فصلنامه
شناخت و کاربرد گیاهان دارویی
سال دوم، شماره ۲، پاییز ۸۸ صفحات ۴۳-۳۱

فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات فنلی میوه رسیده ازگیل (*Mespilus germanica* L.)

مه لقا قربانلی*
دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان، گروه زیست شناسی، گرگان، ایران
فصیحه لیوانی
دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان، باشگاه پژوهشگران جوان، گرگان، ایران
آرین ساطعی
دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان، گروه زیست شناسی، گرگان، ایران

محل انجام پژوهش: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان

تاریخ دریافت: ۹۰/۷/۳ **تاریخ پذیرش:** ۹۰/۹/۲۰

چکیده

ازگیل یا کندس (*Mespilus germanica* L.) درخت یا درختچه‌ای چند ساله و متعلق به تیره گل سرخیان است که دارای مصارف خوراکی و دارویی بوده و بومی منطقه استان گلستان است. از این گیاه در طب سنتی برای درمان یبوست و خارج‌کردن سنگ از مثانه و کلیه و یا به عنوان مدر استفاده می‌شود. وجود ترکیبات فنلی در گیاه به آن، خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌دهد و برای سلامت بدن نیز مفید است. در این پژوهش، میوه رسیده ازگیل به صورت تصادفی از یک منطقه جغرافیایی (روستای زیارت با ارتفاع حدود ۱۲۱۲ متری از سطح دریا) در استان گلستان، برداشت شده است. هدف از این تحقیق، محاسبه مقادیر برخی از ترکیبات شیمیایی (فنل‌های کل با دو حلال، فلاونوییدهای کل با دو حلال، آنتوسیانین‌ها و قندهای محلول کل، همچنین، یون‌های پتاسیم، سدیم، کلسیم و منیزیم) و به دست آوردن فعالیت آنتی‌اکسیدانی میوه رسیده ازگیل در ۶ غلظت تهیه شده با روش DPPH و محاسبه IC_{50} بود. نتایج نشان داد که مقدار پلی‌فنل‌های کل میوه رسیده ازگیل نسبت به فلاونوییدهای کل آن، بیشتر و مقدار آنتوسیانین‌های کل، بسیار اندک بود. فنل‌های کل، با متانول و فلاونوییدهای کل، با اتانول، بهتر استخراج شدند. میوه رسیده ازگیل، قند بالایی دارد و بین یون‌های سنجش شده، مقدار پتاسیم نیز بالاترین و به دنبال آن سدیم، کلسیم و منیزیم مقدار کمتری را داشتند. با رقیق‌شدن عصاره، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی کاهش می‌یابد و ۵۰ درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن در غلظت ۱۴۰/۲۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: ازگیل، آنتی‌اکسیدان، فنل، فلاونوئید

مقدمه

ازگیل یا کندس (*Mespilus germanica* L.) درختچه‌ای است خاردار به ارتفاع ۳ تا ۵ متر، با شاخه‌های قهوه‌ای، محکم و در حالت جوان، کرک‌دار می‌باشد (۲،۱). میوه شفت مانند، پنج هسته قهوه‌ای رنگ دارد که در ابتدا سخت است و به میزان زیادی تانن دارد. گوشت میوه زمانی قابل خوردن است که بر اثر سرما نرم شده باشد.

* مسئول مکاتبات mghorbanli@gorganiau.ir

زمان گل‌دهی آن، اردیبهشت و خرداد است (۳، ۴، ۵). رویشگاه‌های اصلی آن، ایران، جنوب و جنوب شرقی اروپا، آناتولی، قفقاز، تالش (۱، ۶)، عراق (۱) و ترکمنستان و پراکنش جغرافیایی آن در ایران، در گرگان (زیارت، بندرگز و نواحی جنگلی گلستان)، مازندران، گیلان، آذربایجان و تهران است (۶). قسمت مورد استفاده دارویی، برگ و میوه آن است (۷، ۸).

پلی‌فنل‌ها رده‌ای متفاوت از لحاظ ساختاری از متابولیت‌های ثانویه گیاهی‌اند که به طور کلی دارای حلقه آروماتیکی با یک یا چند جایگاه تعویض هیدروکسیلی هستند. ترکیبات مختلف آنتی‌اکسیدانی ممکن است از طریق مکانیسم‌های مختلف عمل کنند. در نتیجه، تنها با یک روش نمی‌توان به طور کامل ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مواد غذایی را بررسی و یا ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات آن‌ها را مشخص کرد. به همین دلیل، آزمایش‌های مختلف ظرفیت آنتی‌اکسیدانی با مکانیسم‌ها و روش‌های مختلف صورت گرفته است. همان‌طور که در بسیاری از تحقیقات گزارش شده است فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی موثر در بیماری‌ها به صورت نزدیکی با توانایی کاهش آسیب به DNA، جهش‌زایی، سرطان‌زایی و مهار رشد پاتوژن باکتریایی مرتبط است. فعالیت آنتی‌اکسیدانی به طور گسترده به عنوان پارامتری برای غذا و ترکیبات فعال زیستی دارویی استفاده می‌شود. به تازگی توجه بیشتری روی بررسی توزیع بیولوژیکی ترکیبات فعال در میان ارقام مختلف و نیز بر روی غذاهای کاربردی و مغذی معطوف گردیده که باعث شده است پرورش‌دهندگان گیاهی، شروع به انتخاب محصولاتی با مقادیر بالاتر از حد معمول ترکیبات فنلی آنتی‌اکسیدانی کنند. میوه ازگیل، منبعی بسیار غنی از ترکیبات فعال مثل فنل‌ها، اسیدهای آلی و مواد معدنی است. ترکیبات فعال زیستی میوه ازگیل، خصوصیات استفاده از آن‌ها در غذاهای کاربردی و پژوهش‌های بالینی روی سلامتی انسان، در تحقیقات جدید بررسی می‌شود. در حال حاضر بر روی ازگیل به عنوان یکی از منابع اصلی تامین آنتی‌اکسیدان‌ها که می‌تواند در مقابل طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها، انسان را حفاظت کند توجه بسیار زیادی معطوف شده است. پیش از این نیز خواص این گیاه برای سلامتی انسان، گزارش شده است (۹).

سازمان پزشکی جهانی اعلام داشت که در میوه‌های ازگیل، مقادیر بسیاری اسیدهای مالیک، سیتریک، مالونیک، کوئینیک، شیکمیک و سوکسینیک و نیز فروکتوز، گلوکز، سوربیتول، پلی گالاکتوروناز، تیامین و ویتامین ث وجود دارد. میوه‌های ازگیل به دلیل وجود اسید سیتریک، اسید مالیک، قند، تانن و ... دارای اثرات درمانی هستند که به عنوان یک قابض روی غشای روده، فعالیت و عملکرد آن را تنظیم می‌کنند (۱۰). مواد مؤثره سوربیتول با اثر بر تأخیر در جذب گلوکز، خاصیت ملین دارد (۱۱). میوه ازگیل علاوه بر تانن، دارای موسیلاژ فراوان، ۷۵ درصد آب، ۱۰ درصد قند، ۷ تا ۱۳ درصد سلولز، اسیدهای مالیک، سیتریک، تارتاریک و به مقدار جزئی اسید بوریک و ویتامین‌های E و C است (۸).

