خواص آنتی‌اکسیدانی آب انار و توانایی آن در خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد

دکتر اصغر زربان[1]- دکتر محمد ملکانه[2]- دکتر میثم رضا بقراطی[3]

چکیده

زمینه و هدف: شواهد اپیدمیولوژیکی نشان داده‌اند که مصرف مناسب غذاها و یا نوشیدنیهای غنی از ترکیبات فنولیک و آنتی‌اکسیدان‌ها، میزان ابتلا به بسیاری از بیماریها از جمله بیماریهای قلبی- عروقی را کاهش می‌دهد. در سالهای اخیر، مطالعات متعددی بر روی منابع طبیعی به منظور یافتن منابع غنی از آنتی‌اکسیدان‌ها و نقش مصرف این ترکیبات در محافظت بدن در برابر صدمات ناشی از استرس اکسیداتیو انجام شده است. مطالعه حاضر با هدف ارزیابی و نشان دادن میزان ترکیبات فنولیک آب انار، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آن و همچنین توانایی خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد توسط آب انار و مقایسه آن با سایر آب میوه‌ها انجام شد.

روش تحقیق: در این مطالعه تجربی، شاخصهای آنتی‌اکسیدانی کنسانتره انار و همچنین ۹ آب میوه تجاری، مورد ارزیابی قرار گرفتند. ترکیبات فنولیک نمونه‌های مورد نظر با روش فولین سیوکالتو (Folin-Ciocalteu)، ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی آنها با روش FRAP (Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay) و توانایی آنها در خنثی‌سازی رادیکال DPPH (1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl) اندازه‌گیری گردید. همچنین توانایی آب انار در مهار پراکسیداسیون لیپیدهای پلاسما، القا شده توسط یون‌های مس و تأثیر آب انار در مهار همولیز گلبول قرمز، القا شده توسط پروکسید هیدروژن نیز مورد بررسی قرار گرفت. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون آماری One Sample و ضریب همبستگی پیرسون مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها: بیشترین میزان ترکیبات فنلیک مربوط به آب انار (۵/۰±۲۰۵/۰ میلیگرم معادل اسید گالیک موجود در ۱۰۰ میلی‌لیتر برای کنسانتره رقیق شده انار) بود؛ همچنین بیشترین ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی نیز در آب انار مشاهده شد (۰/۳۰±۱۱/۱۷ میلی‌مول در لیتر). در روش DPPH که توانایی مهار یا خنثی‌سازی این رادیکال توسط نمونه مورد نظر ارزیابی شد نیز آب انار بیشترین توانایی را نشان داد (۹۶٪). مطالعات همبستگی نشان داد که ارتباط مثبت و معنی‌داری بین محتوای ترکیبات فنلیک نمونه‌های مورد مطالعه و سطح ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی آنها و نیز توانایی مهار یا خنثی‌سازی رادیکال DPPH توسط آنها وجود دارد. بررسی نتایج تأثیر رقتهای مختلف آب انار بر مهار تشکیل دی‌ان‌کونژوگه در لیپیدهای پلاسما و بر مهار همولیز گلبول‌های قرمز نیز نشان داد که در یک روند وابسته به دوز، با افزایش غلظت آب انار در محیط، میزان مهار همولیز افزایش می‌یابد

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج این مطالعه می‌توان اذعان داشت که آب انار نسبت به سایر آب میوه‌های مورد مطالعه از ترکیبات فنلیک بیشتری برخوردار می‌باشد و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی آن بالا است؛ همچنین توانایی زیادی در مهار رادیکال‌های مختلف را دارد و می‌تواند اثرات سودمندی در تقویت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی بدن و کاهش استرس اکسیداتیو داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: آب انار؛ ترکیبات فنلیک؛ فعالیت آنتی‌اکسیدانی؛آنتی‌اکسیدان

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند (دوره ۱۴؛ شماره ۳؛ پاییز سال ۱۳۸۶)

دریافت: ۱۳۸۶/۳/۱۰ اصلاح نهایی: ۱۳۸۶/۴/۴ پذیرش: ۱۳۸۶/۴/۵

[1] نویسنده مسؤول؛ استادیار گروه آموزشی بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند

آدرس: بیرجند- دانشگاه علوم پزشکی بیرجند- دانشکده پزشکی تلفن: ۰۵۶۱-۴۴۳۰۰۱۴ نمابر: ۰۵۶۱-۴۴۳۰۰۱۴ پست الکترونیکی: azarban@yahoo.com

[2] استادیار گروه آموزشی بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند

[3] پزشک عمومی

مقدمه

امروزه موضوع رادیکال‌های آزاد* و گونه‌های فعال اکسیژن† و اثرات آن بر سیستم‌های بیولوژیک یکی از مباحث مهم و مطرح دانش پزشکی می‌باشد. در جریان متابولیسم هوازی، اغلب مقداری رادیکال آزاد مانند رادیکال‌های سوپراکسید، هیدروکسیل، پراکسیل و اکسیدهای نیتروژن و گونه‌های فعال اکسیژن مانند اکسیژن منفرد، پراکسید هیدروژن و اسید هیپوکلروس تولید می‌شوند که این مولکول‌ها بالقوه خطرناک و مضر می‌باشند (۱). اگرچه طبیعت با طراحی فرایندهای دفاعی آنتی‌اکسیدانی، این عوامل مهاجم را خنثی نموده و یا اثرات زیانبار آنها را کاهش می‌دهد. در شرایط طبیعی اغلب بین تولید رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن از یک سو و قدرت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی از طرف دیگر حالت تعادل وجود دارد؛ اگر چه در صورت افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و یا کاهش قدرت دفاع آنتی‌اکسیدانی، زمینه برای ایجاد صدمات ناشی از فعالیت رادیکال های آزاد افزایش می‌یابد که به این حالت استرس اکسیداتیو اطلاق می‌شود (۲).

