

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
دانشکده منابع طبیعی

عنوان:

استخراج و تعیین مقدار فنل و فلاونوئید تام از پوست چهار گونه راش، ممرز، صنوبر و بلوط و
تعیین مقدار کمی برخی ترکیبات فنلی با HPLC

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد (M.Sc.)
در رشته صنایع خمیر و کاغذ

استاد راهنما:

دکتر نورالدین نظرنژاد

استادان مشاور:

دکتر محمدعلی ابراهیمزاده

دکتر سید مجید ذبیحزاده

پژوهش و نگارش:

رویا فضلی

شهریورماه ۱۳۹۱

تقدیم به :

پدرم، آنکه نمی‌دانم از بزرگی‌اش بگویم یا مردانگی، سخاوت،
استواری و مهربانیش

مادرم، آنکه آفتاب مهرش در آستانه قلبم، همچنان پابرجاست
و هرگز غروب نخواهد کرد

برادرم، آنکه وجودش همه مهر است و پاکی

پروردگارا توفیقم ده که هر لحظه شکرگزارشان باشم

این اثر کوچک هدیه ایست به تمامی آنها که دوستشان دارم.

سپاسگزاری

سپاس بی‌منتها تو را که به تدبیر حکمت ازلی و تاثیر قدرت لم‌یزلی از نابود محض، بود دو عالم غیب و شهادت را رقم زدی. ای پروردگار جهان حمد و ثنایت می‌گویم در خور زبان قاصر خویش و نه در شأن و سزاوار مقام پروردگاریت.

با تمامی وجود از مقام شامخ استاد گرانمایه جناب آقای دکتر نظرنژاد که در نهایت لطف و بزرگواری، تمامی سعی و تلاش خود را در جهت اعتلای واقعی و موثر ارزش‌های آموزشی در کالبد هدایت‌ها و رهنمودها نسبت به اینجانب مبذول فرموده‌اند و در کمال سعه صدر با حسن خلق و فروتنی از هیچ کمکی در این عرصه بر من دریغ ننمودند کمال قدردانی را دارم.

از محضر استاد بزرگوار جناب آقای دکتر ابراهیم‌زاده که وجودش الهام‌بخش بزرگترین مفاهیم است. در پناه یاری ایشان سخت‌ترین لحظات این راه، شیرین‌ترین خاطراتم شد و تا زنده هستم افتخار شاگردی ایشان را دارم، نهایت سپاس و تشکر را می‌نمایم.

بر خود لازم می‌دانم از استاد شایسته و مهربانم جناب آقای دکتر ذبیح‌زاده که تلمذ در محضر گوهر بارشان آفریننده برگ‌های سبز دفتر تحصیل اینجانب شد، سپاسگزاری نمایم.

سپاس بیکران از پدر و مادر عزیزم که همواره بر کوتاهی و درشتی من، قلم عفو کشیده و کریمانه از کنار غفلت‌هایم گذشته‌اند و در تمام عرصه‌های زندگی یار و یاور بی چشم‌داشت برایم بوده‌اند، بر دستان پرمهرشان بوسه می‌زنم.

از برادر مهربانم به پاس تعبیر عظیم و انسانیش از کلمه ایثار و از خودگذشتگی و به پاس محبت‌های بی‌دریغش که هرگز فروکش نمی‌کند، تشکر و قدردانی می‌نمایم.

با تشکر از داوران محترم جناب آقای دکتر اسدپور و جناب آقای دکتر کاظمی که همواره یاریم دادند و با حضورشان بر کار من ارج نهادند، یاری و بزرگواریشان را ارج می‌نهم.

از نماینده محترم تحصیلات تکمیلی جناب آقای دکتر تمرتاش به خاطر مساعدت‌های بی‌پایانشان تشکر می‌نمایم.

در پایان از تمامی دوستان و بزرگواری که اگر نبود محبت، همکاری و همفکری ارزشمندشان به حق انجام این پژوهش میسر نمی‌گردید، صمیمانه تشکر می‌نمایم و از ایزد منان سربلندی و سلامتشان را خواستارم.

