

## استخراج و شناسایی ترکیبات فیتواستروژنی، الاجیک، و سیرینژیک اسید از پوست انار

رحمت‌اله زارع‌زاده مهریزی<sup>۱</sup>، زهرا امام‌جمعه<sup>۲\*</sup>، کرامت‌اله رضایی<sup>۳</sup>، محمد شاهدهی باغ‌خندان<sup>۴</sup>، جواد کرامت<sup>۵</sup>، الهه لونی<sup>۶</sup>

۱. کارشناس ارشد دانشگاه صنعتی اصفهان، ۲. استاد دانشگاه تهران، ۳. استاد دانشگاه تهران، ۴. استاد دانشگاه صنعتی

اصفهان، ۵. دانشیار دانشگاه صنعتی اصفهان، ۶. کارشناس دانشگاه تهران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۴ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۹/۸)

### چکیده

در این تحقیق از پوست تازه سه رقم انار معروف ایرانی توسط چهار حلال متفاوت به روش سوکسله عصاره‌گیری شد. عصاره‌ها برای تشخیص کمی و کیفی دو نوع تانیک‌اسید و هفت نوع فیتواستروژن به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) جفت‌شده با شناساگر مرئی-فرابنفش (UV-Vis) تزریق شدند. همچنین در پژوهش انجام‌شده راندمان استخراج از پوست سه رقم انار و چهار حلال با یکدیگر مقایسه شدند. کمیت و کیفیت ترکیبات بررسی‌شده در عصاره‌ها از طریق مقایسه زمان بازداری استانداردهای متناظر ترکیبات و با روش تزریق استاندارد خارجی به دستگاه مشخص شدند. نتایج آزمایش‌ها نشان داد در میان حلال‌ها مخلوط مساوی از چهار حلال آب، اتانول، استون، و اتیل‌استات و در بین ارقام انار رقم پوست‌گلی ملس ساوه بیشترین میانگین راندمان استخراج را داشته‌اند. نتایج آزمایش‌های دستگاه کروماتوگرافی بیانگر این است که در بین هفت فیتواستروژن فقط سه فیتواستروژن استریول (تا ۷/۴۵ میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم پوست تازه)، تستسترون، و استرادیول (تا ۸/۴۳ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم پوست تازه) در مقدار قابل قبول تقریباً در تمامی نمونه‌ها شناسایی شدند. در بین دو نوع تانیک‌اسید، الاجیک‌اسید در کمیتی بسیار بالا (تا ۱۰۳/۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم پوست تازه)، و در تمامی عصاره‌ها و سیرینژیک‌اسید نیز در اغلب نمونه‌ها شناسایی شدند.

کلیدواژگان: استریول، استون، الاجی‌تانن، سوکسله، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا.

### مقدمه

میوه انار از قدیمی‌ترین میوه‌های خوراکی دنیا و درخت آن بومی فلات ایران بوده است که هم‌اکنون در سطح وسیعی در ایران و کشورهای دیگر مانند هند، افغانستان، چین، ژاپن، ترکیه، روسیه، آمریکا و کشورهای حوزه مدیترانه کشت می‌شود (Fadavi *et al.*, 2006). مصرف انار به شکل تازه‌خوری و نیز فرایندشده قسمت‌های خوراکی میوه آن همچون آب انار، کنسانتره، مربا، ژله، رب، و مانند اینها مرسوم است (Hodgson, 1971). بخش عظیمی از ضایعات کارخانه‌های فرایند میوه انار را پوست میوه تشکیل می‌دهد که بسته به رقم آن از ۳۰ تا ۶۰ درصد متغیر است (Zarezadeh, 2008). در مطالعات اخیر (Kim *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2002; Guo *et al.*, 2003; Negi *et al.*, 2003; Seeram. *et al.*, 2005-b; Cam & Hisil, 2010) ثابت شده است که پوست انار شامل تانن‌ها و ترکیبات پلی‌فنولیکی است، فعالیت ضداکسیدانی، ضدسرطانی، و ضدجوش‌زایی بسیار قوی دارد و در فرمولاسیون مواد آرایشی و دارویی استفاده می‌شود. از این رو استفاده بهینه از پوست انار

به‌عنوان بخش مهمی از ضایعات کارخانه بایستی مورد توجه جدی صنعت و دانشگاه قرار گیرد. در این تحقیق ثابت شد که عصاره پوست انار شامل برخی فیتواستروژن‌ها و مشتقات الاجی‌تانن‌هاست. ترکیبات فیتواستروژنی متابولیت‌های ثانویه گیاهی هستند که خصوصیات شبه‌استروژنی دارند و بروز سرطان‌های وابسته به هورمون استروئیدی چون سرطان سینه، پروستات، و سرطان انتهای روده بزرگ (کولن) را کاهش می‌دهند (Wu *et al.*, 2004). تانن‌های قابل هیدرولیز الاجی‌تانن‌ها نامیده می‌شوند که از گروه پلی‌فنول‌ها و دلیل اصلی خصوصیات ضداکسیدانی و ضدجوش‌زایی در میوه انار هستند (Seeram, *et al.*, 2005-a). از مشتقات الاجی‌تانن‌ها می‌توان الاجیک و سیرینژیک‌اسید را نام برد. ظرفیت بالای ضداکسیدانی میوه و پوست انار در پژوهش‌های زیادی گزارش شده است.

