Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 7, No. 3, 2011, p. 158-168

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۷، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۰، ص. ۱۶۸-۱۵۸

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

مریم قادری قهفرخی[۱*]- علیرضا صادقی ماهونک[۲]- مرتضی خمیری[۳]- مهران اعلمی[۴]- راحیل رضائی[۵]

تاریخ دریافت: ۸۹/۹/۸
تاریخ پذیرش: ۹۰/۵/۳

## چکیده

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

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

## مقدمه

آنتی اکسیدان‌ها نقش مهمی در مهار رادیکال‌های آزاد و شکستن واکنش‌های زنجیری اکسیداسیون دارند. مهار واکنش‌های اکسیداسیون در مواد غذائی، داروئی، آرایشی و بهداشتی و جلوگیری از بروز بیماری‌های مرتبط به استرس‌های اکسیداتیو، برخی از عملکردهای مفید آنتی اکسیدان‌ها به شمار می‌آیند ( Moure et al, 2001).کاربرد آنتی اکسیدان‌های سنتزی نظیر بوتیلات هیدروکسی آنیزول (BHA)، بوتیلات هیدروکسی تولوئن (BHT) و پروپیل گالات در حین فرآوری مواد غذائی منجر به بروز آثار جانبی نامطلوبی می‌گردد که از آن جمله می‌توان به سرطان زائی و بزرگ شدن کبد اشاره کرد. در نتیجه این محدودیت‌ها امروزه یافتن آنتی اکسیدان‌های طبیعی که قادر به مهار واکنش‌های زنجیری رادیکال‌های آزاد، کند کردن روند تند شدن اکسیداتیو روغن‌ها و محافظت از بدن انسان در مقابل بیماری‌ها می‌گردند، از اهمیت زیادی برخوردار است (Ebrahimabadi et al, 2010).

آلودگی میکروبی یکی دیگر از مشکلاتی است که صنایع غذائی،

۱و۵- دانش آموخته کارشناسی ارشد دانشکده علوم و صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.
(*-نویسنده مسئول: Email: mghaderi_gh@yahoo.com)
۲و۴- استادیار دانشکده علوم و صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.
۳- دانشیار دانشکده علوم و صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

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

درخت بلوط متعلق به خانواده فاگاسه و جنس کوئرکوس می‌باشد. میوه‌ی این درخت یکی از منابع غنی از کربوهیدرات، اسید آمینه، چربی و استرول‌های مختلف بوده که از قدیم الایام در بسیاری از مناطق جهان در تهیه‌ی نان یا کیک مورد استفاده قرار گرفته است. میوه‌ی بلوط علاوه بر ترکیبات تغذیه‌ای حاوی مقادیر قابل توجهی از ترکیبات فعال بیولوژیکی می‌باشد که از آن جمله می‌توان به تانن، گالیک اسید، الاجیک اسید و مشتقات گالویل یا هگزا هیدروکسی دی فنوئیل اشاره کرد که تمامی این ترکیبات دارای خواص آنتی اکسیدانی هستند (Rakic et al, 2007). در منابع علمی خواص درمانی بسیاری برای قسمت‌های مختلف درخت بلوط نظیر برگ، پوست ساقه‌های جوان، پوست تنه و گل‌های آن اشاره شده است که از آن جمله می‌توان به خواص ضد عفونی کنندگی میوه بلوط اشاره کرد (حاجی شریفی، ۱۳۸۲). علی رغم پوشش انبوه جنگل‌های بلوط در مناطق مختلف کشور، مطالعات اندکی در زمینه فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های مختلف میوه این درخت به ویژه علیه باکتری‌های عامل فساد مواد غذائی صورت گرفته است. از آنجائی که بیشتر بررسی‌های انجام شده در این زمینه روی برگ، پوسته داخلی و پوسته تنه درخت بلوط صورت گرفته، لذا هدف از این تحقیق، بررسی خواص ضد رادیکالی، ضد میکروبی و تعیین ترکیبات فنولی عصاره متانولی میوه دو واریته بلوط ایرانی می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

### تهیه عصاره

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

### اندازه گیری میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی

مقدار کل ترکیبات فنولی با روش فولین سیوکالته (Slinkard & Singelton, 1977) اندازه‌گیری شد. جهت تعیین میزان ترکیبات فلاونوئیدی نیز از روش چانگ و همکاران (2004) استفاده شد.

### میزان به دام اندازی رادیکال‌های آزاد DPPH [1]

برای این منظور، محلول‌هائی با غلظت‌های مختلف از عصاره‌ها و

[1] - 2, 2`- diphenyl 1-2- picryl hydrazyl

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

$$\text{به دام اندازی رادیکال آزاد (٪)} = \frac{(A_c - A_s)}{A_c} \times 100 \qquad (۱)$$

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

## تعیین نوع ترکیبات فنولی عصاره‌ها با روش کروماتوگرافی مایع با کارائی بالا[1]

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

مدل دستگاه : مرک- هیتاچی ال- ۷۱۰۰ ، دتکتور: دتکتور دیود اری هیتاچی ال- ۲۴۵۰، آون ستون : هیتاچی ال- ۲۳۰۰ و نوع ستون : آر پی- ۱۸[2] با ابعاد ۴/۶ × ۲۵۰ میلی‌متر و اندازه‌ی ذرات ۵ میکرو متر.