شرایطی نظیرآسیبهای بافتی و هیپوکسی، تماس زیاد با عوامل محیطی مثل دود سیگار، اشعه ماورای بنفش و آلاینده‌ها و همچنین کمبود آنتی‌اکسیدان‌ها و عوامل خنثی‌کننده رادیکال‌های آزاد سبب ایجاد استرس اکسیداتیو می‌گردند (۴،۳).

شواهد نشان می‌دهد که آسیب سلولی ایجادشده به وسیله استرس اکسیداتیو در پاتوژنز بیش از ۱۰۰ بیماری نظیر دیابت، فشار خون، آترواسکلروزیس و حوادث قلبی- عروقی، آرتریت روماتوئید، سرطان‌ها، زخم معده، مولتیپل اسکلروزیس (MS)، آلزایمر، پارکینسون و آسم دخالت دارد (۵-۱۱).

انار درختچه‌ای متعلق به خانواده Punicaceae می‌باشدکه دارای سابقه کشت چند هزارساله بوده و خاستگاه اصلی آن نیز از ایران بوده است. آب انار تازه شامل ۸۵٪ آب و ۱۰٪ قند و ۱/۵٪ پکتین، اسید اسکوربیک و ترکیبات فنولیک می‌باشد. پلی‌فنل‌ها گروه مهمی از این ترکیبات شیمیایی گیاهی را تشکیل می‌دهند و تانین‌ها‡ بخصوص Punicalagin و Anthocyanins و Ellagic Acid از گروه پلی‌فنل‌ها می‌باشند (۱۳،۱۲). بسیاری از گیاهان دیگر نیز حاوی پلی‌فنل‌ها می‌باشند. پلی‌فنل‌ها آنتی‌اکسیدان‌های بسیار قوی هستند و می‌توانند رادیکال‌های آزاد را خنثی نموده و اثرات سیتوتوکسیک این عوامل مهاجم را خنثی نمایند و نقش مهمی در سلامتی انسان دارند. شواهد اپیدمیولوژیکی بیانگر ارتباط منفی بین مصرف غذاها و یا نوشیدنیهای غنی از ترکیبات فنولیک (میوه‌ها، سبزیجات، کاکائوی موجود در شکلات، آب انگور، چای و ...) و شیوع بیماری قلبی و عروقی می‌باشد. از این رو در سالهای اخیر، علاقه زیادی به مطالعه بر روی منابع طبیعی به منظور یافتن منابع غنی از آنتی اکسیدان‌ها و نقش مصرف این ترکیبات در محافظت بدن در برابر صدمات ناشی از استرس اکسیداتیو به وجود آمده است (۱۴-۱۷).

هدف از انجام این مطالعه ارزیابی و نشان دادن میزان ترکیبات فنولیک آب انار، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آن و همچنین توانایی خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد توسط آب انار و مقایسه آن با سایر آب میوه‌ها می‌باشد.

روش تحقیق

در این مطالعه تجربی، به منظور اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنولیک، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و همچنین توانایی آن در خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد، از نمونه کنسانتره انار، بدون هیچ‌گونه افزودنی، از شرکت انارین (مشهد- ایران) استفاده گردید. با توجه به تغلیظ این نمونه به هنگام تولید، ابتدا به صورت ۱ به ۵ رقیق شد و سپس رقت‌های مورد نظر مورد آزمایش قرار گرفتند.

برای مقایسه شاخص‌های فوق درآب انار با سایر آب

* Free Radicals
† Reactive Oxygen Species
‡ Tannins

میوه‌ها، نمونه‌های تجاری شرکت سان ایچ (آب انار، آب انگور قرمز، آب آلبالو، آب پرتقال، آب آناناس ،آب سیب و آب انبه)، از فروشگاههای معتبر تهیه و به طور مستقیم مورد استفاده قرار گرفتند. مواد شیمیایی مورد نیاز شامل TPTZ*، DPPH†، ویتامین C، ویتامین E، پراکسید هیدروژن‡ که از شرکت فلوکا تهیه گردیدند. سایر مواد شیمیایی استفاده شده، از نوع آنالیتیکال بودند.

برای اندازه‌گیری ترکیبات فنلیک از روش فولین سیوکالتو§ استفاده شد. از اسید گالیک با غلظتهای ۱۰ تا ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر برای رسم منحنی استاندارد و محاسبه نتایج استفاده شد و نتایج به صورت معادل اسید گالیک در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب میوه** بیان شد (۱۸).

برای ارزیابی ظرفیت تام آنتی اکسیدانی نمونه های انار از روش FRAP†† که توسط Benzie و Strain ارائه گردیده است، استفاده شد (۱۹). در این روش قدرت احیاکنندگی آنتی‌اکسیدان‌ها در نمونه مورد نظر سنجیده می‌شود.