بررسی تحقیقات انجام‌شده در این زمینه نشان می‌دهد که تانیک‌اسیدها به‌ویژه الاجیک‌اسید به میزان فراوانی در عصاره پوست انار وجود دارد (Kulkarni & Aradhya., 2004) اما مرور کارهای تحقیقاتی گذشته نشان می‌دهد که فقط تحقیق حاضر و تحقیق (Elswijk *et al.*, 2004) روی پوست انار، مواردی هستند

(Acetone)، و آب یون زدوده (Deionized Water) با درجه کروماتوگرافی از شرکت مرک آلمان (Merck Chemical Company) سفارش داده شدند. بقیه مواد شیمیایی با درجه آزمایشگاهی از شرکت مرک و گاز نیتروژن از شرکت داگا (Daga) در ایران تهیه شد.

#### آماده سازی نمونه های پوست انار برای استخراج با حلال

سه رقم انار معروف ایرانی که مصرف آن ها متداول تر و پوست آن ها از نظر ظاهری بیشترین تفاوت را داشت از مجموعه انار مرکز تحقیقات کشاورزی ساوه، انتخاب شدند (انار شیرین پوست سیاه و ضخیم اردستان، انار ملس پوست گلی ساوه، و انار پوست سفید راور کرمان). از هر رقم به میزان ۲۰ کیلوگرم از میوه های رسیده و سالم چیده شد. انارها در همان روز به آزمایشگاه منتقل و میوه های آفتاب سوخته، ترک خورده، و آفت زده به منظور دستیابی به یکنواختی قابل قبول، حذف شدند. پوست انار از بخش خوراکی و داخلی آن جدا و شسته و در نهایت پوست تازه توسط آسیاب برقی، سه بار و در هر بار به مدت ۱۰ ثانیه خرد شد.

#### استخراج با دستگاه سوکسله

استخراج عصاره از ۱۰ گرم گرانول های ریز شده پوست تازه انار در دستگاه استخراج کننده سوکسله با حلال های اتانول، استون، اتیل استات، و مخلوط مساوی از چهار حلال آب، اتانول، استون، و اتیل استات به مدت ۶ ساعت و سه تکرار انجام شد. به منظور حذف ذرات ریز عصاره های به دست آمده در ۴۵۰۰ دور در دقیقه به مدت سه دقیقه سانتریفیوژ شدند و با کاغذ صافی واتمن شماره ۴۱ (Whatman No.41) صاف و سپس در آون تحت خلأ و در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد تغلیظ شدند. سپس نیمی از این عصاره ها تا زمان استفاده برای استخراج و شناسایی ترکیبات مورد نظر با دستگاه کروماتوگرافی در ظروف شیشه ای کوچک قهوه ای رنگ و داخل فریزر ذخیره شدند و نیم دیگر به منظور تعیین راندمان استخراج درون ظرف شیشه ای مناسب نگه داشته شدند. راندمان استخراج ها در سه تکرار و از طریق حذف حلال از عصاره در آون تحت خلأ و در دمای ۹۰ درجه سانتیگراد تا دستیابی به وزن ثابت نمونه ها تعیین شد.

#### روش استخراج و آماده سازی نمونه ها برای تزریق به دستگاه کروماتوگرافی

به منظور استخراج حداکثر ترکیبات پلی فنولی از عصاره های به دست آمده از دستگاه سوکسله و برای آماده سازی آن ها برای تزریق به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا از روش استخراج مایع-مایع استفاده شد. در این روش نمونه ها در لوله

که وجود فیتواستروژن ها را در پوست انار نشان می دهند. البته فیتواستروژن ها در روغن دانه و بخش های دیگر انار در برخی تحقیقات گزارش شده اند (Dean et al., 1971; Moneam et al., 1988; Abd El Wahab et al., 1998; Lau et al., 2003). تحقیقی نیز منحصراً به بررسی امکان وجود فیتواستروژن ها در میوه انار پرداخته و نتایج آزمایش های آن، امکان وجود ترکیبات فیتواستروژنی در میوه انار را رد کرده است (Choi et al., 2006). با توجه به مطالب فوق اهداف کلی تحقیق حاضر را می توان در چهار بخش خلاصه کرد:

(الف) استخراج عصاره پوست انار با حلال های گوناگون با دستگاه سوکسله (Soxhelt Apparatus) و مقایسه راندمان استخراج ها.

(ب) اثبات وجود ترکیبات فیتواستروژنی در عصاره پوست انار.  
(ج) توسعه روشی مناسب برای جداسازی و شناسایی ترکیبات فیتواستروژنی و الاجی تانن های موجود در پوست انار با دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و شناساگر مرئی-فرا بنفش.