فاز متحرک مورد استفاده در این بررسی شامل آب دیونیزه : استونیتریل: اسید استیک با نسبت ۸۹ : ۱۰ : ۱ (حجمی: حجمی)، سرعت جریان فاز متحرک در ستون ۱ میلی‌لیتر در هر دقیقه، سیستم مورد استفاده ایزو کراتیک[3] و دمای ستون ۲۵°c بود. جهت شناسائی نوع ترکیبات فنولی از استانداردهای اسید گالیک، اسید فرولیک، اسید کلروژنیک، اسید کافئیک، اسید سیرینجیک و اسید *p*- کوماریک استفاده شد. برای این منظور حدود ۱۰۰ میلی‌گرم از هر عصاره در ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۱۰٪ حل شد و به مدت ۱۰ دقیقه در حمام فراصوت قرار گرفت. سپس محلول‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت g ۱۰۰۰ سانتریفوژ شدند. جهت جلوگیری از ورود ناخالصی‌های احتمالی موجود در عصاره‌ها به ستون، محلول‌های عصاره با فیلترهای سرنگی با اندازه‌ی منافذ ۰/۲ میکرومتر صاف و در نهایت از محلول خروجی از صافی ۲۰ میکرولیتر به دستگاه تزریق گردید (Arabshahi, 2006).

## ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ها

### تهیه سویه‌های میکروبی

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

### تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC)[4]

حداقل غلظت مهار کنندگی عصاره‌های متانولی دو واریته با استفاده از روش رقت سازی در چاهک (میکروبراث دایلوشن) مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور از پلیت‌های استریل ۹۶ خانه‌ای استفاده شد. محلول استوک عصاره در دی متیل سولفوکساید تهیه گردید و غلظت‌های مختلف عصاره (از ۴۰ تا ۰/۱۵۶ میلی‌گرم در میلی لیتر) با رقیق سازی محلول استوک با محیط کشت مولر هینتون براث تهیه شد. باکتری‌ها به مدت یک شبانه روز قبل از انجام آزمایش، در دمای ۳۷°C روی محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شدند. جهت تهیه سوسپانسیون میکروبی ($10^6$ cfu/ml) از رقت ۰/۵ مک فارلند استفاده شد. بعد از پر کردن چاهک‌ها، میکروپلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷°C قرار داده شد و بعد از طی این دوره میزان کدورت توسط دستگاه الایزا ریدر (بیوتک اینسترومنت) در طول موج ۶۳۰ نانومتر قرائت شد. اولین خانه‌ای که در آن کدورتی دیده نشد به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) تعیین شد. آزمایشات در ۳ تکرار و ۳ زمان مختلف انجام شد (NCCLS, 2000).

### حداقل غلظت کشندگی (MBC)[5]

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

---

[1] - High Performance liquid Chromatography
[2] - Reverse Phase - 18
[3] - Isocratic
[4] - Minimum Inhibitory Concentration
[5] - Minimum Bactericidal Concentration

## آنالیز آماری

در این پژوهش تیمارها در سه تکرار انجام شده و نتایج به دست آمده با استفاده از روش آنالیز واریانس (ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال (P<۰/۰۵) صورت گرفت. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SAS.9.1 و رسم نمودارها با نرم افزار Excel انجام شد.

## نتایج و بحث

### مقدار ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و بازدهی استخراج

مقدار ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و بازدهی استخراج عصاره‌های فنولی دو واریته در جدول ۱ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود اختلاف معنی داری (P< ۰/۰۵) بین عصاره‌ها از نظر این سه ویژگی وجود دارد. مقدار ترکیبات فنولی کل عصاره MC به طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر از MP بود.

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

| واریته | مقدار کل ترکیبات فنولی (میلی گرم گالیک اسید/گرم عصاره) | مقدار کل ترکیبات فلاونوئیدی (میکروگرم کوئرسیتین/گرم عصاره) | بازدهی استخراج (٪) |
|---|---|---|---|
| کاستانیفولیا | ۳۱۳/۶۹ $^{a}$ ± ۷/۶۳ | ۱۵۰/۳۱ $^{a}$ ± ۵/۶۵ | ۳۴/۷۸$^{a}$ |
| پرسیکا | ۲۸۱/۵۵ $^{b}$ ± ۸/۳۵ | ۱۲۶/۸ $^{b}$ ± ۸/۶۷ | ۲۸/۹$^{b}$ |

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

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

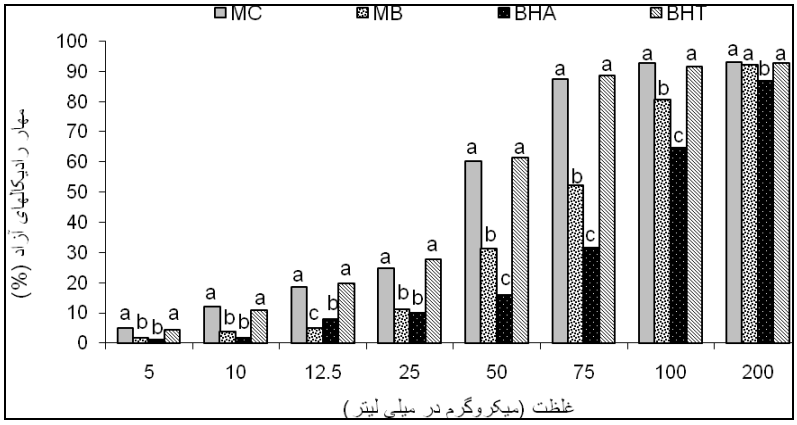
با در نظر گرفتن معادله خط استاندارد کوئرسیتین ($R^2$ =۰/۹۹۸)، مقدار ترکیبات فلاونوئیدی دو واریته بلوط از ۱۲۶/۸ برای MP تا ۱۵۰/۳۱ میکروگرم معادل کوئرسیتین در هر گرم عصاره متغیر بود. واریته‌های مورد استفاده در این بررسی، تاثیر معنی‌داری (P<۰/۰۵) بر میزان بازدهی استخراج و احتمالاً نوع ترکیبات استخراج شده داشته اند. آنالیز همبستگی بین مقدار ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی انجام شد. نتایج حاکی از وجود همبستگی مثبت بالائی بین مقدار این ترکیبات در دو عصاره بود (P<۰/۰۱ ، $R^2$ = ۰/۹۳). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت، بخش قابل ملاحظه‌ای از فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها احتمالاً مربوط به ترکیبات فلاونوئیدی آنها خواهد بود. همبستگی بالائی بین مقدار ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی میوه‌های آناناس و موز گزارش شد که با نتایج به دست آمده در این تحقیق مطابقت دارد (Alothman et al, 2009).