به طور خلاصه ،یون‌های Fe^{3+} به عنوان ماده اولیه در حضور آنتی اکسیدان‌ها به Fe^{2+} احیا می‌شود. Fe^{2+} می‌تواند با TPTZ کمپلکس بنفش رنگ ایجاد نماید که شدت رنگ، نشان‌دهنده خاصیت احیاکنندگی نمونه بر حسب میلی مول در لیتر بوده و در طول موج ۵۹۳ نانومتر قابل اندازه‌گیری است.

توانایی خنثی‌سازی رادیکال DPPH بر اساس روش Brand-Eilliams و همکاران ارزیابی شد (۲۰). DPPH یک رادیکال آزاد پایدار است که در حضور آنتی اکسیدان‌ها در نمونه‌های بیولوژیک به صورت زیر خنثی می‌شود:

$$(DPPH) + RH \longrightarrow (DPPH)\text{-}H + R.$$

رادیکال آزاد DPPH، در محیط الکل اتانول باعث حداکثر جذب در ۵۱۷ نانومتر و ایجاد یک رنگ ارغوانی می‌گردد. در صورت خنثی‌شدن این رادیکال، از شدت رنگ ارغوانی کاسته شده و به زرد کم رنگ تغییر می‌یابد؛ بنابراین کاهش جذب نوری متناسب با توانایی خنثی‌سازی رادیکال DPPH و به عبارت دیگر قدرت آنتی‌اکسیدانی نمونه مورد نظر خواهد بود. نتایج به صورت درصد مهار یا خنثی‌سازی رادیکال DPPH توسط نمونه مورد نظر بیان می‌شود.

H_2O_2 به عنوان یک عامل مهاجم و اکسیدکننده، باعث آسیب غشای گلبول قرمز و در نتیجه همولیز آن می‌گردد که شدت همولیز با اندازه‌گیری میزان هموگلوبین در طول موج ۵۴۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر قابل اندازه‌گیری است؛ در این روش که توسط Stocks و همکارش ارائه گردید (۲۱)، از سوسپانسیون ۲/۵٪ از گلبول‌های قرمز در بافر فسفات استفاده شد و برای ایجاد همولیز از محلول H_2O_2 با غلظت نهایی ۲۰ میلی مولار استفاده گردید. به طور خلاصه پس از اضافه نمودن H_2O_2 به لوله‌های آزمایش، به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردیدند و به طور مرتب هر ۱۵ دقیقه مخلوط شدند. پس از ۲ ساعت، تمام لوله‌ها با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند و قدرت جذب نوری تمام لوله‌ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر ثبت گردید. به دلیل تغییر شرایط آزمایش از نظر ویژگی گلبول‌های قرمز، یک لوله به عنوان شاهد ۱۰۰٪ همولیز (حاوی H_2O_2 و بدون آب انار) و یک لوله دیگر به عنوان شاهد صفر (بدون H_2O_2) در نظر گرفته شد و درصد همولیز در بقیه لوله‌ها و در حضور رقت‌های مختلف آب انار نسبت به آنها محاسبه گردید.

به منظور ارزیابی میزان مهار تشکیل دی ان کونژوگه به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدهای پلاسما از روشی که توسط Kontush و همکارش ارائه گردید، استفاده شد (۲۲). در این روش پلاسمای هپارینه به صورت تازه تهیه و در بافر فسفات به میزان ۱/۱۵۰ رقیق گردید. برای ایجاد پراکسیداسیون لیپیدها و تشکیل دی ان کونژوگه از محلول

* Tripyridyl-S-Triazine (TPTZ)
† 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl (DPPH)
‡ Hydrogen Peroxide (H_2O_2)
§ Folin-Ciocalteu
** mg galic acid/100mL
†† Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay

سولفات مس با غلظت نهایی ۵۰ میکرو مولار و اندازه‌گیری میزان جذب نوری در طول موج ۲۳۴ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Visible مجهز به سیستم کنترل‌کننده دما و اندازه‌گیری خودکار جذب نوری در فواصل هر ۱۰ دقیقه و به مدت ۶ ساعت استفاده شد. با توجه به نمودار میزان جذب نوری به دست آمده، میزان تأخیر در شروع تشکیل دی‌ان کونژوگه، در حضور غلظت های مختلف نمونه آب انار محاسبه گردید.

برای مقایسه نتایج از آزمون One Sample استفاده شد؛ همچنین به منظور تعیین ارتباط دو متغیر، ضریب همبستگی پیرسون (Pearson Correlation Coefficient) به کار رفته است. جهت تجزیه داده‌ها از نرم‌افزار آماری SPSS استفاده و سطح معنی‌داری $P\leq ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

مقادیر ترکیبات فنلیک در نمونه‌های مورد نظر در نمودار ۱ نشان داده شده است.

بیشترین میزان ترکیبات فنلیک مربوط به آب انار (۵/۰±۲۰۵/۰ میلیگرم معادل اسید گالیک در ۱۰۰ میلی‌لیتر برای کنسانتره رقیق شده انار و ۵/۷±۱۷۶/۷ برای آب انار تجاری) می‌باشد که به دنبال آن آب انگور قرمز و آب آلبالو (به ترتیب ۲/۶±۱۳۶/۰ و ۲/۵± ۱۱۵/۸میلیگرم معادل اسید گالیک در ۱۰۰ میلی لیتر) از محتوای فنلیک بیشتری برخوردارند و کمترین آن مربوط به آب آناناس ۰/۶±۲۶/۳ میلیگرم معادل اسید گالیک در ۱۰۰ میلی لیتر) می‌باشد.