چکیده

برای آنالیز شیمیایی مواد استخراجی از پوست چهار گونه درختی راش، ممرز، صنوبر و بلوط که از نظر دارویی و صنعتی که می‌توانند دارای اهمیت باشند و درصد حجمی زیادی از جنگل‌های شمال کشور را به خود اختصاص می‌دهند، نمونه‌گیری شد. آزمایش‌ها و نتایج نشان داد که درصد کلی مواد استخراجی پوست چهار گونه ذکر شده شامل راش، ممرز، صنوبر و بلوط با حلال استن به ترتیب ۱۶/۵، ۱۷/۲، ۱۵/۹ و ۲۵/۷ درصد است. فنل‌ها دسته‌ای از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی هستند که بخش مهمی از مواد استخراجی پوست را تشکیل می‌دهند. آنتی‌اکسیدان‌های موجود در مواد غذایی اثرات زیان بخش رادیکال‌های آزاد را خنثی کرده و در پیشگیری از بیماری‌های قلبی-عروقی، سرطان، بیماری‌های دژنراتیو (پارکینسون و آلزایمر) نقش مهمی را ایفا می‌کنند. به علت اثرات سمی آنتی‌اکسیدان‌های صنعتی، اخیراً تلاش برای یافتن آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به خصوص با منشأ گیاهی افزایش یافته است. از آنجا که اطلاعات کمی از فعالیت آنتی‌اکسیدانی درختان ذکر شده در دسترس است، در این پایان‌نامه ضمن اندازه‌گیری محتوای تام فنلی و فلاونوئیدی، خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره استنی پوست درختان فوق با روش‌های آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. روش نخست، بر اساس توانایی عصاره‌ها در به دام اندازی رادیکال DPPH (دی فنیل پیکریل هیدرازیل) می‌باشد، در روش دوم قدرت احیاء کنندگی نمونه‌ها با اهداء الکترون به آهن III و احیای آن به آهن II بررسی شد، در روش سوم به دام اندازی رادیکال نیتریک اکساید بررسی شد یعنی با تولید بیش از حد نیتریک اکساید، واکنش‌های زنجیره‌ای آغاز می‌گردد، در روش چهارم میزان جذب پراکسید هیدروژن ارزیابی شد و در نهایت برخی ترکیبات فنلی موجود در مواد استخراجی پوست، از نظر کمی به وسیله کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) ارزیابی و شناسایی شدند. میزان محتوای تام فنلی برای گونه‌های بالا به ترتیب راش ۲۰۱/۲، ممرز ۲۲۴/۲، صنوبر ۲۰۸ و بلوط ۱۹۹/۷۳ و محتوای تام فلاونوئیدی برای راش ۹/۶، ممرز ۱۰/۸، صنوبر ۲۰/۹ و بلوط ۱۱/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره به دست آمد. در نهایت، طبق نتایج حاصل می‌توان گفت که عصاره‌های استنی پوست چهار گونه فوق دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی مناسبی در مقایسه با استانداردها هستند. از نظر کمی فنل اسیدگالیک در راش، ممرز و بلوط و فنل اسیدکوماریک در صنوبر دارای بیشترین مقادیر ترکیبات فنلی بودند. اسیدکوماریک در تمامی عصاره‌ها وجود داشت و در گونه بلوط با ۳۷/۵ میلی‌گرم بر گرم عصاره دارای بیشترین مقدار بود.

واژه‌های کلیدی: مواد استخراجی، آنتی‌اکسیدان، رادیکال آزاد، راش، ممرز، صنوبر، بلوط، کروماتوگرافی مایع با کارایی

فهرست مطالب

صفحه

عنوان

فصل اول: کلیات

- ۱- کلیات..... ۲
- ۱-۱- مقدمه..... ۲
- ۱-۲- پوست..... ۵
- ۱-۲-۱- تشریح پوست..... ۶
- ۱-۲-۲- پوست داخلی..... ۶
- ۱-۲-۳- پوست خارجی..... ۷
- ۱-۲-۴- شیمی پوست..... ۷
- ۱-۲-۵- رطوبت پوست..... ۸
- ۱-۳- درصد پوست درختان..... ۸
- ۱-۴- استفاده از پوست درختان در صنایع مختلف..... ۹
- ۱-۴-۱- استفاده از پوست در صنعت تخته خرده چوب..... ۹
- ۱-۴-۲- استفاده از پوست در صنعت داروسازی..... ۹
- ۱-۴-۲-۱- گونه بلوط..... ۹

- ۱-۴-۲-۲ گونه راش..... ۱۰
- ۱-۴-۲-۳ گونه ممرز..... ۱۰
- ۱-۴-۲-۴ گونه صنوبر..... ۱۰
- ۱-۵ ترکیبات شیمیایی تشکیل دهنده پوست..... ۱۰
- ۱-۵-۱ ترکیبات ماکرومولکولی پوست..... ۱۱
- ۱-۵-۲ ترکیبات عادی پوست..... ۱۱
- ۱-۵-۳ مواد استخراجی..... ۱۱
- ۱-۶ ترکیبات فنلی..... ۱۳
- ۱-۷ آنتی اکسیدانها..... ۱۴
- ۱-۷-۱ انواع آنتی اکسیدانها..... ۱۵
- ۱-۷-۱-۱ انواع آنتی اکسیدانهای داخلی..... ۱۵
- ۱-۷-۱-۲ انواع آنتی اکسیدانهای خارجی..... ۱۶
- ۱-۸ فلاونوئیدها..... ۱۶
- ۱-۹ عصاره‌های گیاهی..... ۲۰
- ۱-۹-۱ مراحل تهیه عصاره گیاهی..... ۲۱