### به دام اندازی رادیکال‌های آزاد DPPH

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

2004). مهار رادیکال‌های آزاد یکی از شناخته شده ترین مکانیسم‌هائی است که به واسطه آن ترکیبات آنتی اکسیدانی می‌توانند اکسیداسیون چربی‌ها را مهار نمایند. نتایج آنالیز واریانس نشان داد، نوع و غلظت عصاره‌ها و آنتی آکسیدان‌های سنتزی تاثیر معنی‌داری بر میزان مهار رادیکال‌های آزاد داشتند. هم‌چنین نتایج حاکی از آن بود که توانائی عصاره‌ها در مهار رادیکال‌های آزاد وابسته به غلظت بوده و با افزایش غلظت فعالیت ضد رادیکالی آنها افزایش می‌یابد. شکل ۱ میزان مهار رادیکال‌های آزاد توسط غلظت‌های مختلف عصاره‌های متانولی دو واریته و آنتی اکسیدان‌های سنتزی را نشان می‌دهد. در تمامی غلظت‌های مورد بررسی اختلاف معنی داری بین BHT و MC مشاهده نشد. اگرچه بین میزان مهار رادیکال‌های آزاد عصاره MP و BHA در غلظت‌های کمتر از ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر اختلاف چشم‌گیری مشاهده نشد، اما با افزایش غلظت این ویژگی برای عصاره MP به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت به طوری که در غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از این نظر با BHT نیز قابل رقابت بود. در کل افزایش غلظت ترکیبات فنولی به طور مستقیم میزان توانائی عصاره‌های مختلف را در مهار رادیکال‌های آزاد افزایش می‌دهد. در غلظت‌های بالاتر ترکیبات فنولی به دلیل افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل موجود در محیط واکنش، احتمال اهداء هیدروژن به رادیکال‌های آزاد و به دنبال آن قدرت مهار کنندگی عصاره افزایش می‌یابد (Sanchez-Moreno et al, 1999).

قدرت مهار کنندگی عصاره‌های مختلف به میزان زیادی به تعداد و موقعیت گروه‌های هیدروکسیل و وزن مولکولی ترکیبات فنولی بستگی دارد. در ترکیبات فنولی با وزن مولکولی پائین‌تر گروه‌های هیدروکسیل راحت تر در دسترس قرار می‌گیرند (Jung et al, 2006). معمولاً برای مقایسه فعالیت ضد رادیکالی عصاره‌های مختلف از فاکتوری تحت عنوان $EC_{50}$ استفاده می‌شود. طبق تعریف $EC_{50}$ به غلظتی از عصاره اطلاق می‌گردد که در آن ۵۰٪ از رادیکال‌های آزاد DPPH موجود در محیط واکنش مهار شوند. بنابراین هر چه این غلظت کمتر باشد، نشان دهنده این است که عصاره مورد نظر فعالیت ضد رادیکالی بیشتری دارد. در این بررسی نیز مقادیر $EC_{50}$ برای تمامی عصاره‌های تعیین و با آنتی اکسیدان‌های سنتزی BHA و BHT مقایسه گردید (جدول ۲). همانطور که در جدول دیده می‌شود، کمترین میزان $EC_{50}$ متعلق به BHT بود که از این نظر اختلاف معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) با عصاره MC نداشت. هم‌چنین اختلاف معنی‌داری بین $EC_{50}$ عصاره MP و BHA دیده شد و این عصاره از نظر میزان مهار رادیکال‌های آزاد نسبت به BHA قوی‌تر بود.




**شکل ۱- مقایسه میانگین درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH غلظت‌های مختلف عصاره‌های متانولی میوه‌ی دو واریته بلوط و آنتی اکسیدان‌های سنتزی**

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

**جدول ۲- مقایسه میانگین مقادیر EC50 (میکروگرم عصاره در میلی‌لیتر) برای عصاره‌های متانولی دو واریته‌ی بلوط، BHA و BHT**

| عصاره | واریته | | آنتی اکسیدان سنتزی | |
|---|---|---|---|---|
| | کاستانیفولیا | برانتی | BHA | BHT |
| $EC_{50}$ | ۴۲/۸۴ c | ۷۰/۴۰ b | ۸۹/۴۶ a | ۴۱/۷۳ c |

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

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

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

**جدول ٤- حداقل غلظت کشندگی (MBC) (میلی گرم/میلی لیتر) عصاره‌های متانولی میوه دو واریته بلوط**

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

تفاوت‌های مشاهده شده بین $EC_{50}$ عصاره‌های مختلف در این تحقیق را می‌توان به تفاوت در مقادیر ترکیبات فنولی آنها نسبت داد. میزان ترکیبات فنولی، به طور مستقیم فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره-ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد.