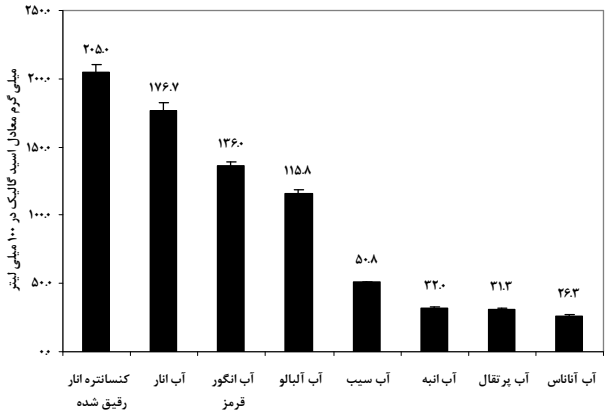
نتایج مربوط به ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی آب میوه‌های مورد مطالعه در نمودار ۲ نشان داده شده است. بیشترین ظرفیت تام آنتی اکسیدانی در آب انار و کمترین آن مربوط به آب آناناس بود (به ترتیب ۰/۳۰±۱۱/۱۷ و ۰/۰۲±۱/۱۱ میلی‌مول در لیتر)

در روش DPPH که توانایی مهار یا خنثی‌سازی این رادیکال توسط نمونه مورد نظر ارزیابی شد نیز آب انار بیشترین توانایی را نشان داد (۹۶٪) و پس از آن به ترتیب آب انگور قرمز و آب آلبالو قرار گرفتند و کمترین توانایی مربوط به آب آناناس بود (نمودار ۳).

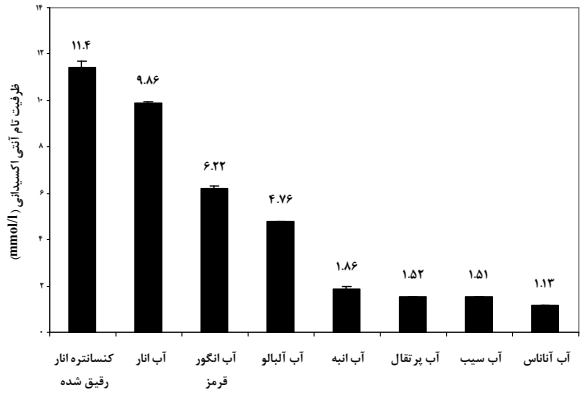
مطالعات همبستگی نشان داد که ارتباط مثبت و معنی‌داری بین محتوای ترکیبات فنلیک نمونه‌های مورد مطالعه و سطح ظرفیت تام آنتی اکسیدانی (r=۰/۹۸۷، P<۰/۰۰۱) و توانایی مهار یا خنثی سازی رادیکال DPPH (r=۰/۹۸۲، P<۰/۰۰۱) وجود دارد.

نتایج مطالعه بررسی تأثیر رقت‌های مختلف آب انار بر مهار تشکیل دی ان کونژوگه در لیپیدهای پلاسما، القا شده توسط یون‌های مس، در نمودار ۴ نشان داده شده است.

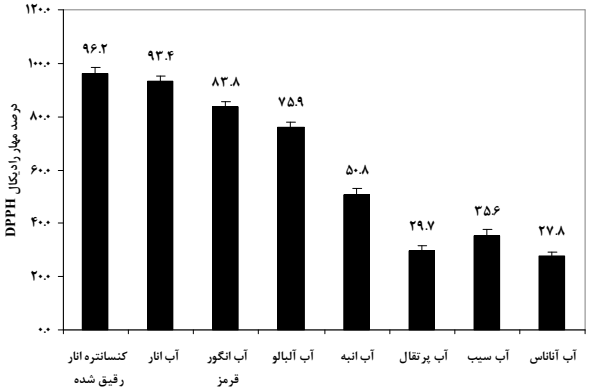
این نتایج بیانگر تأخیر در شروع فرایند تشکیل دی ان کونژوگه در پلاسما با افزایش غلظت آب انار در محیط می باشد؛ همچنین نتایج مطالعه بررسی تأثیر غلظتهای مختلف آب انار بر مهار همولیز گلبول‌های قرمز القا شده توسط H_2O_2 نیز نشان می‌دهد در یک روند وابسته به دوز، با افزایش غلظت آب انار در محیط، میزان درصد همولیز کاهش یافته و به عبارت دیگر درصد مهار همولیز افزایش می‌یابد (نمودار ۵).