(د) مقایسه عصاره های به دست آمده از حلال ها و ارقام متفاوت انار از نظر مقدار ترکیبات شناسایی شده.

#### مواد و روش ها

در تحقیق حاضر سه رقم انار معروف ایرانی که از نظر رنگ، ضخامت، و خصوصیات فیزیکی دیگر پوست تفاوت داشتند، انتخاب و از پوست آن ها توسط حلال های آلی از قبیل اتانول، اتیل استات، استون، و مخلوط مساوی از چهار حلال آب: اتانول: استون: اتیل استات به روش سوکسله عصاره گیری شد. در انتخاب حلال ها سعی شد تا حلال ها، قطبیت و خواص فیزیکوشیمیایی متفاوتی متناسب با نوع ترکیبات استخراج شده، داشته باشند. ضمن آنکه در بین آن ها حلال هایی با درجه خوراکی مثل آب نیز وجود داشت.

#### مواد شیمیایی

استاندارد هفت فلاونوئید فیتواستروژنی شامل کمپرفول (Kaempferol)، استریول (Estrinol)، استرون (Estrone)، لوتئولین (Luteolin)، تستسترون (Testosterone)، آلفا استرادیول ( $\alpha$ -Estradiol)، استیگما استرول (Stigmasterol)، و همچنین استانداردهای الاجیک و سیرینژیک اسید (ellagic and syringic acid) از شرکت سیگما آلدریج (Sigma Aldrich) و با درجه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا تهیه شدند. حلال های آلی استفاده شده در این تحقیق از قبیل متانول (Methanol)، اتانول (Ethanol)، اتیل استات (Ethyl acetate)، استون

نانومتر استفاده شد. شرایط برای شش فیتواستروژن دیگر شامل موارد زیر بود: فاز متحرکی شامل ۵۵ درصد آب و ۴۵ درصد استونیتریل همراه با بافر فسفات در یک pH معادل ۲/۵ و مدت زمان آنالیز ۱۲ دقیقه، شدت جریان ۱/۲ میلی لیتر بر دقیقه و شناسایی در طول موج ۲۰۰ نانومتر (Abdel Wahab *et al.*, 1998; Choi *et al.*, 2006).

هر دو تانیک اسید (الاجیک و سیرینژیک اسید) نیز در تزریقی به مدت ۱۰ دقیقه و در ۲۸۰ نانومتر به کمک فاز متحرک متشکل از ۷۷ درصد آب و ۲۳ درصد استونیتریل در pH برابر با ۲/۵ و شدت جریان فاز متحرک معادل با ۱/۲ میلی لیتر بر دقیقه جداسازی و شناسایی شدند. برای شناسایی و محاسبات تعیین مقدار هر یک از اجزای بررسی شده از روش استاندارد خارجی استفاده شد. در این روش جزء خالص و استاندارد در شرایطی کاملاً یکسان و جداگانه به دستگاه تزریق می شود و پیک به دست آمده که یک زمان بازداری و یک مساحت سطح دارد، برای شناسایی هر ترکیب زمان بازداری پیک آن با استاندارد متناظرش مقایسه می شود. همچنین به منظور تعیین کمیت آن ابتدا منحنی کالیبراسیون رسم می شود، معادله خط آن به دست می آید و در نهایت با استفاده از مساحت سطح زیر پیک به دست آمده از جزء مورد نظر و معادله خط منحنی کالیبراسیون، غلظت جزء محاسبه می شود. در دستگاه HPLC استفاده شده در این تحقیق، ثبت داده ها، شناسایی کیفی، و تمامی محاسبات کمی با نرم افزار کمستیشن (Agilent Chemstation A.10.01) انجام گرفت.

### تجزیه و تحلیل آماری

داده های مربوط به راندمان استخراج در این تحقیق در سه تکرار با نرم افزار آماری سس ۹،۱ (SAS 9.1) با روش آنالیز واریانس (ANOVA) تجزیه و تحلیل شد و برای نشان دادن حداقل تفاوت معنی داری در سطح اطمینان بالاتر از ۹۵ درصد ( $P \text{value} \leq 0.05$ ) از روش دانکن (Duncan test) استفاده شد. مقادیر در قالب میانگین با دامنه خطای استاندارد نشان داده شدند.

### نتایج و بحث

شکل های ۱ و ۲ و جدول ۱ نحوه شناسایی و جداسازی پیک های شش نوع فیتواستروژن و دو نوع تانیک اسید را نشان می دهند. در پژوهش حاضر اسید فسفریک نقش مؤثری در وضوح و جداسازی پیک ها داشت. برای نمونه پیک های به دست آمده از ترکیب استاندارد شش نوع فیتواستروژن (شکل ۱) و دو نوع تانیک اسید (شکل ۲) آورده شده است.