ضریب هم‌بستگی معکوسی بین مقدار ترکیبات فنولی عصاره‌ها با $EC_{50}$ آنها به دست آمد (r = -۰/۹۹، P=۰/۰۳۶) که خود موید این است که عصاره‌هائی که حاوی مقادیر بیشتری از ترکیبات فنولی می-باشند، در غلظت‌های پائین توانائی بیشتری در مهار رادیکال‌های آزاد از خود نشان می‌دهند. محققین دیگری نیز توانائی عصاره‌های گیاهی مختلف را در مهار رادیکال‌های آزاد DPPH مورد بررسی قرار داده‌اند. در بررسی انجام شده روی دو گونه‌ی بلوط کوئرکوس کریس و کوئرکوس روبور، میزان مهار رادیکال‌های DPPH در غلظت‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد، با افزایش غلظت عصاره متانولی از ۱۰۰- ۱۲/۵ میکرو گرم در میلی‌لیتر درصد مهار رادیکال‌های آزاد به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت. مقادیر $EC_{50}$ برای دو واریته کریس و روبور به ترتیب ۸/۸۸ و ۸/۰۴ میکرو گرم در میلی‌لیتر بود (Rakic et al, 2007). هم‌چنین در غلظت‌های بالا، فعالیت رادیکال‌زدائی عصاره‌ها به طور معنی دار افزایش نیافت که با نتایج به دست آمده در این بررسی مطابقت داشت. در بررسی دیگری فعالیت آنتی اکسیدانی دو نوع قارچ وحشی (Ld) *Lactarius deliciosus* و (Tp) *Tricholoma portentusum* را مورد بررسی گرفت. مقادیر $EC_{50}$ برای قارچ‌های Ld و Tp به ترتیب ۸/۵۲ و ۲۲/۹ میلی‌گرم در میلی لیتر بود. تفاوت‌های مشاهده شده بین مقادیر $EC_{50}$ عصاره‌ی متانولی دو نوع قارچ را به تفاوت در مقدار ترکیبات فنولی آنها نسبت دادند (Ferreira et al, 2007). مقدار ترکیبات فنولی در عصاره Ld و Tp به ترتیب ۱۷/۲۵ و ۱۰/۸۰ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره بود. همانطور که مشاهده شد، یافته‌های به دست آمده توسط سایر محققین حاکی از آن است که بین مقدار ترکیبات فنولی عصاره‌های گیاهی با فعالیت ضد رادیکالی آنها ارتباط وجود دارد. این یافته‌ها با نتایج تحقیق حاضر را تائید می‌نماید.

## فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ها

فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های متانولی دو واریته بـر تعـدادی از باکتری‌های پاتوژن موجود در مواد غذائی مورد بررسی قـرار گرفـت و نتایج به دو شکل MIC و MBC در جداول ۳ نشان داده شده است. میزان MIC عصاره‌های MC و MP به ترتیب در محدوده غلظت ۵- ۰/۳۱۲ و ۱۰-۱/۲۵ میلی گرم در میلی لیتر و میزان MBC آنهـا نیـز ۱۰- ۰/۳۱۲ و ۱۰- ۱/۲۵ میلی گرم در میلی لیتر متغیر بود.

نتایج نشان داد هر دو عصاره مورد بررسی در غلظت های مختلف توانستند روی پاتوژنهـا اثـرات ضـد میکروبـی داشـته باشـند. در کـل باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌هـای گـرم منفـی حساسـیت بیشـتری نشـان دادنـد. . بـاکتری هـای گـرم منفـی عـلاوه بـر پپتیدوگلیکان، یک لایه دیگر به نام غشای خارجی در دیـواره سـلولی خود دارند. سطح هیدروفیلی این غشا که غنی از مولکول های لیپوپلی ساکاریدی می باشد به عنوان مانع در برابر آنتی بیوتیک ها عمل مـی کند. همچنین آنزیم های موجود در فضـای پـری پلاسـمایی، قادرنـد مولکول های ورودی از بیرون را بشکنند امـا در مـورد بـاکتری هـای گرم مثبت، مواد ضـد میکروبـی بـه راحتـی دیـواره سـلولی و غشـای سیتوپلاسمی را تخریب کرده که منجر به نشت سیتوپلاسـم و انعقـاد آن می شوند (Duffy & Power, 2001). با توجه به موارد گفته شده علت MBC بالاتر در مورد باکتری‌های گرم منفـی نسـبت بـه انـواع مثبت توجیه می‌شود.