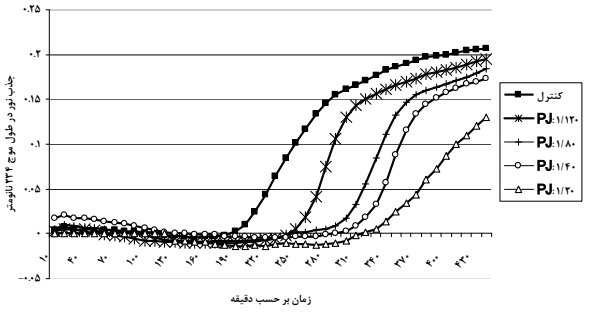
نمودار ۱- مقایسه ترکیبات فنلیک موجود در کنسانتره رقیق شده انار و تعدادی از آب میوه‌های تجاری اندازه‌گیری شده باروش فولین سیو کالتو (نتایج به صورت میانگین و انحراف از معیار حاصل از سه بار تکرار آزمایش نشان داده شده‌اند.)



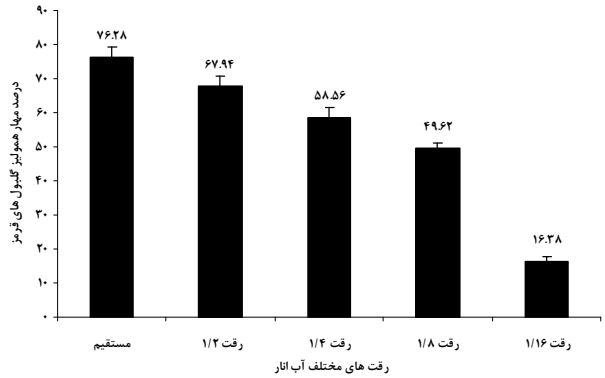
نمودار ۲- مقایسه ظرفیت تام آنتی اکسیدانی کنسانتره رقیق شده انار و تعدادی از آب میوه‌های تجاری، اندازه‌گیری شده باروش FRAP. (نتایج به صورت میانگین و انحراف از معیار حاصل از سه بار تکرار آزمایش نشان داده شده‌اند.)



نمودار ۳- مقایسه توانایی مهار یا خنثی‌سازی رادیکال DPPH توسط کنسانتره رقیق شده انار و تعدادی از آب میوه‌های تجاری (نتایج به صورت میانگین و انحراف از معیار حاصل از سه بار تکرار آزمایش نشان داده شده‌اند.)



نمودار ٤- مقایسه تأثیر رقت‌های مختلف آب انار (PJ) در مهار تشکیل دی ان کونژوگه در پلاسمای رقیق‌شده به میزان ۱/۱۵۰، القاشده توسط یون‌های مس با غلظت نهایی ۵۰ میکرو مولار و اندازه‌گیری میزان جذب نوری در طول موج ۲۳٤ نانومتر



نمودار ۵- مقایسه تأثیر رقت‌های مختلف آب انار در مهار همولیز گلبول‌های قرمز، القا شده توسط H_2O_2 با غلظت نهایی ۲۰ میلی مولار (نتایج به صورت میانگین و انحراف از معیار حاصل از سه بار تکرار آزمایش نشان داده شده‌اند.)

بحث

در این مطالعه، خواص آنتی‌اکسیدانی آب انار با استفاده از چند روش مورد ارزیابی قرار گرفت و در برخی موارد با آب میوه‌های دیگر مقایسه شد. آب انار سرشار از ترکیبات فنلیک می‌باشد که این مقدار در بین سایر آب میوه‌ها بیشتر است. ترکیبات فنلیک، گروه مهمی از ترکیبات گیاهی به عنوان متابولیت‌های ثانویه را تشکیل می‌دهند که در پاسخ به استرس‌های محیطی ایجاد می‌شوند. این ترکیبات به دلیل داشتن گروههای هیدروکسیل، توانایی خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد را داشته و می‌توانند به عنوان دهنده الکترون یا هیدروژن عمل نمایند (۲۳).

یافته‌های مطالعات مختلف نشان داده‌اند که مصرف منابع غذایی حاوی ترکیبات فنلیک می‌تواند در سلامتی انسان نقش داشته باشد. نتایج مطالعه Garcia-Alonso و همکاران، بیانگر این است که مصرف کوتاه مدت آب میوه‌های غنی از ترکیبات فنلیک باعث بهبود وضعیت آنتی‌اکسیدانی بدن می‌شود (۲۴). از طرف دیگر در مطالعه Bob و همکاران، نشان داده شد که مصرف آب میوه‌های حاوی ترکیبات فنلیک، صدمات اکسیداتیو به DNA را کاهش داده و عملکرد سیستم ایمنی را بهبود می‌بخشد (۲۵)؛

همچنین در یک مطالعه آینده‌نگر گزارش شد که مصرف میوه‌جات و سبزیجات حاوی ترکیبات فنلیک و آنتی‌اکسیدان‌ها می‌تواند شروع آلزایمر را به تأخیر اندازد (۲۶).