میوه ازگیل که در شمال ایران مصارف خوراکی و دارویی دارد، به علت وجود ترکیبات فنلی، دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی است که در درمان بیماری‌های مزمن موثر است. در این تحقیق، مقدار پلی‌فنل‌ها، فلاونوییدها، آنتوسیانین‌های کل، قندهای محلول و یون‌های پتاسیم، سدیم، کلسیم و منیزیوم و همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در میوه رسیده ازگیل (*Mespilus germanica* L.) با نام عمومی Medlar در منطقه کوهستانی روستای زیارت از استان گلستان اندازه‌گیری شد.

مواد و روش‌ها

مواد

معرف فولن- سیکالتو (Folin-Ciocalteau)، کربنات سدیم، بافر کلرید پتاسیم، بافر استات سدیم، کلرید آلومینیوم، استات پتاسیم، کوئرستین (Sigma Chemical Co.)، اسید گالیک (Scharlau Chemi S.A.)، 2,2- diphenyl- 1- picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma Chemical Co.)، اسید سولفوریک، فنل، کلرید پتاسیم، پودر موراکسید (Ammonium Purpurate, Murexide)، پودر اریوکروم سیاه (Eriochrom black)، اسید کلریدریک، متانول و اتانول.

آماده‌سازی نمونه

میوه‌های رسیده ازگیل (*Mespilus germanica* L.) به صورت تصادفی در آبان ماه ۱۳۸۹ از منطقه کوهستانی روستای زیارت واقع در استان گلستان (ارتفاع ۱۲۱۲ متری از سطح دریا- موقعیت جغرافیایی: N ″۴۴/۷ ′۴۰ °۳۶ و E ″۵۶/۵ ′۲۷ °۵۴) جمع‌آوری و پس از انتقال به آزمایشگاه، تا زمان انجام آزمایش‌ها فریز شد. از بررسی بافت خاک منطقه مورد مطالعه Clay Loam است که pH و EC آن در سه عمق بررسی شده، به ترتیب بین ۶/۸۱-۶/۵۲ و ۲/۸-۱/۸۳ دسی زیمنس بر متر به دست آمد. برای سنجش‌ها، هسته‌ها از درون میوه‌ها خارج شدند. برای تعیین مقدار آنتوسیانین کل، حدود g ۵ میوه تازه در ml ۲۰ متانولی که با HCl ۰/۱ درصد اسیدی شده بود به مدت ۲ دقیقه، ساییده و سپس در دمای اتاق در تاریکی به مدت ۱۶ ساعت نگهداری و پس از آن با کاغذ صافی واتمن (شماره ۲) صاف شد (۱۲). برای تعیین مقدار پلی‌فنل‌های کل، از دو حلال اتانول و متانول استفاده گردید. حدود g ۵ میوه تازه در ml ۱۰ حلال، به مدت ۲ دقیقه ساییده و محلول به دست آمده، با کاغذ صافی، صاف شد. بر روی باقی‌مانده‌های نمونه‌های عصاره‌گیری شده، دو بار دیگر همانند مراحل بالا عصاره‌گیری انجام شد. سرانجام هر سه عصاره، صاف و با هم ترکیب شد (۱۲). برای تعیین مقدار فلاونوئید کل، از دو حلال اتانول و متانول استفاده شد. عصاره‌گیری با کمی تغییرات توسط همزن مگنت انجام شد. حدود g ۲ از میوه تازه، در ml ۲۰ حلال، ساییده و سپس در دمای $40^{\circ}C$ به مدت ۱ ساعت، هم‌زده شد و در انتها با کاغذ صافی واتمن (شماره ۳) صاف شد (۱۳). برای تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی، عصاره میوه‌ها با ساییدن حدود g ۲۰ میوه در ml ۲۰ متانولی که با HCl ۰/۱ درصد اسیدی شده بود، تهیه گردید و بعد از ۶۰ دقیقه، محلول‌ها صاف شدند. باقی‌مانده‌های میوه‌ها دوباره طبق روش ذکر شده، عصاره‌گیری و در انتها، عصاره‌های به‌دست آمده، با هم ترکیب و با متانول اسیدی شده با HCl ۰/۱ درصد، با رساندن به حجم ml ۵۰ رقیق شدند (۱۴). برای سنجش میزان کربوهیدرات، ابتدا نمونه‌های گیاهی، در درجه حرارت ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت داخل آون، خشک و سپس با ترازوی دیجیتال، توزین شدند. به g ۰/۱ از هر نمونه خشک شده، ml ۱۰ اتانول ۷۰ درصد، اضافه و به مدت یک هفته در یخچال نگهداری شدند. بعد از یک هفته، محلول‌ها صاف شدند (۱۵). برای تهیه عصاره معدنی جهت سنجش یون‌ها، مقدار g ۱۰ از ماده تر گیاهی (میوه)، توزین و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد داخل آون گذاشته شد. پس از انقضای این مدت، نمونه‌ها توزین شد و به مدت ۶ ساعت در داخل کوره الکتریکی با دمای ۷۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. نمونه‌ها سپس از کوره، خارج و پس از توزین، خاکستر حاصل، در ml ۱۰۰ آب مقطر (عصاره معدنی) حل گردید. بعد از گذشت ۱ ساعت، با کاغذ صافی معمولی صاف شد (۱۶). برای تعیین مقدار ترکیبات، عصاره‌ها در سه تکرار تهیه و در همان روز عصاره‌گیری، سنجش‌ها انجام شد.

تعیین مقدار آنتوسیانین‌های کل

آنتوسیانین‌های کل، با روش اختلاف pH ارزیابی شد (۱۷). دو محلول رقیق از عصاره‌ها تهیه شد: یکی با بافر کلرید پتاسیم (pH 1.0، M ۰/۰۲۵) (گرم مورد نیاز کلرید پتاسیم در ۱ لیتر آب مقطر، مقدار pH آن به وسیله HCl غلیظ به روی ۱ تنظیم شد) و دیگری با بافر استات سدیم (pH 4.5، M ۰/۴) (گرم مورد نیاز استات سدیم در ۱ لیتر از آب مقطر، مقدار pH با HCl غلیظ به روی ۴/۵ تنظیم شد) که رقت آن‌ها به وسیله فاکتور رقت یا DF (۱:۵ حجمی) تعیین شد. پس از گذشت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق، جذب (A) همزمان در دو طول موج ۵۱۰nm و ۷۰۰nm با دستگاه اسپکتروفتومتر(Spectro UV-Vis Double Beam PC, U.S.A) خوانده شد. مقدار آنتوسیانین کل با استفاده از فرمول زیر به دست آمد:

$$A= [(A_{510}-A_{700})pH_{1.0}-(A_{510}-A_{700})pH_{4.5}]$$
$$TAC= (A \times DF \times MW \times 100)/MA$$

مقدار آنتوسیانین کل (TAC) میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن تر و معادل سیانیدین-۳-گلوکوزید (ضریب جذب مولی یا MA، $L\ mol^{-1}\ Cm^{-1}$ ۲۶۹۰۰ و وزن ملکولی یا MW $g\ mol^{-1}$ ۴۴۹/۲) بیان شد.