نتایج حاکی از آن بود که عصاره MC بر اکثر باکتری‌هـای مـورد بررسی اثر بازدارندگی بیشتری داشت. رشد تمامی بـاکتری‌هـای گـرم مثبت در غلظت ۰/۳۱۲ mg/ml این عصاره مهار شد، این در حالیست که برای مهار رشد باکتری‌های نـامبرده بـه غلظـت‌هـای بیشـتری از عصاره MP نیاز بود (۱/۲۵ mg/ml). از بین باکتری‌های گـرم منفـی نیز سیتروباکتر نسبت به بقیه مقاومت بیشـتری داشـت در حـالی کـه یرسینیا انتروکولیتیکا مقاومت کمتری نشان داد. حداقل غلظـت مهـار کنندگی برای باکتری های گرم منفی در حضـور عصـاره MC بـرای اشرشیاکلی، سالمونلا تیفی و شـیگلا دیسـانتری مسـاوی بـود امـا در حضور عصاره MP به ترتیب سیتروباکتر و اشرشیاکلی، سالمونلا تیفی و شیگلا دیسانتری و در نهایت یرسینیا انتروکولیتیکا بیشترین غلظـت مهار کنندگی را به خود اختصاص دادنـد. همـانطور کـه در جـدول ۴ مشاهده می‌شود، عصاره‌ها روی تمامی باکتری‌های مورد بررسـی اثـر کشندگی داشته‌اند. میزان MBC مربـوط بـه MP در مقابـل بـاکتری میکروکوکوس و استافیلوکوکوس اورئوس مسـاوی MC بـود، امـا در مورد باسیلوس سرئوس عصاره MC تاثیر بیشـتری داشـت. در مـورد عصاره MP کمترین اثر باکتری‌کشی مربوط به سـیترو بـاکتر بـود در حالی که بیشترین میزان MBC برای عصـاره MC در برابـر شـیگلا دیسانتری بود به طوری که تنها غلظت‌هـای بـالای ایـن عصـاره‌هـا (۱۰ mg/ml) اثر کشندگی داشتند. در مورد سـایر بـاکتری‌هـای گـرم منفی، غلظت‌های پائین تری عصاره MC تـاثیر قابـل ملاحظـه‌تـری نسبت به MP داشتند. فعالیت ضـد میکروبـی بـالاتر عصـاره MC را می‌توان به مقادیر بالاتر ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی این عصـاره در مقایسه با MP نسبت داد. عصاره اتانولی گیـاه *Eclipta prostrata* نیز در مقایسه به سایر حلال هـا (آب، هگـزان، اتیـل اسـتات) نقـش مؤثری در جلوگیری از رشد همه باکتری های مورد آزمون داشت کـه بـه مقـادیر بـالاتر ترکیبـات فنـولی ایـن عصـاره نسـبت داده شـد (Karthikumar et al, 2007). عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی مـی- توانند عملکردهای مختلفی را در مقابل سویه‌هـای باکتریـائی از خـود نشان دهند که از آن جمله می‌توان به تداخل با غشـای فسـفولیپیدی دو لایه‌ای سلول اشاره کرد که به دنبال آن نفوذ پذیری غشاء افزایش و مواد درون سلولی کاهش می‌یابد. از سایر مکانیسم ها می‌تـوان بـه آسیب به آنزیم‌های دخیل در تولید انرژی و ترکیبات ساختاری سـلول و نیز غیر فعال کردن ترکیبات ژنتیکی اشاره کـرد (Kotzekidou et al, 2008). فعالیت ضد میکروبی عصاره متانولی پوسته خارجی میـوه بلوط *(Q.branti)* بر روی تعدادی از باکتری‌های گرم منفی بـا روش دیسک دیفوزیون مورد بررسـی قـرار گرفـت. نتـایج نشـان داد، تـاثیر عصاره روی باکتری‌های اشرشیاکلی و سودوموناس میـرابیلیس قابـل ملاحظه و وابسته به غلظت بوده، اما تاثیر چندانی روی باکتری شیگلا فلکسنری نداشـته اسـت. خسـروی و بهـزادی (2008) فعالیـت ضـد میکروبی پوسته بلوط را به حضور ترکیبات تانی در آن نسـبت دادنـد. در پژوهش دیگری فعالیت ضد میکروبی عصاره اتـانولی (۵۰٪) میـوه بلوط با روش انتشار دیسک ارزیابی و با تعدادی از آنتی بیوتیـک‌هـای رایج مقایسه شد. نتایج نشان داد که اثر عصاره‌ها بر روی بـاکتری‌هـا وابسته به غلظت بوده است. در مقایسه با آنتی بیوتیک‌ها نیـز غلظـت ۷۵ mg/ml عصاره‌ها بر استافیلوکوکوس اورئوس مشابه جنتامایسـین بوده است. این اثر بر روی باکتری اشرشیاکلی کمتر از جنتامایسـین و کانامایسین و بیشتر از ثوبرامایسین بوده است (ابراهیمـی و همکـاران، ۱۳۸۸). شهیدی و همکاران (2004) فعالیـت ضـد میکروبـی عصـاره متانولی *Q. acerifolia* را در غلظت ۲۰ mg/ml مورد بررسـی قـرار دادند اما هیچ گونه منطقه مهاری بـرای بـاکتری‌هـای اسـتافیلوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و اشرشیاکلی گـزارش نکردنـد. در نتیجه در مقایسه با عدم خاصیت ضد میکروبی عصاره گونـه فـوق، اثر عصاره متانولی واریته‌های مورد بررسـی در ایـن تحقیـق بـر روی باکتری‌های نامبرده بسـیار بیشـتر بـوده اسـت. سـالاری و همکـاران (۱۳۸۷) فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های مختلف هسـته انگـور را بـا تعیین حداقل غلظت کشندگی عصاره‌ها مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاکی از توانائی بالای این عصاره‌ها در از بین بردن باکتری‌های مورد بررسی بود. از نظر میزان MBC بین عصـاره‌هـای مختلـف اخـتلاف معنی‌داری وجود نداشته و در مورد باکتری‌های سـالمونلا انتریـدیس،

اشرشیاکلی و انتروباکتر آئروژنز این میزان ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام و برای استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا مونوسیتوژنز، ۵۰۰ پی‌پی‌ام بود. تاثیر ۱۸ عصاره گیاهی مختلف را بر روی تعدادی از باکتری‌ها با روش انتشار دیسک مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد، اشرشیا کلی حساس ترین سویه باکتری بود و رشد آن توسط تمامی عصاره‌ها مهار شد و به دنبال آن سالمونلا تیفی موریوم و استافیلوکوکوس اورئوس قرار گرفتند (Kotzekidou et al, 2008). اسانس‌های گیاهی نیز دسته دیگری از ترکیبات دارای خواص ضد میکروبی می‌باشند. برومند و همکاران (۱۳۸۷) خاصیت ضد میکروبی اسانس بذرهای شوید و گشنیز را بر روی تعدادی از باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت بررسی کردند. نتایج نشان داد که استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا تیفی موریوم به ترتیب حساس‌ترین و مقاوم‌ترین باکتری به هر دو اسانس بودند و اسانس بذر گشنیز نسبت به شوید اثر کشندگی بیشتری بر باکتری‌های گرم منفی داشت. مقایسه نتایج حاصل از مطالعات مختلف پیچیده به نظر می رسد چرا که نتایج با فاکتورهائی نظیر دما، زمان انکوباسیون، pH محیط و نوع محیط کشت، فاز رشد میکروارگانیسم و حجم محیط کشت مورد استفاده تحت تاثیر قرار می‌گیرد. همچنین، ترکیب شیمیایی، نوع و مکانیسم عمل ترکیبات فنولی هر یک از عصاره‌ها از عوامل مؤثر در ایجاد اختلاف نتایج در فعالیت ضد میکروبی حلال‌ها می‌باشند (Wen et al, 2003).