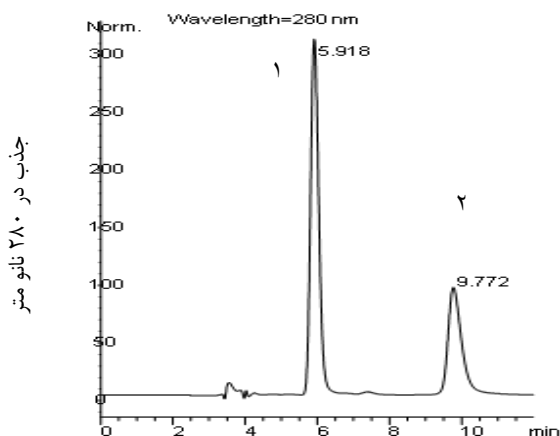
اپندورف (Eppendorf tube) در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۴ دقیقه سانتریفیوژ شدند و حلال آلی آن ها از طریق دمیدن گاز نیتروژن به داخل ظرف به طور کامل حذف شد و دو میلی لیتر آب یون زدوده به نمونه های خشک اضافه شد. ترکیبات مورد نظر در مرحله بعد توسط نیم میلی لیتر اتیل استات از فاز آبی در دمای اتاق، به مدت چند دقیقه و با تکان دادن نمونه ها استخراج و به فاز آلی منتقل شدند. در نهایت فاز آبی حذف و نمونه های آماده شده برای تزریق به دستگاه HPLC با متانول به حجم اولیه خود بازگردانده شدند (Fischer *et al.*, 2009; Mousavinejad *et al.*, 2011).

### دستگاه کروماتوگرافی و روش شناسایی کمی و کیفی

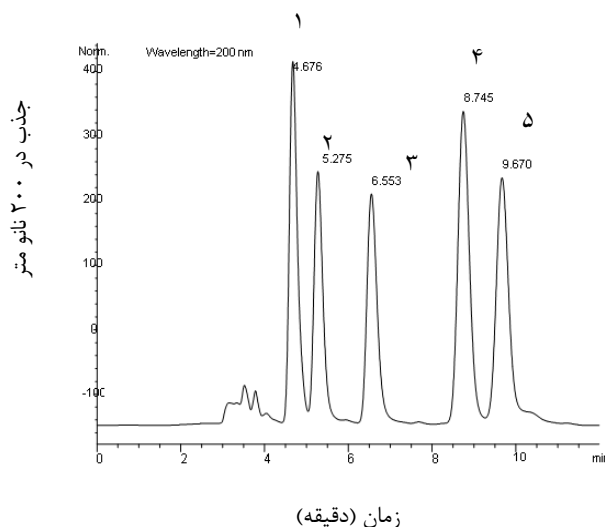
برای انجام این تحقیق از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا ساخت شرکت هولت پاکارد آمریکا مدل ۱۱۰۰ (Hewlett Packard 1100 Series HPLC system) مجهز به ایزوپمپ مدل جی ۱۳۱۰ آ (HP-1200 iso pump G1310A) ، نمونه بردار خودکار مدل جی ۱۳۱۳ آ (HP auto sampler G1313A) و شناساگر مرئی-فرا بنفش هولت پاکارد (HP UV-Vis detector)، استفاده شد.

نمونه ها قبل از تزریق به دستگاه از میکرو فیلتری با مش ۰/۴۵ میکرون ساخت شرکت کرومافیل آلمان (Chromafil CA-45/25 S, Duren, Germany) عبور داده شدند. تمامی نمونه ها در حجم ۲۰ میکرو لیتر و در دمای اتاق به دستگاه تزریق شدند. برای استخراج و جداسازی هفت نوع فیتواستروژن و دو نوع تانیک اسید شامل الاجیک و سیرینژیک اسید از یکدیگر، ترکیب متنوعی از فازهای متحرک بررسی شد و در نهایت مخلوط آب و استونیتریل انتخاب شد. برای جداسازی الاجیک و سیرینژیک اسید و همچنین شش فیتواستروژن از یک ستون فاز معکوس سی ۱۸ ساخت شرکت واترز (Waters) آمریکا با مشخصات ۴،۶ میلی متر قطر و ۲۰۰ میلی متر طول با قطر ذرات ۱۰ میکرون از نوع میکرو بنداپک ( $\mu\text{Bondapak}^{\text{TM}}$  C<sub>18</sub>) و برای استیگما استرول از ستون اچ پی زورباکس سی ۸ ساخت شرکت هولت پاکارد (HP-Zorbax C<sub>8</sub>) و با مشخصات ۴،۶ میلی متر قطر در ۲۰۰ میلی متر طول با قطر ذرات ۱۰ میکرونی استفاده شد. در این تحقیق از شرایط متفاوتی برای جداسازی و شناسایی ترکیبات استفاده شد به طوری که برای جداسازی استیگما استرول در یک تزریق به روش ایزوکراتیک (isocratic) به مدت ۱۵ دقیقه از فاز متحرکی متشکل از ۳ درصد آب و ۹۷ درصد استونیتریل همراه با بافر فسفات در یک pH معادل ۲/۵ و با شدت جریان یک میلی لیتر بر دقیقه و برای شناسایی آن از شناساگر مرئی-فرا بنفش و طول موج ۲۰۸

همپوشانی داشتند و امکان مجزا کردن پیک‌ها نبود. در نتیجه در شناسایی این دو ترکیب دو احتمال موجود است. در جدول ۱ زمان بازداری پیک ترکیبات، معادله خط منحنی کالیبراسیون آن‌ها، محدوده خطی هر یک، و فاکتور همبستگی (r) نشان داده شده است.