تعیین مقدار پلی‌فنل‌های کل

مقدار پلی‌فنل‌های کل با روش فولن- سیکالتو تعیین شد (۱۸). ۲۰ µl از هر عصاره با ۱۵۸۰ µl آب مقطر و ۱۰۰ µl معرف فولن-سیکالتو (ده بار رقیق شده) مخلوط شد. ۳۰۰ µl کربنات سدیم ۲۰ درصد ($۲۰۰ g l^{-1}$) به این ترکیب اضافه شد. بعد از قرار دادن در حمام آب گرم در ۴۰°C به مدت ۳۰ دقیقه، جذب این ترکیب در مقابل بلانک آماده شده در ۷۶۵ nm با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. منحنی استاندارد توسط غلظت‌های مختلفی از اسید گالیک ($۱۵۰-۱۰۰۰ µg ml^{-1}$ برای محلول متانولی و $۲۰۰-۱۰۰۰ µg ml^{-1}$ برای محلول اتانولی) تهیه شد. مقادیر فنل کل معادل اسید گالیک (میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن تر) بیان شد.

تعیین مقدار فلاونوییدهای کل

از روش رنگ‌سنجی کلرید آلومینیوم برای تعیین مقدار فلاونوییدها استفاده شد (۱۹). ۰/۵ ml از هر عصاره متانولی گیاه ($۱:۱۰ g ml^{-1}$) به صورت جداگانه با ۱/۵ ml متانول، ۰/۱ ml کلرید آلومینیوم متانولی ۱۰ درصد، ۰/۱ ml استات پتاسیم (۱M) و ۲/۸ ml آب مقطر، ترکیب و در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. جذب هر ترکیب واکنشی در ۴۱۵ nm با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. منحنی استاندارد با محلول‌های کوئرستین متانولی در غلظت‌های $µg ml^{-1}$ ۱۰۰۰- ۱۲/۵ و اتانولی در غلظت‌های $µg ml^{-1}$ ۱۰۰۰- ۱۰ تهیه شد. مقادیر فلاونویید کل معادل کوئرستین (میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن تر) بیان شد.

تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی با رادیکال آزاد DPPH

فعالیت آنتی‌اکسیدانی، با استفاده از روش (DPPH) 2,2- diphenyl- 1- picrylhydrazyl تعیین شد (۲۰) و شش غلظت ($۴۰ mg ml^{-1}$، ۵۰، ۷۰، ۹۰، ۱۰۰ و ۲۰۰) از هر عصاره تهیه شد. محلول‌های آزمایش با ترکیب ۵۰ µl از عصاره رقیق شده میوه با ۳۰۰ µl محلول DPPH متانولی (۱mM، ۰/۰۲ g DPPH با متانول خالص به حجم ۵۰ ml)، آماده و سپس با متانول، به حجم ۳ ml رسانده شد. محلول‌ها در تاریکی و در دمای اتاق به مدت ۱۵ دقیقه نگهداری شدند. جذب ($A_{extract}$) در مقابل بلانک مناسب شامل ۵۰ µl عصاره رقیق شده میوه به اضافه ۲۹۵۰ µl متانول، در طول موج ۵۱۷ nm خوانده شد. محلول شاهد DPPH (۳۰۰ µl از محلول DPPH ۱mM، ۲/۷ ml متانول) هر روز در مقابل متانول اندازه‌گیری شد. درصد مهار از رادیکال DPPH برای هر رقت از عصاره میوه‌ها مطابق فرمول زیر به دست آمد:

$$\% \text{ inhibition} = [(A_{DPPH} - A_{extract})/A_{DPPH}] \times 100$$

در این فرمول A_{DPPH}، مقدار جذب محلول شاهد DPPH و $A_{extract}$، مقدار جذب محلول نمونه است. برای محاسبه مقدار IC_{50} (۵۰ درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها) نمودار درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها (در ۶ غلظت تهیه شده) رسم شد و سپس با توجه به معادله خط به دست آمده، IC_{50} هر نمونه، مشخص گردید.

سنجش قندهای محلول (روش فنل - اسید سولفوریک)

۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره‌ها، برداشته شد و با آب مقطر، به حجم ۱ ml رسانده شد. سپس ۰/۵ ml فنل ۵ درصد (۲/۵ g فنل با آب مقطر به حجم ۵۰ ml رسانده شد) و ۲/۵ ml اسید سولفوریک غلیظ به محلول‌ها اضافه شد. محلول‌ها جهت خنک شدن، در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شدند و سپس جذب در طول موج ۴۸۵ nm در مقابل شاهد (۰/۵ ml اتانول ۷۰ درصد، ۰/۵ ml آب مقطر، ۰/۵ ml فنل ۵ درصد و ۲/۵ ml اسید سولفوریک غلیظ) خوانده شد. برای یافتن غلظت قندهای محلول نمونه (C)، غلظت‌های مختلفی از گلوکز مونوهیدرات ($۰-۲۰۰ µg ml^{-1}$) تهیه شد. سپس با اسپکتروفتومتر جذب‌ها خوانده شد. نتایج به صورت میلی‌گرم بر گرم وزن خشک معادل گلوکز مونوهیدرات بیان شد (۱۵).

اندازه‌گیری یون‌های پتاسیم و سدیم

جهت اندازه‌گیری یون‌های پتاسیم و سدیم، مقداری از عصاره معدنی، در لوله آزمایش ریخته شد و سپس مقدار آنها با دستگاه فلیم فوتومتر و منحنی استاندارد تهیه شده (برای یون پتاسیم از کلرید پتاسیم در رقت‌های ۰/۳۹-۳۹ $\mu g\ mL^{-1}$ و برای یون سدیم از هیدروکسید سدیم در رقت‌های ۲/۳-۲۳ $\mu g\ mL^{-1}$ استفاده شد) تعیین و محاسبه گردید. نتایج به صورت میلی‌گرم در گرم معادل یون‌های پتاسیم و سدیم ارائه شد (۱۶).

اندازه‌گیری یون‌های کلسیم و منیزیوم

اندازه‌گیری یون‌های کلسیم و منیزیوم، با روش تیتراسیون انجام شد (۱۶). برای سنجش یون کلسیم، ابتدا ۱۰ ml از عصاره معدنی گیاه، درون ارلن مایر ریخته شد و به آن ۲ ml سود ۴ نرمال (۸ g سود با آب مقطر به حجم ۵۰ ml رسانده شد) و حدود ۰/۱ g پودر موراکسید اضافه گردید (رنگ محلول سرخ، آبی می‌شود). سپس با محلول EDTA، ۰/۰۱ نرمال (۰/۱۸۶ g EDTA به حجم ۵۰ ml با آب مقطر رسانده شد) تیتر نموده تا رنگ آن به بنفش تغییر کند. این کار برای دقت بیشتر در مجاورت محلول شاهد کلرید کلسیم انجام شد. میزان کلسیم، از فرمول $N_1\ V_1= N_2\ V_2$ محاسبه گردید. (N_1، نرمالیته EDTA ۰/۰۱، V_1، حجم مصرفی EDTA؛ N_2، مجهول و V_2 حجم عصاره معدنی استفاده شده (۱۰ ml) است). برای سنجش یون منیزیوم، ابتدا ۱۰ ml از عصاره معدنی گیاه، درون ارلن مایر، ریخته شد و به آن ۳ mL بافر آمونیاک (pH ۱۰) و حدود ۰/۱ g پودر اریوکروم سیاه اضافه شد. سپس با محلول EDTA، ۰/۰۱ نرمال تیتر شد، تا رنگ آن، به آبی مات تغییر کند. در این آزمایش، مقدار EDTA مصرفی برای مجموع کلسیم و منیزیوم است. لذا برای تعیین میزان منیزیوم، مقدار حجم EDTA مصرفی برای یون کلسیم بدست آمده از آزمایش قبل، از آن کم می‌شود. میزان منیزیوم از فرمول $N_1'\ V_1' = N_2'\ V_2'$ محاسبه گردید. (N_1'، نرمالیته EDTA ۰/۰۱؛ V_1'، حجم مصرفی EDTA هم برای یون کلسیم و هم برای یون منیزیم، N_2'، مجهول و V_2' حجم عصاره معدنی استفاده شده ۱۰ ml) است. نتایج به صورت میلی‌گرم در گرم بر حسب مولاریته ارائه شد.