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

ترکیبات فنولی موجود در عصاره‌ها با مقایسه‌ی زمان بازداری پیک‌های نمونه با زمان بازداری پیک‌های مربوط به استانداردهای اسیدهای فنولی تعیین گردید. جدول ۵ نوع ترکیبات فنولی هر عصاره را نشان می‌دهد. همانطور که در جدول ۵ دیده می‌شود، ترکیب مشترک بین عصاره‌ها اسید گالیک، اسید کلروژنیک و اسید کافئیک بود. اسید گالیک از مشتقات هیدروکسی بنزوئیک اسیدهای فنولی بوده و در ساختار خود دارای ۳ گروه هیدروکسیل می‌باشد و به دلیل قطبیت بالا زودتر از سایر ترکیبات از ستون خارج می‌شود. عصاره‌ی MP حاوی مقادیر جزئی از اسید سیرینجیک بودند. این ترکیب نیز یکی از مشتقات هیدروکسی بنزوئیک اسیدهای فنولی محسوب می‌شود که در ساختار خود دارای ۲ گروه متوکسیل و یک گروه هیدروکسیل می‌باشد. مشتقات هیدروکسی سینامیک اسید دسته‌ی دیگری از اسیدهای فنولی موجود در گیاهان می‌باشند که تفاوت آنها با مشتقات بنزوئیک اسید حضور یک گروه کربوکسیل در ساختار آنها است. اسید p- کوماریک، اسید کلروژنیک، اسید کافئیک و اسید فرولیک در این گروه قرار دارند. اسید کافئیک در ساختار خود دارای دو گروه هیدروکسیل است و از استری شدن آن با اسید کوئینیک، اسید کلروژنیک حاصل می‌گردد. از بین ترکیبات مورد بررسی اسید p- کوماریک بیشترین زمان بازداری را داشت و آخرین پیک موجود در کروماتوگرام مربوط به مخلوط استانداردها مربوط به این ترکیب می‌باشد. حضور این ترکیب تنها در عصاره‌ی MC تشخیص داده شد. تعداد و موقعیت گروه‌های هیدروکسیل فاکتور کلیدی در فعالیت ضد میکروبی ترکیبات فنولی به شمار می‌آید. با افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل، فعالیت میکروبی افزایش می‌یابد (Cowan, 1999). فعالیت‌های ضد میکروبی فلاونوئیدها در نتیجه توانائی تشکیل کمپلکس با دیواره سلولی باکتری‌ها می‌باشد و بنابراین از این طریق از رشد میکروارگانیسم جلوگیری می‌کنند. ترکیبات فنولی از طریق واکنش با گروه‌های سولفیدریل یا بر هم کنش‌های غیر اختصاصی با پروتئین‌ها، از فعالیت آنزیمی جلوگیری به عمل آورده و بدین ترتیب فعالیت ضد میکروبی خود را اعمال می‌کنند. ترکیبات فنولی میوه و پوست سه گونه بلوط کوئرکوس سوبر، الیکس و روتوندیفولیا را با روش کروماتوگرافی مایع مجهز به آشکارسازهای دیوداری بررسی شد. ۳۲ ترکیب فنولی مختلف در نمونه‌ها شناسایی گردید که اکثر آنها از نوع استرهای گالویل گلوکز یا از مشتقات الاجیک اسید بودند. نوع و میزان ترکیبات فنولی در دو گونه‌ی الیکس و روتوندیفولیا مشابه و از نوع مشتقات اسید گالیک بودند، در حالی که ترکیبات فنولی گونه سوبر از مشتقات الاجیک اسید تشخیص داده شدند. پوست گونه سوبر نیز نسبت به دو گونه دیگر مقدار بیشتری از ترکیبات فنولی را دارا بود (Cantos et al, 2003). در زمینه‌ی اندازه‌گیری مقدار و نیز شناسایی نوع ترکیبات فنولی میوه‌ی بلوط به ویژه گونه‌های ایرانی، بررسی‌های اندکی انجام شده است و اکثر تحقیقات در این زمینه بیشتر به اندازه‌گیری و تعیین درصد تانن این میوه محدود شده‌اند. مسعودی نژاد و رضازاده آذری (۱۳۸۲) میزان تانن ده گونه‌ی بلوط ایران را اندازه گیری و گزارش کردند میزان تانن گونه‌ها از ۳/۲ تا ۷/۵٪ متغیر بود. اکثر محققین فعالیت ضد میکروبی عصاره بخش‌های مختلف گیاه بلوط را به تانن‌های آن نسبت داده اند.

مهم‌ترین عاملی که فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیبات فنولی را تحت تاثیر قرار می‌دهد، ساختار شیمیائی آنهاست. توانائی اهداء الکترون یا هیدروژن، تشکیل کمپلکس با فلزات و فعالیت ضد رادیکالی این ترکیبات با تعداد گروه‌های هیدروکسیل موجود در حلقه آروماتیک و موقعیت قرار گرفتن آنها مرتبط است. علاوه بر این حضور سایر گروه‌ها نظیر استیل و متوکسیل و موقعیت آنها نسبت به گروه‌های هیدروکسیل نیز عامل مهمی است که در ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیبات فنولی است باید به آن توجه نمود (Sroka & Cisowski, 2003). اسید گالیک با دارا بودن ۳ گروه هیدروکسیل فعالیت آنتی اکسیدانی بالائی از خود نشان می‌دهد. جایگزین شدن دو گروه هیدروکسیل آن با دو گروه متوکسیل از قدرت آنتی اکسیدانی آن