شکل ۲. کروماتوگرام استاندارد سیرینژیک (۱) و الجیک اسید (۲) زمان (دقیقه)



شکل ۱. کروماتوگرام استاندارد شش فیتواستروژن (به ترتیب از چپ به راست: استریول (۱)، لوتئولین (۲)، کمپفول (۳)، تستسترون (۴)، استرادیول و استرون (۵). زمان (دقیقه)

در توضیح شکل ۱ باید گفت که پیک استاندارد دو فیتواستروژن آلفاسترادیول و تستسترون کاملاً بر یکدیگر

جدول ۱. معادلات کالیبراسیون و برخی فاکتورهای کروماتوگرام استاندارد ترکیبات

انحراف معیار نسبی (درصد)	حد تشخیص (mg/L)	ضریب همبستگی (r)	معادله خط	محدوده خطی (mg/L)	زمان بازداری (min)	ترکیبات
۸/۸	۰/۰۴	۰/۹۹۹	۷۰/۰۱C-۱/۱۲	۱/۰-۲۵/۰	۴/۶۷۶	استریول
۲/۸	۰/۰۰۸	۰/۹۹۹	۱/۳۰۸C+۰/۷	۰/۷-۰/۲	۹/۶۷۰	آلفا استرادیول
۱۲/۴	۰/۰۱	۰/۹۹۹	۴۸/۹۶C+۱/۸۰	۱/۰-۰/۱	۸/۷۴۵	تستسترون
۱۱/۵	۰/۰۵	۰/۹۹۶	۱۹/۵۲C+۰/۵۲	۰/۵-۵/۰	۵/۹۱۸	سیرینژیک اسید
۱۰/۹	۰/۰۹	۰/۹۹۴	۱۰/۸۶C+۰/۵۳	۱۰/۰-۳۰۰/۰	۹/۷۷۲	الجیک اسید

\* حرف لاتین C در معادله خط معادل غلظت برحسب میلی‌گرم در لیتر است.

در بین حلال‌ها تفاوت فوق‌العاده زیادی مخصوصاً بین مخلوط حلال‌ها (۰/۹۵۷±۰/۳۳۳) و اتیل‌استات (۰/۷۸۸±۰/۰۳۳) دیده می‌شود.

جدول ۲. میانگین راندمان استخراج عصاره از پوست سه رقم انار ایرانی

رقم	تعداد داده	میانگین راندمان استخراج (درصد)*
ملس پوست گلی ساوه	۱۲	۱۲/۹±۰/۲ <sup>a</sup>
ترش پوست سفید راور	۱۲	۱۲/۴±۰/۲ <sup>a</sup>
شیرین پوست سیاه اردستان	۱۲	۱۱/۲±۰/۲ <sup>b</sup>

\* مقادیر ذکر شده، میانگین‌ها با دامنه خطای استاندارد (means ± standard error) حاصل از ۱۲ آنالیز هستند. تفاوت‌های معنی‌دار در سطح اطمینان بالاتر از ۹۵ درصد در هر ستون از جدول با حروف لاتین متفاوت (a, b) نشان داده شده‌اند.

### راندمان استخراج

استخراج عصاره‌ها از پوست سه رقم انار با چهار حلال در سه تکرار انجام شد و در پایان بعد از مراحل صاف کردن و سانتریفیوژ با حذف حلال از عصاره‌ها در آون تحت خلأ در دمای ۹۰ درجه سانتیگراد و رسیدن به وزن ثابت، راندمان استخراج‌ها محاسبه شد. نتایج راندمان استخراج از پوست سه رقم انار (جدول ۲) و چهار حلال (جدول ۳) همراه با تفاوت‌های معنی‌داری میانگین‌ها در سطح اطمینان بالاتر از ۹۵ درصد برای مقایسه آورده شده است. نتایج نشان می‌دهد بین ارقام انار در میزان استخراج عصاره تفاوت زیادی وجود ندارد و برخلاف انتظار از رقم پوست ضخیم اردستان عصاره کمتری استحصال شده است، حال آنکه