تجزیه و تحلیل آماری

آنالیز آماری داده‌ها تحت ANOVA و توسط نرم افزار SPSS (ver.16) انجام گردید و مقایسه میانگین داده‌ها به وسیله تست دانکن و با ضریب اطمینان ۹۵ درصد ($P<0.05$) انجام شد. نمودارها به وسیله نرم افزار Excel رسم شدند.

نتایج

مقادیر ترکیبات فنلی و درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی

مقدار آنتوسیانین‌های کل ۱/۷۱±۷/۸۷ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم معادل سیانیدین- ۳- گلوکوزید به دست آمد.

مقدار پلی فنل‌های کل به وسیله معرف فولن- سیکالتو بر اساس اسید گالیک اندازه‌گیری و بر حسب وزن تر بیان شد. معادله خط با توجه به منحنی استاندارد $y=0.0004x+0.201,\ \ R^2=0.974$ برای محلول متانولی و $y=0.0004x+0.1443,\ \ R^2=0.96$ برای محلول اتانولی به دست آمد. مقدار این ترکیبات در محلول عصاره متانولی ۳۵/۴۳±۱۶۷/۳۷ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن تر و در محلول عصاره اتانولی ۲۱/۸۳±۱۵۷/۳۷ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن تر یافت شد. با توجه به نتایج به دست آمده، متانول استخراج بهتری را نسبت به اتانول انجام داد (جدول ۱).

مقدار فلاونویید کل در عصاره‌های متانولی و اتانولی معادل کوئرستین و بر حسب وزن تر بیان شد. معادله خط برای محلول‌های متانولی $y=0.001x+0.05,R^2=0.999$ و برای محلول‌های اتانولی $y=0.001x+0.015,\ R^2=0.999$ به دست آمد. نتایج نشان دهنده این امر بود که ترکیبات فلاونوئیدی کل در اتانول نسبت به متانول، استخراج بهتری داشتند. مقدار فلاونویید کل در عصاره اتانولی (۷/۶۴±۶۱/۳۳ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم بافت تر میوه) از عصاره متانولی بیشتر بود (جدول ۱).

در محاسبه درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی با توجه به غلظت‌های ساخته شده، میوه‌های ازگیل در کمترین غلظت تهیه شده، ۲۲±۳/۳۴ درصد و در بیشترین غلظت، ۷۲±۱/۱۷ درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی را از خود نشان دادند (جدول ۲). IC_{50} این گیاه با توجه به معادله خط ($y=3.16x+5.692, R^2=0.957$) ۱۴۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد.

جدول۱: مقدار فنل و فلاونویید کل در دو عصاره متانولی و اتانولی میوه‌های رسیده ازگیل

	فنل کل*		فلاونوئید کل*	
	متانولی[۱]	اتانولی[۲]	متانولی[۳]	اتانولی[۲]
ازگیل	۱۶۷/۳۷±۳۵/۴۳ a	۱۵۷/۳۷±۲۱/۸۳ a	۴۶/۳۳±۹/۶۵ a	۶۱/۳۳±۷/۶۴ a

*میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن تر، فنل‌ها معادل اسید گالیک و فلاونوئیدها معادل کوئرستین. [۱] ۹ تکرار، [۲] ۳ تکرار و [۳] ۶ تکرار
نتایج به صورت میانگین± انحراف معیار، آنالیز آماری بین حلال‌های مختلف در هر ترکیب تحت ANOVA در سطح ۵ درصد

جدول۲: درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی در غلظت‌های مختلف ساخته شده

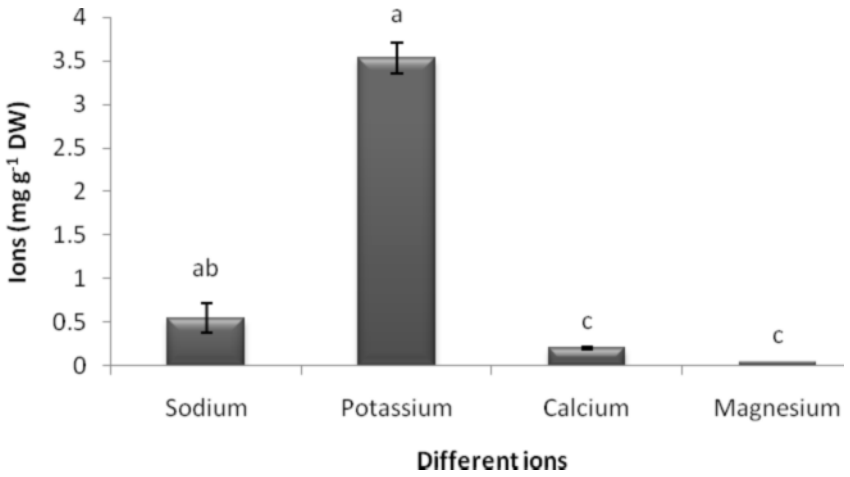
غلظت ($mg\ ml^{-1}$)	فعالیت آنتی‌اکسیدانی (٪)
۴۰	۲۲±۳/۳۴ d
۵۰	۲۴±۰/۹۹ cd
۷۰	۲۸±۱/۴۴ bc
۹۰	۳۰±۲/۷ b
۱۰۰	۳۲±۴/۱۹ b
۲۰۰	۷۲±۱/۱۷ a

آزمایش در ۳ تکرار انجام شد، نتایج به صورت میانگین± انحراف معیار، آنالیز آماری با تست دانکن، بین داده‌هایی که اختلاف در حرف آن‌ها وجود دارد اختلاف معنی‌دار وجود داشت.

مقدار قندهای محلول کل و یون‌های سنجش شده

سنجش قندهای محلول با روش فنل-اسید سولفوریک انجام گردید و معادله خط $y = 0.005x + 0.019, R^2 = 0.992$ به‌دست آمد. مقدار قندهای محلول در میوه رسیده ازگیل ۴۱/۳۰±۷/۵۱ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک بود.

