993). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: The Zutphen elderly study. *The Lancet*, 342(8878), 1007-1011.
- Jennings, D. L. (1988). *Raspberries and blackberries: Their breeding, diseases and growth*. United States Academic Press.
- Joo, M., Lewandowski, N., Auras, R., Harte, J. and Almenar, E. (2011). Comparative shelf life study of blackberry fruit in bio-based and petroleum-based containers under retail storage conditions. *Food Chemistry*, 126(4), 1734-1740.
- Kaijv, M., Sheng, L. and Chao, C. (2006). Antioxidation of flavonoids of green rhizome. *Food Science*, 27(2), 110-115.
- Kim, B., Kim, J., Kim, H. and Heo, M. (1997). Biological screening of 100 plant extracts for cosmetic use (II): antioxidative activity and free radical scavenging activity. *International Journal of Cosmetic Science*, 19(6), 299-307.
- Kim, H. S., Park, S. J., Hyun, S. H., Yang, S. O., Lee, J., Auh, J. H., Kim, J. H., Cho, S. M., Marriott, P. J. and Choi, H. K. (2011). Biochemical monitoring of black raspberry (*Rubus coreanus* Miquel) fruits according to maturation stage by <sup>1</sup>H NMR using multiple solvent systems. *Food Research International*, 44(7), 1977-1987.
- Kordali, S., Cakir, A., Mavi, A., Kilic, H. and Yildirim, A. (2005). Screening of chemical composition and antifungal and antioxidant activities of the essential oils from three Turkish *Artemisia* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5), 1408-1416.
- Lahlou, M. (2004). Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research*, 18(6), 435-448.
- Lee, S. E., Hwang, H. J., Ha, J. S., Jeong, H. S. and Kim, J. H. (2003). Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. *Life Sciences*, 73(2), 167-179.
- Liu, R. H. (2003). Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78(3), 517S-520S.
- Prior, R. L., Cao, G., Martin, A., Sofic, E., McEwen, J., O'Brien, C., Lischner, N., Ehlenfeldt, M., Kalt, W. and Krewer, G. (1998). Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(7), 2686-2693.

- Rasheed, R., Ali, B. and Bashir, A. (1995). Effect of *Teucrium stocksianum* on paracetamol-induced hepatotoxicity in mice. *General Pharmacology: The Vascular System*, 26(2), 297-301.
- Rezai Ghivi, A. (2013). *Physiological and biochemical study of fruit of four Iranian raspberry species during ripening and post harvest*. Ph.D. Thesis, Azad University Research Sciences Branch, Ahvaz. [In Farsi]
- Ryu, J., Kwon, S. J., Jo, Y. D., Jin, C. H., Nam, B. M., Lee, S. Y., Jeong, S. W., Im, S. B., Oh, S. C. and Cho, L. (2016). Comparison of phytochemicals and antioxidant activity in blackberry (*Rubus fruticosus* L.) fruits of mutant lines at the different harvest time. *Plant Breeding and Biotechnology*, 4(2), 242-251.
- Tulio Jr, A. Z., Reese, R. N., Wyzgoski, F. J., Rinaldi, P. L., Fu, R., Scheerens, J. C. and Miller, A. R. (2008). Cyanidin 3-rutinoside and cyanidin 3-xylosylrutinoside as primary phenolic antioxidants in black raspberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(6), 1880-1888.
- Willett, W. C. (1994). Micronutrients and cancer risk. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 59(5), 1162-1165.
- Zeidan, R. and Oran, S. (2014). Antioxidant activity of leaf and fruit extracts of Jordanian *Rubus sanguineus* Friv. (Rosaceae). *Journal of Medicinal Plants Research*, 8(39), 1179-1190.