### ترکیبات فیتواستروژنی و تانیک‌اسیدها

از بین هفت نوع فیتواستروژن و دو نوع تانیک‌اسید که امکان وجود آنها در پوست انار در با دستگاه HPLC بررسی شد، ترکیبات شناسایی شد و مقدار آن‌ها (برحسب میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم پوست تازه) برای مقایسه آورده شده است (جدول ۴). برطبق نتایج با اینکه بیشترین راندمان استخراج متعلق به رقم پوست‌سیاه اردستان نبود ولی بالاترین میزان فیتواستروژن‌های شناسایی شده مانند استریول (۷/۴۵)، تستسترون، و یا آلفاسترادیول (۹/۰۹) و تانیک‌اسیدها یعنی الاجیک‌اسید (۱۰۳) و سیرینزیک‌اسید (۲/۴۶) در عصاره‌های استخراج شده از پوست این رقم انار به دست آمد. با نگاهی دقیق‌تر می‌توان دریافت که ترکیبی از سه حلال به همراه آب به‌عنوان قطبی‌ترین حلال سبب بیشترین استخراج الاجیک و سیرینزیک‌اسید از پوست انار رقم‌های پوست‌سیاه و پوست‌گلی شده است ولی در پوست سفید استون حلال بهتری است. با توجه به نتایج به نظر می‌رسد ترکیب و قطبیت حلال عامل مهمی در استخراج مشتقات الاجی‌تان‌ها از پوست انار باشد (جدول ۴). این داده‌ها با نتایج حاصل از تحقیقات دیگر انجام شده در این زمینه نیز هم‌خوانی دارد. به‌عنوان مثال Kulkarni *et al.*, 2004 بیشترین میزان پونیکالاجین (پلی‌فنولیک سنگین مولکول) از پوست انار را در بین حلال‌ها از طریق متانول یعنی حلال قطبی‌تر (نسبت به هگزان و کلروفرم) استخراج کرد. Li *et al.*, (2006) برای استخراج ترکیبات پلی‌فنولیکی از پوست انار و بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها از متانول، اتانول، استون، و ترکیبی از سه حلال استفاده کردند. نتایج آزمایش‌های آن‌ها نشان داد عصاره به‌دست‌آمده از ترکیب سه حلال بیشترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را داشت این در صورتی بود که در میان حلال‌های دیگر نیز ترتیب فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها ارتباط مستقیمی با قطبیت حلال آن‌ها داشت. بررسی منابع نشان می‌دهد درخصوص استخراج و شناسایی فیتواستروژن‌ها از پوست انار تحقیقات کمی انجام شده است و فقط در پژوهشی (Elswijk *et al.*, 2004) سه فیتواستروژن لوتئولین، کمپفرول، و کورستین (Quercetin) در عصاره هیدرولیز شده توسط اسید (از پوست انار) و از طریق کروماتوگرافی جفت‌شده با طیف‌سنج جرمی شناسایی و اندازه‌گیری شدند. در تحقیق حاضر روش تعیین کمی فیتواستروژن‌ها دقیق‌تر بود، ضمن اینکه لوتئولین و کمپفرول شناسایی نشدند. البته همانطور که در مقدمه ذکر شد این ترکیبات از روغن هسته و دیگر بخش‌های انار در چندین تحقیق استخراج و شناسایی شده‌اند. در مورد فلاونوئیدهای فیتواستروژنی نمی‌توان نتیجه منطقی گرفت. در

نتایج پژوهش‌ها روشن می‌کند که در سطح اطمینان بالاتر از ۹۵ درصد بین مخلوط چهار حلال با سه حلال دیگر تفاوت معنی‌داری وجود دارد در صورتی‌که دو حلال اتانول و استون راندمان استخراج تقریباً برابری با هم داشتند و اتیل‌استات با اختلاف زیادی کمترین راندمان استخراج را در بین حلال‌ها داشته است (جدول ۳). مقایسه نتایج نشان می‌دهد ترکیب و قطبیت حلال‌ها اهمیت زیادی در راندمان استخراج دارد. برای مثال وجود آب به‌عنوان قطبی‌ترین حلال در مخلوط چهار حلال به نوعی سبب بالاترین راندمان استخراج شده است و بعد از آن به ترتیب اتانول، استون، و در نهایت اتیل‌استات با کمترین قطبیت قرار گرفته‌اند. مقایسه راندمان استخراج توسط حلال‌های گوناگون از پوست انار در تحقیق دیگری (Kulkarni *et al.*, 2004) نیز بررسی و نتایج آن نشان داده است که در بین متانول، اتیل‌استات، کلروفرم، و هگزان، حلال قطبی‌تر (متانول) استخراج فوق‌العاده بیشتری (۲۴۸ گرم عصاره در ۵۰۰ گرم پوست خشک انار معادل ۴۹/۶ درصد) از پوست انار داشته است. همچنین نباید فراموش کرد که در تحقیق حاضر استخراج‌ها روی پوست تازه انار صورت گرفته است، حال آنکه بدیهی است درصد بالایی از محتوای پوست تازه را آب تشکیل می‌دهد بنابراین رسوخ بیشتر حلال‌های قطبی به داخل سلول‌های سالم و تخریب شده پوست تازه و مملو از رطوبت انار می‌تواند به دلیل تناسب چنین حلال‌هایی با حلال ترکیبات سلول‌ها و بافت‌های گیاهی (آب) یکی از دلایل قانع‌کننده برای این نتایج باشد. از طرف دیگر به‌کارگیری آب خالص در استخراج مواد آنتی‌اکسیدانی به دلیل بالابودن نقطه جوش آن باعث کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات می‌شود. در ضمن در این تحقیق هدف استخراج توأم ترکیبات فیتواستروژنی و تانیک‌اسیدها بود و با توجه به اینکه ترکیبات فیتواستروژنی در حلال‌های آلی بهتر حل می‌شوند و اسیدهای تانیک در حلال‌های آبی، مخلوط حلال‌ها به جای آب خالص به‌کار رفت (Dunford *et al.*, 2009).