مقدار کاتیون‌های سنجش شده بر اساس میلی‌گرم بر گرم وزن خشک، بیان شده است. مقدار پتاسیم و سدیم با دستگاه فلیم‌فوتومتر و با توجه به معادله خط به ترتیب $y = 0.865x+1.473, R^2 = 0.991$ و $y = 1.106x+0.78, R^2 = 0.997$ بدست آمد. سنجش یون‌های کلسیم و منیزیم نیز با روش تیتراسیون انجام شد. مقدار یون پتاسیم نسبت به دیگر یون‌های سنجش شده، بیشترین (۰/۱۸± ۳/۳۵ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) و مقدار یون منیزیم، کمترین (۰/۰۴±۰/۰۰۲ میلی‌گرم در گرم وزن خشک) بود. بین یون‌های پتاسیم با سدیم و بین یون‌های کلسیم با منیزیم، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد، اما بین یون‌های پتاسیم و سدیم با کلسیم و منیزیم، تفاوت معنی‌دار وجود داشت (نمودار۱).



نمودار۱: مقدار کاتیون‌های موجود در میوه رسیده ازگیل، یون سدیم معادل Na^+ و یون پتاسیم معادل K^+ بر اساس مولاریته (آنالیز آماری با تست دانکن، حروف غیرمشابه در هر ستون، نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد بین داده‌ها است)

هر ۱۰ گرم وزن تر، وزن خشکی برابر با ۲/۹۱±۰/۰۷ گرم و وزن خاکستری برابر با ۰/۰۷±۰/۰۰۴ گرم داشت. در نتیجه، میوه ازگیل ۷۰/۹۱±۰/۶۷ درصد آب دارد.

بحث

در تحقیق حاضر، مقدار آنتوسیانین‌های کل، با روش اختلاف pH، تعیین و مقدار بسیار کمی آنتوسیانین یافت شد. میوه نرسیده ازگیل به علت وجود میزان بالایی پروآنتوسیانیدین و مقدار کمی قند، مزه گس دارد. محققین طی تحقیقاتی مشاهده کردند که کاهش قند، باعث القای تشکیل آنتوسیانین می‌شود (۲۱، ۲۲، ۲۳). در میوه رسیده ازگیل طبق تحقیق حاضر، مقدار قند بالا است که از کم بودن مقدار آنتوسیانین حکایت دارد. طبق پژوهشی که انجام شده بود (۲۴) می‌توان علت پایین بودن مقدار آنتوسیانین در تحقیق حاضر را فعالیت‌های پلی‌فنل‌اکسیداز و پراکسیداز دانست که آنتوسیانین‌های میوه را به صورت غیرمستقیم و از طریق واکنش با D-کاتشین به شکل کوئینون‌ها که با رنگدانه‌های آنتوسیانینی پلیمریزه می‌شوند، کاهش می‌دهند. افزایشی که در فعالیت هر دو آنزیم در طی رسیدگی دیده می‌شود ممکن است با متابولیسم آنتوسیانین در ارتباط باشد. طی تحقیقی گزارش شد که پروآنتوسیانین‌ها در جوانه گل *Crataegus monogyna* بین ۲۵۵۹-۱۰۷۴ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک است (۲۵) که بسیار بیشتر از مقدار آن در میوه گونه مورد مطالعه ما بود.

ترکیبات فنلی در تمام بخش‌های گیاهان وجود دارند و ماهیت و غلظت آن‌ها در بافت‌های مختلف، متفاوت است. این ترکیبات، نقش‌های گوناگونی را در گیاهان ایفا می‌کنند (۲۶). طی تحقیقی در ترکیه مشخص شد که میوه‌های ازگیل، منابع بسیار غنی از ترکیبات فعال مثل فنل‌ها و اسیدهای آلی هستند که دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی‌اند و باعث کاهش ابتلا به بیماری‌های مزمن و بیماری‌های مرتبط با تنش‌های آنتی‌اکسیدانی می‌شوند. مقدار ترکیبات فنلی در عصاره لیوفیلیزه شده میوه ازگیل، ۲۵/۰۸ میلی‌گرم بر گرم معادل اسید گالیک یافت شد (۹). فنل کل و ایزومرهای اسید کلروژنیک در گل آذین، برگ‌ها و میوه‌های ۳ گونه *sorbus* (*S. aucuparia*، *S. aria* و *S. intermedia*) اندازه‌گیری شد که بیشترین مقدار در گل آذین آن به ترتیب ۱۱/۸۳ درصد معادل اسید گالیک و ۴/۳۵ درصد به دست آمد که مقدار فنل آن نسبت به مقدار فلاونوئید و پروآنتوسیانیدین، درصد بیشتری را به خود اختصاص داده بود که با نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر همخوانی دارد (۲۷). اما در انار، مقدار فنل‌های کل در عصاره متانولی، بیشتر از اتانولی گزارش شد. این مساله نشان داد که متانول برای فنل‌ها حلال موثرتری است (۱۳) که با نتایج به دست آمده ما

مطابقت دارد. مقدار فنل کل در ۵ نوع مختلف ازگیل ژاپنی (*Eriobotrya japonica* Lindl. (loquat)) اندازه‌گیری شد و از ۱۲/۹ تا ۵۷/۸ میلی‌گرم معادل اسید گالیک در کیلوگرم میوه تازه مشاهده شد (۲۸) که در میوه رسیده ازگیل مورد سنجش، این مقدار بیشتر یافت شد.

اسیدهای فنلی و فلاونوئیدهای موجود در گیاهان، آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی هستند (۲۹، ۳۰، ۳۱، ۳۲) و خواص ضدجهش و ضدسرطانی (۳۳، ۳۴)، حفاظت قلبی (۳۵)، ضدالتهابی (۲۹) و ضدمیکروبی (۳۶، ۳۷، ۳۸) دارند. فلاونوییدها به طور گسترده در فراورده‌های غذایی مشتق شده از منابع گیاهی یافت شده‌اند و فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی قابل‌توجهی را نشان می‌دهند (۳۳، ۳۹). در تحقیق حاضر، مقدار فلاونوییدهای کل در عصاره اتانولی، بیشتر از متانولی بدست آمد که با نتایج به دست آمده در گیاه *Hieracium pilosella* L. (تیره آفتاب‌گردان) مطابقت داشت (۴۰). طی تحقیقی که بر روی عصاره لیوفیلیزه شده میوه ازگیل انجام شد مقدار فلاونویید ۲/۳۹، میلی‌گرم بر گرم معادل کوئرستین گزارش شد (۹) که از مقدار فلاونویید در تحقیق حاضر (بر اساس وزن خشک)، بیشتر است. مقدار فلاونویید در شاخه، برگ و میوه ازگیل در تحقیقی (۴۱) از مقدار فلاونویید در میوه ازگیل مورد مطالعه ما بیشتر بود. طبق تحقیقی، در میوه‌ها بیشترین غلظت فلاونوییدها در پوست و گوشت مرکبات به ترتیب ۱۷۰-۱۲۵ و ۴۴-۳۵ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن تر بر اساس آگلیکون و در برخی از ارقام سیب، ۳۶-۱۴ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن تر بر اساس آگلیکون یافت شد (۴۲) که مقدار فلاونویید کل در گوشت مرکبات، ارقام سیب و پیاز سفید گزارش شده، کمتر از مقدار آن در ازگیل مورد تحقیق حاضر است.