می‌کاهد. بنابراین اسید سیرینجیک نسبت به اسید گالیک توانائی کمتری در اهداء الکترون از خود نشان می‌دهد. در کل، فعالیت آنتی اکسیدانی هیدروکسی سینامیک اسیدها نسبت به هیدروکسی-بنزوئیک‌ها بیشتر است محققین زیادی با مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانی اسید کافئیک و اسید کلروژنیک گزارش کردند، استری شدن اسید کافئیک با اسید کوئینیک از قدرت آنتی اکسیدانی و توانائی مهار رادیکال‌های آزاد هیدروپراکسید و DPPH آن می‌کاهد. قدرت آنتی اکسیدانی بالاتر اسید کافئیک با حضور دو گروه هیدروکسیل در ساختار آن مرتبط است. اسید *p*- کوماریک اسید نیز با داشتن یک گروه هیدروکسیل می‌تواند نقش به سزائی در مهار رادیکال‌های آزاد داشته باشد اما قدرت آنتی اکسیدانی آن کمتر از اسید فرولیک و اسید کافئیک است (Andreasen et al, 2001). نتایج به دست آمده در آنالیز ترکیبات فنولی عصاره‌ها، نتایج حاصل از آزمون‌های ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی را تائید می‌نماید. در عصاره‌ی MC حضور اسید گالیک، اسید کافئیک، اسید کلروژنیک واسید p- کوماریک، با فعالیت ضد رادیکالی بالای آن همراه است. در زمان بازداری ۹/۴ پیک بزرگی در کروماتوگرام این عصاره مشاهده شد، که با زمان بازداری هیچ‌کدام از استانداردهای مورد استفاده در این بررسی مطابقت نداشت. احتمالاً فعالیت آنتی اکسیدانی بالای این عصاره علاوه بر ترکیبات نامبرده، با حضور این ترکیب ناشناخته نیز مرتبط است. وجود ترکیباتی نظیر اسید کافئیک، اسید گالیک، اسید کلروژنیک و اسید سیرینجیک قدرت آنتی‌اکسیدانی بالای عصاره متانولی واریته‌ی Qb را تائید می‌کند.

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

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

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

## نتیجه گیری

نتایج این پژوهش حاکی از آن بود که میوه بلوط دو واریته مورد بررسی حاوی مقادیر قابل توجهی از ترکیبات فنولی می‌باشد. حضور ترکیبات فنولی نظیر اسید گالیک، اسید کافئیک، اسید کلروژنیک در عصاره میوه بلوط با فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی قابل توجه این عصاره‌ها همراه است. با توجه به اثرات نامطلوب آنتی اکسیدان-های سنتزی بر سلامت انسان و نیز مقاومت سویه‌های باکتریائی به آنتی بیوتیک‌ها، مطالعات بیشتر در زمینه کاربرد این عصاره‌ها در سیستم‌های غذائی فاسد شدنی پیشنهاد می‌گردد. بدین ترتیب با شناسائی ویژگی‌های ارزشمند میوه بلوط، از هدر رفتن مقادیر انبوهی از این میوه در مناطق جنگلی کشور جلوگیری به عمل می‌آید.

## منابع


ابراهیمی، ا.، خیامی، م. و نجاتی، و.، ۱۳۸۸، ارزیابی فعالیت ضد باکتریائی عصاره هیدروالکلی میوه بلوط ایرانی در روش انتشار دیسک، فصلنامه گیاهان داروئی، ۳۳، ۳۴-۲۶.

برومند، ع.، حامدی، م.، امام‌جمعه، ز.، رضوی، ه. و گلمکانی، م.ت.، ۱۳۸۷، بررسی خاصیت ضد میکروبی اسانس بذرهای شوید (*Anethum graveolens*) و گشنیز (*Coriangrum sativum*) بر روی استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی O157:H7 ، سالمونلا تیفی موریوم با استفاده از آزمایش حساسیت رقت در محیط مایع، مجله پژوهش‌های علوم و صنایع غذائی ایران، ۴ (۱)، ۶۸-۵۹.

حاجی شریفی، ا.، ۱۳۸۲، اسرار گیاهان داروئی، انتشارات حافظ نوین، ۲۰۴-۲۰۰.

سالاری، ا.، حبیبی نجفی، م.ب.، فرهوش، ر.، مرعشی، ح.، ۱۳۸۷، بررسی اثر سیستم‌های مختلف حلال بر استخراج عصاره هسته انگور و ارزیابی خواص ضد میکروبی آن، ۴ (۲)، ۷۹-۷۱.

مسعودی‌نژاد، م.ر. و رضازاده آذری، م.، ۱۳۸۲، مقایسه چهار روش استخراج تانن از میوه‌های گونه‌های مختلف بلوط ایران، مجله پژوهشی حکیم، ۱، ۹۱-۸۱.

Alothman, M., Bhat, R. & Karim, A.A., 2009, Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. Food Chemistry, 115, 785–788.