جدول ۳. میانگین راندمان استخراج عصاره توسط چهار حلال آلی از پوست انار

حلال آلی	تعداد داده	میانگین راندمان استخراج (درصد)
مخلوط مساوی از چهار حلال	۹	۲۰/۳ ± ۱/۰ <sup>a</sup>
اتانول	۹	۱۴/۰ ± ۰/۴ <sup>b</sup>
استون	۹	۱۳/۴ ± ۰/۴ <sup>b</sup>
اتیل استات	۹	۰/۸ ± ۰/۰ <sup>c</sup>

می‌شد. هرچند هدف کلی از این تحقیق در گام نخست اثبات وجود فیتواستروژن‌ها در پوست انار بوده است که در این پژوهش به این مهم دست یافته‌ایم.

صورتی که هزینه تحقیق اجازه می‌داد آنالیز عصاره‌ها با دستگاه کروماتوگرافی در سه تکرار انجام شود، امکان آنالیز آماری دقیق‌تری برای دستیابی به مقایسه و نتیجه‌گیری بهتر مهیا

جدول ۴. ترکیبات شناسایی شده و مقدار آن‌ها (برحسب میلی‌گرم در هر ۱۰۰ گرم پوست تازه) در عصاره‌های پوست تازه سه رقم انار ایرانی استخراج شده توسط

چهار حلال آلی

رقم حلال*	شیرین پوست سیاه اردستان				ملس پوست گلی ساوه				ترش پوست سفید راور			
	الف	ب	ج	د	الف	ب	ج	د	الف	ب	ج	د
سیرینژیک‌اسید	-	۱/۲۰	۰/۴۲	۲/۴۶	-	۲/۴۶	۰/۲۸	۰/۶۲	۲/۱۶	-	۰/۱۰	-
الاجیک‌اسید	۵۱/۷	۲۱/۴	۴/۲	۱۰/۳	۶۸/۳	۴۹/۶	۲/۳	۶۲/۲	۴۶/۳	۵۹/۳	۴/۵	۲۸/۶
استریول	۴/۹۵	۷/۴۵	-	۶/۱۶	۱/۲۸	۰/۴۴	۱/۱۸	۱/۳۵	۳/۶۲	۱/۹۵	۴/۵۲	۱/۴۲
تستسترون و آلفا استرادیول	۵/۷۴	۰/۵۹	-	۹/۰۹	۳/۶۱	۲/۵۱	۱/۲۰	۲/۲۸	۸/۴۳	۴/۶۹	۰/۳۴	۴/۸۲

\* حلال الف معادل استون، ب= اتانول، ج= اتیل استات، و د= مخلوط مساوی از چهار حلال آب، اتانول، استون، و اتیل استات است.  
\*\* نتایج میانگین دو تزریق هستند (انحراف معیار متوسط= ۰/۶۳ میلی‌گرم در هر ۱۰۰ گرم پوست تازه).

### نتیجه‌گیری کلی

بیشترین راندمان استخراج (۰/۹۵۷ ± ۰/۳۳۳ درصد) را دارد و نیز از نظر نوع ترکیبات، بیشترین الاجیک‌اسید (۱۰۳ میلی‌گرم در صد گرم پوست تازه انار) و سیرینژیک‌اسید (۲/۴۶ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم پوست تازه انار) را از پوست انار استخراج کرده است. این نتایج اهمیت ترکیب و قطبیت حلال آلی را در استخراج ترکیبات پلی‌فنولیکی از پوست انار نشان می‌دهد. در بین ارقام انار برخلاف انتظار رقم پوست سیاه و ضخیم اردستان بیشترین راندمان استخراج را نداشت ولی چنان‌که انتظار می‌رفت بیشترین میزان تانیک‌اسیدها از پوست این رقم انار استخراج شد.

در مطالعه حاضر توسط دستگاه سوکسله و چهار نوع حلال از پوست سه رقم انار معروف ایرانی عصاره‌گیری شد و نمونه‌ها از نظر راندمان استخراج و همچنین کمیت و کیفیت هفت نوع فیتواستروژن و دو نوع تانیک‌اسید با دستگاه HPLC بررسی شدند. در گزینش حلال‌ها سعی بر آن شد تا چهار حلال متناسب با نوع ترکیبات استخراج شده (پلی‌فنول‌ها) و متفاوت از نظر قطبیت انتخاب شوند. نتایج به دست آمده از دستگاه HPLC وجود استریول و یکی یا هر دو فیتواستروژن آلفا استرادیول و تستسترون را در پوست انار اثبات کرد. همچنین این تحقیق با شناسایی الاجیک و سیرینژیک‌اسید در پوست انار به نوعی مکمل تحقیقات گذشته در این زمینه بود.