در این تحقیق، عصاره‌های میوه ازگیل در غلظت‌های پایین، درصد کمتر و در غلظت‌های بالا، درصدهای بیشتری از فعالیت آنتی‌اکسیدانی را نشان دادند. طی تحقیقی نشان داده شد که میوه‌های ازگیل منابع غنی جدیدی از ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدانی هستند و مشخص شد که ازگیل، ارزش بالقوه بالایی برای تولیدکنندگان میوه و همچنین تولید کنندگان مواد غذایی، به خاطر وجود مقادیر بالای ترکیبات فنلی، دارد (۹). در میوه ازگیل مشاهده شد که در طی مرحله بلوغ، ظرفیت غیرفعال کردن DPPH کاهش پیدا کرد که کاهش آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی را در میوه بیان می‌کند. همچنین همبستگی قوی بین مقدار فنل کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی با روش DPPH مشاهده شد (۴۳). محققین گزارش کردند مقدار آنتوسیانین‌های کل و اسید آسکوربیک در میوه رسیده، پایین‌تر از میوه نرسیده است (۲۴) که مطابق با نتیجه به دست آمده برای خرمالوی ژاپنی است که بیان شد تغییرات در میزان اسید آسکوربیک می‌تواند با فعالیت آنتی‌اکسیدانی در ارتباط باشد (۴۴). درنتیجه، بالا بودن غلظت عصاره برای ۵۰ درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی، کم بودن ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در گیاه را پیشنهاد می‌کند.

طی تحقیقی که در ساری (استان مازندران) بر روی برگ، شاخه و میوه ازگیل انجام گرفت، فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی این قسمت‌ها با استفاده از ۶ آزمون سنجیده شد. نتایج نشان داد که عصاره‌های شاخه (آبی و متانولی) بهترین فعالیت مهار کنندگی رادیکال DPPH را به ترتیب با IC_{50} ۱۰/۷±۰/۶ و ۱۱/۴±۰/۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارند. همه عصاره‌ها توانایی ضعیفی را در کلاته کردن فروس نشان دادند. عصاره متانولی میوه، بهترین فعالیت را در مدل مهار کردن اکسید نیتریک نسبت به بقیه نشان داد (IC_{50} برابر با ۲۴۷±۱۲/۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر). عصاره برگ‌ها و شاخه‌ها قدرت احیاکنندگی بهتری نسبت به میوه‌ها نشان داد. در قدرت‌های احیاکنندگی، در میان عصاره‌های شاخه و برگ در مقایسه با ویتامین C، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. عصاره‌ها، فعالیت آنتی‌اکسیدانی خوبی را در روش فریک تیوسیانات نشان دادند. عصاره شاخه، ممانعت پراکسیداسیون بالاتری را نسبت به ویتامین C و BHA (بوتیلات هیدروکسی انیزول) نشان داد ($P<0.05$). عصاره‌ها با توجه به غلظت‌هایشان قادر به مهار کردن H_2O_2 نیز بودند. عصاره متانولی برگ‌ها، فعالیت بهتری در مقایسه با کوئرستین نشان داد. همچنین عصاره شاخه و برگ، مقدار فلاونویید و فنل کل بیشتری نسبت به میوه داشت (۴۱).

در این تحقیق، سنجش قندهای محلول با روش فنل-اسید سولفوریک انجام گردید و منحنی استانداردی با غلظت‌های مختلف گلوکز مونوهیدرات ترسیم شد. مقدار قندهای محلول در میوه رسیده ازگیل ۷/۵۱ ±۴۱/۳۰ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک به دست آمد. قندها، اسیدهای آلی، ترکیبات فنلی، کاروتنوییدها و آنتی‌اکسیدان‌هایی مثل ویتامین‌های C و E به عنوان ترکیبات طبیعی بسیاری از میوه‌ها و سبزیجات، نقش مهمی در کیفیت ماندگاری میوه و تشخیص ارزش غذایی و دارویی آن‌ها ایفا می‌کنند (۴۵). طی تحقیقاتی، میوه‌های ازگیل، حاوی مقادیر بالایی از قندها گزارش شد (۱۰، ۴۶). وجود ۱۰ درصد قند در میوه ازگیل گزارش شد (۵). محققین، فروکتوز، گلوکز و ساکارز را جزو قندهای اصلی در میوه ازگیل بیان کردند که سطوح آن‌ها به صورت قابل ملاحظه‌ای در طی نمو متنوع بود (۴۷). همچنین در میوه‌های بالغ ازگیل، به مقدار زیاد قندهایی مانند فروکتوز و گلوکز یافت شد (۹).

طی تحقیقی گزارش شد که مقدار پنتوز و هگزوز در طی نمو در میوه ازگیل، کاهش و سپس به صورت پیوسته در طی بلوغ، افزایش می‌یافت، اما مقدار گلوکز، به صورت پیوسته، هم در طی نمو و هم در طی بلوغ، افزایش می‌یافت. همچنین بیان شد که میوه نرسیده، آن به علت مقدار کم قند، طعم گس دارد که افزایش مقدار آن و افزایش فعالیت‌های پلی‌فنل اکسیداز و پراکسیداز احتمالا روی طعم آن در هنگام بلوغ اثر می‌گذارد (۲۴).

پارامترهای فیزیکی و شیمیایی میوه ازگیل برای طراحی تجهیزات کاشت، برداشت، پردازش، ذخیره‌سازی محصول و ارزش تغذیه‌ای، لازم هستند. طی تحقیقی، مقدار مواد معدنی میوه ازگیل به وسیله اسپکتروفتومتر پلاسمایی نشر اتمی تعیین شد. پتاسیم همانند تحقیق ما در بالاترین غلظت وجود داشت (۴۸). محققین بر روی مواد معدنی میوه ازگیل که در ترکیه در ۵ مرحله از نمو (۱۵ ژوئن تا ۸ اکتبر) جمع‌آوری شده بود آنالیز انجام دادند. ۳۲ ماده معدنی در میوه آن سنجش شد و طبق نتایج به دست آمده مشخص گردید که ۱۶ ماده معدنی (Al، Ba، Ca، Cu، Co، Fe، K، Li، Mg، Mn، Na، Ni، P، Sr، Ti و Zn) از بین مواد معدنی مورد سنجش در سطوح قابل‌توجهی وجود دارند. آن‌ها گزارش کردند که میوه رسیده ازگیل پتاسیم بیشتر (۷۳۷۰ میکروگرم در گرم وزن خشک)، به دنبال آن کلسیم (۱۷۸۰ میکروگرم در گرم وزن خشک)، فسفر (۱۰۸۰ میکروگرم در گرم وزن خشک)، منیزیم (۶۶۱ میکروگرم در گرم وزن خشک) و سدیم (۱۸۳ میکرو گرم در گرم وزن خشک) داشت. در طی نمو، مواد مصرفی Al، Ba، Fe، Mn، P، Sr و Zn در آگوست (میوه نابالغ) بالاترین میزان را داشتند، در حالی‌که غلظت K، Ca، Mg و Cu به تدریج در طی نمو کاهش نشان می‌داد. میوه رسیده ازگیل، منبع مهم مواد غذایی مورد نیاز از مواد معدنی و عناصر کمیاب به خصوص کلسیم، مس، آهن، پتاسیم، منیزیم، سدیم و روی برای جمعیت های انسانی در جنوب شرقی اروپا، ترکیه و ایران است (۴۹). در تحقیقی که در امریکا بر روی داروش انجام گرفت، به ترتیب مقدار پتاسیم بیشتر از سدیم، کلسیم و منیزیم گزارش شد (۵۰). همچنین طی تحقیقی که روی گیاه نیمه انگلی داروش انجام شد؛ پتاسیم نسبت به بقیه عناصر سنجش شده، بیشتر گزارش شد (۵۱) که با نتایج ما مطابقت داشت.