سیستم دفاع آنتی‌اکسیدان بدن از مخلوطی از آنتی‌اکسیدان‌ها تشکیل می‌شود که برخی از آنها از طریق رژیم غذایی تأمین می‌شود. امروزه عقیده بر این است که مصرف میوه‌جات و سبزیجات غنی از آنتی‌اکسیدان‌ها نسبت به استفاده از مکمل‌ها به منظور مقابله با صدمات اکسیداتیو در شرایط مختلف ارجح می‌باشند. آنتی‌اکسیدان‌های میوه‌جات شامل اسید اسکوربیک، توکوفرول، کاروتنوئیدها و ترکیبات فنلیک می‌باشد. در مطالعه حاضر نشان داده شده است که آب انار یک منبع بسیار غنی از آنتی اکسیدان‌ها بوده و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدان‌های آن نسبت به سایر آب میوه‌های مورد مطالعه بیشتر است. Wang و همکاران، ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی ۱۲ آب میوه را با استفاده از روش ORAC* اندازه‌گیری نمود (۲۷). در مطالعه دیگری که توسط Leong و همکاران انجام شد نیز ۲۷ آب میوه موجود در بازار سنگاپور با روش ABTS مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۸). در هیچ یک از مطالعات فوق آب انار مورد ارزیابی قرار نگرفته بود ولی در مطالعه‌ای که بر روی ۲۸ میوه در چین با روش FRAP انجام گرفت، نشان داده شد که انار دارای بیشترین خواص آنتی اکسیدانی است (۲۹). در مطالعه حاضر نیز از روش FRAP استفاده شد. بر اساس مطالعات انجام شده، بسیاری از آنتی اکسیدان‌ها نظیر ویتامین C، ویتامین E، کارتنوئیدها و ترکیبات فنلیک می‌توانند در این واکنش شرکت کنند؛ از این روش می‌توان به عنوان یک روش قابل قبول، سریع و ارزان قیمت برای مطالعه ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های بیولوژیک استفاده کرد (۳۰). نتایج مطالعات همبستگی نشان داد که بیشترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به ترکیبات فنلیک نمونه‌های مورد مطالعه می‌باشد.

روش DPPH نیز به طور گسترده‌ای به منظور ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدان نمونه‌های بیولوژیک مورد استفاده قرار گرفته است (۳۱). رادیکال DPPH، نسبت به رادیکال‌های هیدروکسیل و آنیون سوپراکسید پایداری بیشتری دارد و این موضوع از مزایای آن محسوب می‌شود و ترکیبات فنلیک و دیگر آنتی‌اکسیدان‌های شناخته شده قادرند این رادیکال را خنثی نمایند و آب انار نیز به دلیل داشتن مقادیر زیاد ترکیبات فنلیک و سطح بالای ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی، قدرت زیادی در خنثی‌سازی رادیکال DPPH نشان داده است (۳۲).

در این مطالعه همچنین نشان داده شد که آب انار به طور مؤثری پراکسیداسیون لیپیدهای پلاسما و تشکیل دی ان کونژوگه را به تأخیر می‌اندازد؛ به نظر می‌رسد آنتی‌اکسیدان‌های موجود در آب انار از طریق قطع واکنش‌های زنجیره‌ای که منجر به تولید رادیکالهای آزاد می‌شوند و یا اتصال به عنصر مس و جلوگیری از اتصال این عنصر به لیپوپروتئین‌ها باعث تأخیر در شروع فرایند پراکسیداسیون لیپیدهای پلاسما می‌گردد. جلوگیری و یا وقفه در اکسیداسیون لیپوپروتئین‌های پلاسما، می‌تواند نقش مهمّی در پیشگیری و یا به تأخیر انداختن فرایند تشکیل آترواسکلروز و بیماریهای قلب و عروق داشته باشد. تاکنون مطالعه مشابهی بر روی آب انار گزارش نشده است ولی مطالعات انجام شده، نشان می‌دهد که آب انار، موجب کاهش میزان اکسیداسیون LDL در سلول‌های اندوتلیال در محیط کشت سلولی می‌گردد (۳۳)؛ همچنین مصرف آب سیب می‌تواند باعث کاهش اکسیداسیون LDL شود (۳۴).

مطالعه تأثیر آب انار بر همولیز گلبول‌های قرمز نیز نشان داده است که آب انار می‌تواند میزان همولیز را کاهش دهد و این نتیجه نیز خواص آنتی‌اکسیدانی آب انار و توانایی آن در مهار رادیکال‌های آزاد را تأیید می‌کند. غشاهای پلاسمایی نظیر غشای گلبول قرمز نسبت به حمله رادیکال‌های آزاد به اسیدهای چرب غیر اشباع در غشای آن حساس هستند. در مطالعات مختلف از ترکیبات متنوعی به عنوان عامل مهاجم و ایجاد همولیز در گلبول‌های قرمز استفاده می‌شود (۳۵).

* Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC)

پراکسید هیدروژن (H_2O_2) که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت، می‌تواند از غشای گلبول قرمز عبور کند و بسرعت نسبت به هموگلوبین واکنش نشان دهد و رادیکال‌های بسیار فعال (رادیکال فریل، رادیکال هیدروکسیل) تولید نماید که اینها به نوبه خود باعث آسیب غشای سلولی و پارگی گلبول قرمز می‌شوند (۲۱). تاکنون مطالعه‌ای در این خصوص بر روی آب انار انجام نشده است.

نتیجه‌گیری

آب انار نسبت به سایر آب میوه‌های مورد مطالعه از ترکیبات فنلیک بیشتری برخوردار است و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی آن بالا می‌باشد؛ همچنین توانایی مهار رادیکال DPPH را به طور قابل ملاحظه‌ای دارد؛ از طرف دیگر ممانعت از تشکیل دی ان کونژوگه به عنوان شاخصی از پراکسیداسیون لیپیدهای پلاسما و مهار همولیز گلبول‌های قرمز در حضور H_2O_2 دلایل دیگری از خواص سودمند آب انار درخصوص تقویت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی بدن و کاهش استرس اکسیداتیو می‌باشد. مطالعات انجام شده به صورت آزمایشگاهی بوده و پیشنهاد می‌شود تأثیر مصرف آب انار در تقویت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی افراد سالم و همچنین در افراد مبتلا به بیماریهایی که در آنها استرس اکسیداتیو افزایش می‌یابد، مورد مطالعه قرار گیرد. در صورت تأئید اثرات فوق در مطالعات In-vivo، مصرف بیشتر آب انار و دیگر فراورده‌های آن را می‌توان در جامعه توصیه نمود.