### سپاسگزاری

از مدیریت محترم مرکز تحقیقات انار جهاد کشاورزی ساوه برای تأمین انار لازم این تحقیق تقدیر و تشکر می‌گردد.

نتایج نشان داد مخلوط مساوی از چهار حلال که شامل اتانول، استون، اتیل استات، و حلال بسیار قطبی آب بود،

### REFERENCES

- Abd El Wahab, S. M., El Fiki, N. M. & Mostafa, F. (1998). Characterization of certain steroid hormones in *Punicagranatum* L. seeds. *Bull. Fac. Pharm.* 36, 11-15.
- Cam, M. & Hisil, Y. (2010). Pressurised water extraction of polyphenols from pomegranate peels. *Food chemistry*, 123, 878- 885.
- Choi, D. W., Kim, J. Y., Choi, S. H. & Jung, H. S. (2006). Identification of steroid hormones in pomegranate (*Punicagranatum*) using HPLC and GC-mass spectrometry. *Food Chemistry*, 96, 562-571.
- Dean, P. D. G., Exlby, D. & Goodwin, T. M. (1971). Steroid oestrogens in plants: pre-estimation of oestrone in pomegranate seeds. *Phytochemistry*, 10, 2215-2216.
- Dunford NT, Irmak S, Jonnala R. (2009) Effect of the solvent type and temperature on phytosterol contents and compositions of wheat straw, bran, and germ extracts, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 57(22):10608-11.
- Elswijk, D. A. V., Schobel, U. P., Lansky, E. P & Greef, J. V. D. (2004). Rapid determination of estrogenic compounds in pomegranate using on-line biochemical detection coupled to mass spectrometry. *Phytochemistry*, 65, 233-241.
- Fadavi, A., Barzegar, M. & Azizi, M. H. (2006). Determination of fatty acids and total lipid content in oilseed of 25 omegranate varieties grown in Iran. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 676-680.
- Fisher, U. A., Carle, R. & Kammerer, D. A. (2011).

- Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punicagranatum L.*) peel, mesocarp, aril and differently produced juiced by HPLC-DAD-ESI/MS. *Food Chemistry*, 127, 807-821.
- Fischer, U.A.; Carle, R.; Kammerer, D. R. (2011) Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punicagranatum L.*) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MSn., *Food chemistry*, 127, 807-821
- Guo, C., Yang, J., Wie, J. & Jiang, Y. (2003). Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. *Nutrition Research*, 23, 1719-1726.
- Hodgson, R.W. (1971). *The pomegranate*. California Agricultural Export Statistics Bulletin. 276, 163-192.
- Kim, N. D., Mehta, R., Liveny, I., Liveny, T., Amichay, A., Poirie, D., Nicholla, P. & Kirby, A. (2002). Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential pomegranate (*Punicagranatum L.*) for human breast cancer. *Breast Cancer Research And Treatment*, 71, 203-217.
- Kulkarni, A. P.; Aradhya, S. M.; Divakar, S. (2004). Isolation and identification of a radical scavenging antioxidant punicalagin from pith and capillary membrane of pomegranate fruit. *Food Chemistry*, 87, 551-557.
- Lau, A. J., Holmes, M. J. & Woo, S. O. (2003). Analysis of adulterants in a traditional herbal medicinal product using liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 31, 401-406.
- Li, Y., Guo, C., Yang, J., Wei, J., Xu, J. & Cheng, S. (2006). Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chemistry*, 96, 254-260.
- Moneam, N. M., Elsharaky, A. S. & Badreldin, M. M. (1988). Oestrogen content of pomegranate seeds. *Journal of Chromatography*, 438, 438-442.
- Mousavinejad, G; Emam-Djomeh, Z.; Rezaei, Z.; Haddad Khodaparast, M.H. (2009) Identification and quantification of phenolic compounds and their effects on antioxidant activity in pomegranate juices of eight Iranian cultivars, *Food chemistry*, 115, 1274-1278.
- Negi, P. S., Jayaprakasha, G. K. & Jena, B. S. (2003). Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. *Food Chemistry*, 80, 393-397.
- Seeram, N. P., Adams, L. S., Henning, S. M., Niu, Y., Nair, M. G. & Heber, D. (2005-a). In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *J. Nutr. Biochem*, 16, 360-367.
- Seeram. N. P., Lee, R., Hardy, M. & Heber, D. (2005-b). Rapid large scale purification of ellagitannin from pomegranate husk by-product of the commercial juice industry. *Separation and Purification Technology*, 41, 49-55.
- Singh, R. P., Murthy, K. N. C. & Jayakrapasha, G. H. (2002). Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punicagranatum*) peel and seed extraction using in vitro model. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 81-86.
- Wu, Q., Wang, M. & Simon, J. E. (2004). Analytical methods to determine phytoestrogenic compounds. *Journal of Chromatography B*, 812, 325-355.
- Zarezaeh, M, R. (2008). Extraction and identification of nutritional and pharmaceutical compounds from pomegranate peel of three dominant Iranian varieties. MSc. dissertation, Isfahan University of Technology, Isfahan