پتاسیم در بدن، باعث کاهش ابتلا به بیماری‌های قلبی عروقی نیز می‌گردد (۱۱، ۵۲، ۵۳). در تحقیقی بیان شده است که میوه‌های رسیده ازگیل دارای سطوح بالایی از آسپارتات، گلوتامات، پالمتیک اسید، لینولئیک اسید و پتاسیم هستند و از آن‌ها در طب سنتی برای درمان یبوست و خارج کردن سنگ از مثانه و کلیه یا به عنوان مدر، استفاده می‌شود (۵۴).

معمولا میانگین عنصر پتاسیم در گیاهان بالاتر است که این امر با نگاهی دقیق به نقش پتاسیم در گیاهان قابل توجیه است. از عمده‌ترین وظایف عنصر پتاسیم در گیاهان می‌توان تنظیم فشار اسمزی، فراهم کردن شرایط نگهداری آب در سلول‌ها و بافت‌های گیاهی، فعال‌سازی برخی از آنزیم‌ها و ایجاد هماهنگی در باز و بسته شدن سلول‌های روزنه‌ای نام برد که خود باعث برقراری جریان هوا و آب، تبخیر و تعرق گیاه می‌شود (۵۵).

میوه‌های رسیده ازگیل مقادیر قابل‌توجهی ترکیبات فنلی دارند که به میوه‌های ازگیل ، خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌دهند. فنل‌های کل، در متانول و فلاونوییدهای کل در

اتانول، بهتر استخراج شدند. همچنین این مواد سرشار از ترکیبات قندی و پتاسیم بالا هستند که می‌توانند به عنوان منبع غذایی در جیره غذایی استفاده شوند. از میوه‌های ازگیل می‌توان به عنوان گیاهی دارای خاصیت دارویی، استفاده به عمل آورد.

منابع

۱. خاتمساز، م.، میربادین، ع. ۱۳۶۴. مشخصات علمی و کاربردی ۶۵۵ گونه درختی ایران و جهان. موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، تهران.

۲. قهرمان، ا. ۱۳۷۲. کورموفیت‌های ایران (سیستماتیک گیاهی). مرکز نشر دانشگاهی، تهران، جلد دوم، صفحات ۵۶۸-۵۱۸.

۳. آقا بیگی، ف. ۱۳۷۴. درختان و درختچه‌های سودمند و قابل کشت در ایران. انتشارات فلاحت ایران-اصفهان.

۴. خاتمساز، م. ۱۳۷۱. فلور ایران، تیره گل سرخ. نشر موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، تهران، ۳۵۲ صفحه.

۵. مظفریان، و. ۱۳۸۲. فرهنگ نام‌های گیاهان ایران. فرهنگ معاصر تهران.

۶. مظفریان، و. ۱۳۸۳. درختان و درختچه‌های ایران. فرهنگ معاصر تهران.

۷. حسینی، س.ع.، ابرسجی، ق. و حسینی، س.ع. ۱۳۸۷. گیاهان دارویی استان گلستان. فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، جلد ۲۴، شماره ۴، ص ۴۷۲ تا ۴۹۸.

۸. زرگری، ع. ۱۳۷۵. گیاهان دارویی. موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران. جلد دوم، ۹۷۶ صفحه.

9. Gulcin, I., Topal, F., Sarkaya, S.B.O., Buesal, E., Bilsel, G., Goren, A.C. 2011. Polyphenol contents and antioxidant properties of medlar (*Mespilus germanica* L.). Records of Natural Products 5(3):158-75.

10. Baird, J. R., Thieret, J. W. 1989. The Medlar (*Mespilus germanica*, Rosaceae) from Antiquity to Obscurity. Journal of Economic Botany 43(3):328-372.

11. Stacewicz–Sapuntzakis, M., Bowen, P.E., Hussain, E.A., Damayanti–Wood, B.I., Franswort, N.R. 2001. Chemical composition and potential health effects of prunes :a functional food? Crit Rev Food Sci Nutr 41(4):251-86.

12. Kalt, W., Forney, C.F., Martin, A., Prior, R.L. 1999. Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics and anthocyanins after fresh storage of small fruits. Journal of Agricaltur Food Chemistry 47:4638-44.

13. Cam, M., Hisil, Y. 2010. Pressurized water extraction of polyphenols from pomegranate peels. Journal of Food Chemistry 123(3):878-85.

14. Jakobek, L., Seruga, M., Medvinovic-Kosanovic, M., Novak, I. 2007. Antioxidant activity and polyphenols of aronia in comparison to other berry. Journal of Agriculturae Conspectus Scientificus 72(4):301-6.

15. Kochert, G. 1978. Carbohydrate determination by the phenolsulfuric acid method, Handbook of phycological methods. Cambridge University Press, Cambridge, In: Journal A. Lebust and J. S. Graig (Eds.), pp. 96-97.

۱۶. منطقی، ن. ۱۳۶۵. تشریح روش‌ها و بررسی آزمایشگاهی روی نمونه‌های خاک و آب. موسسه تحقیقات خاک و آب. نشریه شماره ۱۶۸.

17. Giusti, M.M., Wrolstad, R.E. 2001. Anthocyanins, Caracterization and measurement with UV-visible Spectroscopy. In: Current protocols in food analytical chemistry (R.E.

Wrolstaded). Wiley, New York, F1.2.1-F1.1.13.

18. Waterhouse, A. 2006. http://waterhouse.ucdavis.edu/phenol/folinmicro.htm
19. Chang, C., Yang, M., Wen, H., Chern, J. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal Food Drug Analysis 10:178-82.
20. Benvenuti, S., Pellati, F., Melegari, M., Bertelli, D. 2004. Polyphenols, anthocyanins, ascorbic acid, and radical scavenging activity of *Rubus*, *Ribes*, and *Aroni*. Joural Food Science 69:164-9.
21. Pirie, A., Mullins, M.G. 1977. Interrelationships of sugars, anthocyanins, total phenols and dry weight in the skin of grape berries during ripening. American Journal Enology and Viticulture 28(4):204-9.
22. Szweykowska, A. 1959. The effect of nitrogen feedingon anthocyanin synthesis in isolated red cabbage embryos. Acta Societatis Botanicorum Poloniae 28:539-49.
23. Thimann, K.V., Edmondson, Y.H., Radner, B.S. 1951. The biogenesis of the anthocyanin. III the role of sugars in anthocyanin formation. Archives of Biochemistry and Biophysics 34(2):305-23.
24. Aydin, N., Kadioglu, A. 2001. Changes in the chemical composition polyphenol oxidase and peroxidase activities during development and ripening of medlar fruits (*Mespilus germanica* L.). Bulgarian Journal Plant Physiology 27(3-4):85-92.
25. Bahorun, T., Trotin, F., Vasseurt, J. 1994. Comparative polyphenolic productions in *Crataegus monogyna* callus cultures. Phytochemistry 37(5):1273-6.
26. Lincoln, D.E., Murray, M.J., Lawrence, B.M. 1986. Chemical composition and genetic basis for the isopinocamphone chemotype of *Mentha citrate* hybrids. Phytochemistry 25(8):1857-63.
27. Olszewska, M.A., Michel, P. 2009. Antioxidant activity of inflorescences, leaves and fruit of three sorbus species in relation to their polyphenolic composition. Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters 23(16):1507-21.
28. Polat, A.A., Caliskan, O., Serce, S., Saracoglu, O., Kaya, C., Ozgen, M. 2010. Determining total phenolic content and total antioxidant capacity of loquat cultivars grown in Hatay. Pharmacognosy Magazine 6(21):5-8.
29. Canadanovic-Brunet, J.M., Djilas, S.M., Cetkovic, G.S., Tumbas, V.T., Mandic, A.I., Canadanovic, V.M. 2006. Antioxidant activities of different *Teucrium montanum* L. extracts. International Journal of Food Science and Technology 41(6):667-73.
30. Konczak, I., Okuno, S., Yoshimoto, M., Yamakawa, O. 2004. Caffeoylquinic acids generated *in vitro* in a high-anthocyanin-accumulating sweet potato cell line. Journal of Biomedicine and Biotechnology 5:287-92.
31. Kosar, M., Dorman, D., Baser, K., Hiltunen, R. 2004. An improved HPLC post-column methodology for the identification of free radical scavenging phytochemicals in complex mixtures. Chromatographia 60(11-12):635-8.
32. Oboh, G., Raddatz, H., Henle, T. 2008. Antioxidant properties of polar and non-polar extracts of some tropical green leafy vegetables. Journal of science of