با توجه به این که ایران از کشورهای مهم تولیدکننده و صادرکننده انار و فراورده‌های آن می‌باشد، تحقیق و پژوهش بر روی خواص سودمند انار در رونق اقتصادی این محصول، بخصوص در سطح جهانی مؤثر خواهد بود.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از حوزه معاونت محترم آموزشی و پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند در خصوص تأمین هزینه‌های این پژوهش، از مدیریت محترم شرکت انارین به دلیل تأمین کنسانتره انار و همچنین آقای اسماعیل شرفی و آقای علی افتخاری که در اجرای این تحقیق همکاری داشتند، اعلام می‌دارند.

منابع:

1- Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. Nutrition. 2002; 18 (10): 872-79.
2- Scheibmeir HD, Christensen K, Whitaker SH, Jegaethesan J, Clancy R, Pierce JD. A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses. Intensive Crit Care Nurs. 2005; 21 (1): 24-8.
3- Goraca A, Skibska B. Plasma antioxidant status in healthy smoking and non-smoking men. Bratisl Lek Listy. 2005; 106 (10): 301-6.
4- Marra G, Cotroneo P, Pitocco D, Manto A, Di Leo MA, Ruotolo V, et al. Early increase of oxidative stress and reduced antioxidant defenses in patients with uncomplicated type 1 diabetes: a case for gender difference. Diabetes Care. 2002; 25 (2): 370-75.
5- Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. J Biochem Mol Toxicol. 2003; 17 (1): 24-38.
6- Katsuki A, Sumida Y, Urakawa H, Gabazza EC, Maruyama N, Morioka K, et al. Increased oxidative stress is associated with elevated plasma levels of adrenomedullin in hypertensive patients with type 2 diabetes. Diabetes Care. 2003; 26 (5): 1642-43.
7- Ceriello A. Oxidative stress and diabetes-associated complications. Endocr Pract. 2006; 12 Suppl 1:60-2.
8- Serra JA, Marschoff ER, Dominguez RO, Guareschi EM, Famulari AL, Pagano MA, et al. Oxidative stress in Alzheimer's and vascular dementias: masking of the antioxidant profiles by a concomitant Type II diabetes mellitus condition. J Neurol Sci. 2004; 218 (1-2): 17-24.
9- Junqueira VB, Barros SB, Chan SS, Rodrigues L, Giavarotti L, Abud RL, et al. Aging and oxidative stress. Mol Aspects Med. 2004; 25 (1-2): 5-16.
10- Adachi M, Sakamoto H, Kawamura R, Wang W, Imai K, Shinomura Y. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and oxidative stress in cancer cells. Histol Histopathol. 2007; 22 (4): 437-42.
11- Yamamoto N, Sawada H, Izumi Y, Kume T, Katsuki H, Shimohama S, et al. Proteasome inhibition induces