Andreasen, M. F., Landbo, A.K., Christensen, L. P., Hansen, A. & Meyer, A.S., 2001, Antioxidant effects of phenolic rye (Secale cereale L.) extracts, monomeric hydroxycinnamates, and ferulic acid dehydrodimers on human low-density lipoproteins. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 4090-4096.
Arabshahi, D.S., 2006, Studies on selected plant extracts with reference to their nutritional and pharmacological characteristics. PhD Thesis. Mysore India: University of Mysore, Department of Studies in Food Science and Nutrition.
Burt, S., 2004, Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods – A review. International Journal of Food Microbiology, 94, 223–253.
Cantos, E., Espn, J.C., Lpez-Bote, C., Hoz, H., Ordez, J.A. &Toms-Barbern, F.A., 2003, Phenolic Compounds and Fatty Acids from Acorns (Quercus spp.), the Main Dietary Constituent of Free-Ranged Iberian Pigs. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 51, 6248-6255.
Chang, C., Yang, M., Wen, H. & Chern, J., 2002, Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of Food & Drug Analaysis, 10, 178-182.
Cowan, M.M., 1999, Plant Products as Antimicrobial Agents. Clinical Microbiology Review, 12, 564-582.
Demirci, F., Guven, K., Demirci, B., Dadandi, M. Y., & Baser, K. H. C., 2008, Antibacterial activity of two Phlomis essential oils against food pathogens. Food Control, 19, 1159–1164.
Duffy, C.F. & Power, R.F., 2001, Antioxidant and antimicrobial properties of some Chinese plant extracts. International Journal of Antimicrobial Agents, 17, 527-529.
Ebrahimabadi, A.H., Ebrahimabadi, E.H., Jafari-Bidgoli, Z., Jookar Kashi, F., Mazoochi, A. & Batooli, H., 2010, Composition and antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and extracts of Stachys inflata Benth from Iran. Food Chemistry, 119, 452-458.
Faller, A.L.K. & Fialho, E., 2009, The antioxidant capacity and polyphenol content of organic and conventional retail vegetables after domestic coking. Food Research nternational, 42, 210-215.
Ferreira, I.C.F.R., Baptista, P., Vilas-Boas, M. & Barros, L., 2007, Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. Food Chemistry, 100, 1511-1516.
Jung, C.H., Seog, H.M., Choi, I.W., Park, M.W. & Cho, H.Y., 2006, Antioxidant properties of various solvent extracts from wild ginseng leaves. LWT, 39, 266-274.
Karthikumar, S., Vigneswari, K. & Jegatheesan, K., 2007, Screening of antibacterial and antioxidant activities of leaves of Eclipta prostrata (L). Scientific Research & Essay, 2, 101-104.
Khosravi A. D. & Behzadi A., 2006. Evaluation of The Antibacterial Activity of The Seed Hull of Quercus Branti on some Gram Negative Bacteria. Pakistanian Journal of Medicine Science, 22, 429 - 32.
Kotzekidou,P.,Giannakidis,P.& Boulamatsis, A., 2008, Antimicrobial activity of some plant extracts and essential oils against foodborne pathogens in vitro and on the fate of inoculated pathogens in chocolate. LWT, 41, 119–127.
Liu, Q. & Yao, H., 2007, Antioxidant activities of barley seeds extracts. Food Chemistry, 102, 32–737.
Majhenic, L., Skerget, M. & Knez, Z., 2007, Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. Food Chemistry, 104, 1258–1268.
Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Dominguez, M., Sineiro, J. & Dominguez, H., 2001, Natural antioxidants from residual sources. Food Chemistry, 72, 145–171.
National committee for clinical laboratory standards., 2000, Methods for dilution antimicrobia susceptibility tests for bacteria that grow aerobically (5th ed.). Approved standard, M7-A5. Pennsylvania: Wayne.
Oroojalian, F., Kasra-Kermanshahi., Azizi, M. & Bassami, M. R., 2010, Phytochemical composition of the essential oils from three Apiaceae species and their antibacterial effects on food-borne pathogens. Food Chemistry, 120, 765–770.
Prasad, K.N., Yang, B., Dong, X., Jiang, G., Zhang, H., Xie, H. & Jiang, Y., 2009, Flavonoid contents and antioxidant activities from Cinnamomum species. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 10, 627-632.
Rakic, S., Petrovic, S., Kukic, J., Jadranin, M., Tesevic, V., Povrenovic, D. & Siler-Marinkovic, S., 2007, Influence of thermal treatment on phenolic compounds and antioxidant properties of oak acorns from Serbia. Food Chemistry, 104, 830-834.
RuMPaoa, R.G.O., Cornago, D.F. & Geronimo, I.M., 2009, Phenolic content and antioxidant capacity of Philippine potato (Solanum tuberosum) tubers. Journal of Food Composition and Analysis, 22, 546-550.
Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J. A. & Saura-Calixto, F., 1999, Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. Food Research International, 32, 407–412.
Shahidi, B.G., Aghighi, S. & Karimi Nik, A., 2004, Antibacterial and Antifungal Survey in Plants used in Indigenous Herbal-Medicine of South East Regions of Iran. Journal of Biological Science, 4, 405 - 12.
Singh, S. & Singh, R.P., 2008, In Vitro Methods of Assay of Antioxidants: An Overview. Food Reviews International, 24, 392-415.
Slinkard, K. & Singleton, V. L., 1977, Total phenol analysis; automation and comparison with manual methods. American Journal of Enology & Viticulture, 28, 49-55.

Sroka, Z. & Cisowski, W., 2003, Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. Food & Chemical Toxicology, 41, 753-758.
Thoo, Y.Y., Ho, S.K., Liang, J.Y., Ho, C.W. & Tan, C.P., 2010, Effect of binary solvent extraction system, extraction time and extraction temperature on phenolic antioxidant capacity from mengkudu (Morinda citrifolia). Food Chemistry, 120, 290-295.
Wen, A., Delaquis, P., Stanich, K. & Toivonen, P., 2003. Antilisterial activity of selected phenolic acids. Food Microbiology, 56, 305–311.
Yildirim, A., Mavi, A. & Kara, A.A., 2001, Determination of antioxidant and antimicrobial activities of Rumex crispus L. extracts. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 49, 4083-4089.
Zhou, K. & Yu, L., 2004, Effects of extraction solvent on the wheat bran antioxidant activity estimation. LWT, 37, 717-721.

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

**M. Ghaderi[1]*- A. Sadeghi Mahoonak [2]- M. Khomeiri [3]- M. Aalami [4] - R. Rezaei [5]**

Received: 29-11-2010
Accepted: 25-7-2011

**Abstract**

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

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

1&5- Msc Graduated Student of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural sciences & Natural Resources, Gorgan, Iran.
(*- Corresponding author Email: mghaderi_gh@yahoo.com)
2&4- Assistant Professor, Department of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Gorgan, Iran.
3- Associate Professor, Department of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Gorgan, Iran.