Food and Agriculture 88(14):2486-92.
33. Hertog, M.G.L., Hollman, P.C., Katan, M.B., Kromhout, D. 1993. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and determinants in adults in the Netherlands. Nutrition and Cancer 20(1):21-9.
34. Kampa, M., Alexaki, V.I., Notas, G., Nifli, A.P., Nifli, A.P., Nistikaki, A. ,Hetzoglou, A., Bakogeorgou, E., Kouimtzoglu, E., Blekas, G., Boskou, D., Gravanis, A., Castanas, E. 2004. Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action. Breast Cancer Research 6(2):63-74.
35. Caccetta R.A.A., Croft, K.D., Beilin, L.J., Puddey, I.B. 2000. Ingestion of red wine significantly increases plasma phenolic acid concentrations but does not acutely affect *ex vivo* lipoprotein oxidizability. American Journal of Clinical Nutrition 71(1):67-74.
36. Proestos, C., Boziaris, I.S., Nychas, G.J.E., Komaitis, M. 2006. Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. Food Chemistry 95(4):664-71.
37. Stanojevic, L., Stankovic, M., Nikolic, V., Nikolic, L. 2008. Anti-oxidative and antimicrobial activities of *Hieracium pilosella* L. extracts. Journal of the Serbian Chemical Society 73(5):531-40.
38. Wen, A.M., Delaquis, P., Stanich, K., Toivonen, P. 2003. Antilisterial activity of selected phenolic acids. Food Microbiology 20(3):305-11.
39. Ebrahimzadeh, M.A., Nabavi, S.F., Nabavi, S.M., Eslami, B. 2010. Antihemolytic and antioxidant activities of *Allium paradoxum*. Central European Journal of Biology 5(3):338-45.
40. Stanojevic, L., Stankovic, M., Nikolic, V., Nikolic, L., Ristic, D., Canadanovic- Brunet, J., Tumbas, V. 2009. Antioxidant activity and total phenolic and flavonoid contents of *Hieracium pilosella* L. extracts. Sensors 9:5702-14.
41. Nabavi, S.F., Nabavi, S.M., Ebrahimzadeh, M.A., Asgarirad, H. 2011. The antioxidant activity of wild medlar (*Mespilus germanica* L.) fruit, stem bark and leaf. African Journal of Biotechnology 10(2):283-9.
42. Arabbi, P.R., Genorese, M.I., Lajolo, F.M. 2004. Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian population. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52(5):1124-31.
43. Gruz, J., Ayaz, F.A., Torun, H., Strnad, M. 2011. Phenolic acid content and radical scavenging activity of extracts from medlar (*Mespilus germanica* L.) fruit at different stages of ripening. Food Chemistry 124(1):271-7.
44. Kadioglu, A., Yavru, I. 1998. Changes in the chemical content and polyphenol oxidase activity during development and ripening of cherry laurel. Phyton (Horn, Austria) 37(2):241-51.
45. Ozcan, T. 2008. Some vitamin and organic acid contents in the fruits of *prunus spinosa* L. subsp. *Dasyphylla* (Schur) domain from Europe-in-Turkey. IUFS Journal of Biology 67(2):105-14.
46. Rop, O., Sochor, J., Jurikova, T., Zitka, O., Skutkova, H., Mlcek, J., Salas, P., Krska, B., Babula, P., Adam, V., Kramarova, D. 2011.

Effect of five different stages of ripening on chemical compounds in medlar (*Mespilus germanica* L.). Molecules 16:74-91.

47. Glew, R.H., Ayaz, F.A., Sanz, C., VanderJagt, D.J., Huang, H.S., Chuang, L.T., Strnad, M. 2003. Effect of postharvest period on sugars, organic acids and fatty acids composition in commercially sold medlar (*Mespilus germanica* 'Dutch') fruit. European Food Research and Technology 216(5):390-4.
48. . Haciseferog Ullari, H., Ozcan, M., Sonmete, M.H., Ozbek, O. 2005. Some physical and chemical parameters of wild medlar (*Mespilus germanica* L.) fruit grown in Turkey. Journal of Food Engineering 69(1):1-7.
49. Glew, R.H., Ayaz, F.A., VanderJagt, D.J., Millson, M., Dris, R., Niskanen, R. 2007. Mineral composition of medlar (*Mespilus germanica*) fruit at different stages of maturity. Journal of Food Chemistry 26(5):441-7.
50. Panvini, A.D., Eickmeier, W.G. 1993. Nutrient and water relations of the mistletoe *Phoradendron leucarpum* (Viscaceae): how tightly are they integrated? American Journal of Botany 80(8):872-8.
۵۱. کرتولی نژاد، د.، حسینی، س.م.، میرنیا، س.خ. و شایان مهر، ف. (۱۳۸۶). اثر داروش بر چهار عنصر غذایی **Na**، Mn، Zn **و** Mg و سطح و وزن برگ درختان میزبان در جنگل‌های هیرکانی. مجله پژوهش و سازندگی، شماره ۷۷، ص ۴۷ تا ۵۲.
52. Vinson, Joe A., Zubik, L., Bose, P., Samman, N., Proch, J. 2005. Dried fruits: excellent*in vitro* and *in vivo* antioxidants. Journal of the American college of Nutrition 24(1):44-50.
53. Yuka, K., Hideyuki, I., Miyuki, K., Takao, I., Tsutomu, H. 2008. Characterization and antioxidative properties of oligomeric proanthocyanidin from prunes, dried fruit of *Prunus domestica* L. Journal of BioSci Biotechnol Biochem 72(6):1615-8.
54. Dincer, B., Colak, A., Aydin, N., Kadioglu, A., Güner, S. 2002. Characterization of polyphenoloxidase from medlar fruits (*Mespilus germanica* L., Rosaceae). Food Chemistry, 17(1): 1-7.
55. Relf, D. 2009. Environmental Horticulture: Guide to nutrient management. Virginia Department of Conservation and Recreation. Virginia Polytechnic Institute and State University, 187p.