glutathione synthesis and protects cells from oxidative stress: relevance to Parkinson disease. J Biol Chem. 2007; 282 (7): 4364-72.
12- Wang RF, Xie WD, Zhang Z, Xing DM, Ding Y, Wang W, et al. Bioactive compounds from the seeds of Punica granatum (pomegranate). J Nat Prod. 2004; 67 (12): 2096-98.
13- Perez-Vicente A, Gil-Izquierdo A, Garcia-Viguera C. In vitro gastrointestinal digestion study of pomegranate juice phenolic compounds, anthocyanins, and vitamin C. J Agric Food Chem. 2002; 50 (8): 2308-12.
14- Zheng W, Wang SY. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. J Agric Food Chem. 2001; 49 (11): 5165-70.
15- Karakaya S, El SN, Tas AA. Antioxidant activity of some foods containing phenolic compounds. Int J Food Sci Nutr. 2001; 52 (6): 501-508.
16- Stoclet JC, Chataigneau T, Ndiaye M, Oak MH, El BJ, Chataigneau M, et al. Vascular protection by dietary polyphenols. Eur J Pharmacol. 2004; 500 (1-3): 299-313.
17- Osawa T. Protective role of dietary polyphenols in oxidative stress. Mech Ageing Dev. 1999; 111 (2-3): 133-39.
18- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Methods in Enzymology. 1999; 299: 152-77.
19- Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Anal Biochem. 1996; 239 (1): 70-76.
20- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm Wiss U Technol. 1995; 28: 25-30.
21- Stocks J, Dormandy TL. The autoxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide. Br J Haematol. 1971; 20 (1): 95-111.
22- Kontush A, Beisiegel U. Measurement of oxidizability of blood plasma. Methods Enzymol. 1999; 299: 35-49.
23- Fukumoto LR, Mazza G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. J Agric Food Chem. 2000; 48 (8): 3597-604.
24- Garcia-Alonso J, Ros G, Vidal-Guevara ML, Jesu s Periago M. Acute intake of phenolic-rich juice improves antioxidant status in healthy subjects. Nutrition Res. 2006; 26: 330-39.
25- Bub A, Watzl B, Blockhaus M, Briviba K, Liegibel U, Muller H, et al. Fruit juice consumption modulates antioxidative status, immune status and DNA damage. J Nutr Biochem. 2003; 14 (2): 90-98.
26- Dai Q, Borenstein AR, Wu Y, Jackson JC, Larson EB. Fruit and vegetable juices and Alzheimer's disease: the Kame Project. Am J Med. 2006; 119 (9): 751-59.
27- Wang H, Cao G, Prior RL. Total antioxidant capacity of fruits. J Agric Food Chem. 1996; 44: 701-705.
28- Leong LP, Shui G. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. Food Chem. 2002; 76: 69-75.
29- Guo C, yang J, Wei J, Li Y, Xu J, Jiang Y. Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. Nutrition Res. 2003; 23: 1719-26.
30- Nilsson J, Pillai D, Onning G, Persson C, Nilsson A, Akesson B. Comparison of the 2,2'-azinobis-3-ethylbenzotiazo-line-6-sulfonic acid (ABTS) and ferric reducing anti-oxidant power (FRAP) methods to asses the total antioxidant capacity in extracts of fruit and vegetables. Mol Nutr Food Res. 2005; 49 (3): 239-46.
31- Katsube T, Tabata H, Ohta Y, Yamasaki Y, Anuurad E, Shiwaku K, et al. Screening for antioxidant activity in edible plant products: comparison of low-density lipoprotein oxidation assay, DPPH radical scavenging assay, and Folin-Ciocalteu assay. J Agric Food Chem. 2004; 52 (8): 2391-96.
32- Wang LF, Zhang HY. A theoretical investigation on DPPH radical-scavenging mechanism of edaravone. Bioorg Med Chem Lett. 2003; 13 (21): 3789-92.
33- de NF, Williams-Ignarro S, Botti C, Sica V, Ignarro LJ, Napoli C. Pomegranate juice reduces oxidized low-density lipoprotein downregulation of endothelial nitric oxide synthase in human coronary endothelial cells. Nitric Oxide. 2006; Jan 11.
34- Pearson DA, Tan CH, German JB, Davis PA, Gershwin ME. Apple juice inhibits human low density lipoprotein oxidation. Life Sci. 1999; 64 (21): 1913-20.
35- Zou CG, Agar NS, Jones GL. Oxidative insult to human red blood cells induced by free radical initiator AAPH and its inhibition by a commercial antioxidant mixture. Life Sci. 2001; 69 (1): 75-86.

Title: Antioxidant properties of pomegranate juice and its scavenging effect on free radicals

Authors: A. Zarban[1], M. Malekaneh[2], M. Reza Boghrati[3]

Abstract

Background and Aim: Epidemiological findings have shown that consuming foods and beverages having high levels of phenolic compounds decreases the risk of many diseases such as cardiovascular ones. During recent years, there has been considerable interest in identifying natural sources with antioxidant activities to prevent oxidative stress- induced damages. The aim of this study was to measure phenolic compounds and antioxidant properties of pomegranate juice, its antioxidant capacity and scavenging effect on free radicals in comparison with other juices.

Materials and methods: In this experimental and laboratory study, antioxidant properties of pomegranate concentrate and also nine brand juices were evaluated. Phenolic compounds of pomegranate juice and the other samples were evaluated by means of Folin-Ciocalteu method, their antioxidant properties by FRAP method (Ferric Reducing/Antioxidant power Assay), and their power in scavenging the radical DPPH (1, 1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl) was measured. Besides, the capacity of pomegranate juice inhibitory effect on peroxidation of plasma lipids by copper ions and its inhibitory effect on controlling the hemolysis of erythrocytes induced by H_2O_2 were studied. The obtained data was analyzed by means of SPSS software.

Results: The most amount of phenolic compounds was found in pomegranate juice (205.0±5.0 mg Gallic acid equivalent to 100 ml of diluted pomegranate juice). Pomegranate also showed the highest total antioxidant capacity (11.17±0.3 mmol/l). In DPPH method whose radical scavenging activity was evaluated by the specific sample, pomegranate also showed its most capacity (96%).Correlative studies have shown that there is a positive and significant correlation between phenolic compounds content of the studied samples and their total antioxidant capacity in inhibiting or scavenging of DPPH radical. Studying the effect of different dilutions of pomegranate juice on inhibiting the formation of conjugated diene in plasma lipids and hemolysis of erythrocytes showed that in a dose-bound process the more the concentration of pomegranate juice, the more its inhibitory effect on hemolysis.

Conclusion: On the basis of the results of this study, compared with other fruit juices studied pomegranate juice has more phenolic compounds and its total oxidant capacity is high; besides, it has great strength in inhibiting different radicals and can have beneficial effects on improving antioxidant defence of the body and decreasing oxidative stress of it.

Key Words: Pomegranate juice, Phenolic compounds, Total antioxidant activity

[1] Corresponding Author; Assistant Professor, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Birjand University of Medical Sciences. Birjand, Iran azarban@yahoo.com
[2] Assistant Professor, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Birjand University of Medical Sciences. Birjand, Iran
[3] Physician