عنوان	صفحه
۲-۹-۱ ارزیابی عصاره‌های گیاهی.....	۲۱
۳-۹-۱ روش‌های استخراج عصاره.....	۲۲
۱-۳-۹-۱ روش خیساندن.....	۲۴
۲-۳-۹-۱ مزایا و معایب خیساندن.....	۲۵
۳-۳-۹-۱ روش پرکولاسیون.....	۲۵
۴-۳-۹-۱ روش دایجشن.....	۲۶
۵-۳-۹-۱ روش دم کردن.....	۲۶
۶-۳-۹-۱ روش سوکسوله.....	۲۷
۷-۳-۹-۱ روش استخراج به کمک اولتراسوند (UAE) سونیکیت.....	۲۷
۱۰-۱ روش‌های بررسی توانایی آنتی اکسیدانی.....	۳۰
۱۱-۱ ارزیابی محتوای فنلی.....	۳۰
۱۲-۱ ارزیابی محتوای فلاونوئیدی.....	۳۳
۱۳-۱ ارزیابی میزان به دام اندازی رادیکال DPPH.....	۳۴
۱۴-۱ ارزیابی قدرت احیاکنندگی.....	۳۶
۱۵-۱ ارزیابی به دام اندازی نیتریک اکساید.....	۳۸
۱۶-۱ ارزیابی میزان جذب پراکسید هیدروژن.....	۴۳

۱۷-۱ کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)..... ۴۳

۱-۱۷-۱ اجزاء اصلی دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا..... ۴۴

۱-۱-۱۷-۱ مخزن فاز متحرک..... ۴۴

۱-۱-۱۷-۱ آشکارساز..... ۴۴

۱-۱-۲-۱-۱۷-۱ اهمیت قطبیت در HPLC..... ۴۵

۱-۱-۲-۱-۱۷-۱ انواع HPLC..... ۴۵

۱-۱-۲-۱-۱۷-۱ فشار جریان و درجه حرارت..... ۴۵

۱-۱-۳-۱-۱۷-۱ پمپ..... ۴۵

۱-۱-۳-۱-۱۷-۱ تزریق نمونه..... ۴۶

۱-۱-۴-۱-۱۷-۱ ستون..... ۴۶

۱-۱۸ اهداف تحقیق..... ۴۷

فصل دوم: بررسی پیشینه تحقیق

۲- بررسی پیشینه تحقیق..... ۴۹

۱-۲ بررسی مطالعات انجام شده در داخل کشور..... ۴۹

۲-۲ بررسی مطالعات انجام شده در خارج از کشور..... ۵۲

فصل سوم: مواد و روش‌ها

۱-۳ تجهیزات و دستگاه‌های مورد استفاده..... ۵۸

۲-۳ مواد مورد استفاده..... ۵۸

۳-۳ نمونه برداری..... ۵۸

۱-۳-۳ آماده‌سازی نمونه‌های پوست..... ۵۹

۴-۳ دستگاه‌های مورد استفاده..... ۶۰

۱-۴-۳ دستگاه سوکسوله..... ۶۰

۲-۴-۳ دستگاه اسپکتروفتومتر..... ۶۱

۳-۴-۳ دستگاه حمام آب (بن‌ماری)..... ۶۲

۴-۴-۳ دستگاه تقطیر خلا دوار..... ۶۳

۵-۴-۳ دستگاه خشک‌کن انجمادی..... ۶۴

۶-۴-۳ دستگاه HPLC..... ۶۵

۵-۳ شرح آزمایش..... ۶۶

۱-۵-۳ تعیین درصد مواد استخراجی پوست..... ۶۶

فهرست جداول

صفحه	عنوان
۷۲	جدول ۱-۳ نحوه جداسازی در دستگاه HPLC
۷۶	جدول ۱-۴ درصد مواد استخراجی پوست چهار گونه راش، ممرز، صنوبر و بلوط در سه حلال مختلف.....
۷۷.....	جدول ۲-۴ جذب‌های خوانده‌شده از غلظت‌های مختلف اسید گالیک به منظور رسم منحنی استاندارد.....
۷۹.....	جدول ۳-۴ جذب‌های خوانده‌شده از غلظت‌های مختلف کوئرستین به منظور رسم منحنی استاندارد.....
	جدول ۴-۴ میزان محتوای تام فنل و فلاونوئید اندازه‌گیری شده در عصاره چهار گونه راش، ممرز، صنوبر و
۸۰	بلوط.....

جدول ۴-۵ درصد مهار رادیکال DPPH توسط استاندارد BHA در غلظت‌های مختلف..... ۸۲

جدول ۴-۶ درصد مهار رادیکال DPPH توسط عصاره استنی راش در غلظت‌های مختلف..... ۸۳

جدول ۴-۷ درصد مهار رادیکال DPPH توسط عصاره استنی ممرز در غلظت‌های مختلف..... ۸۴

جدول ۴-۸ درصد مهار رادیکال DPPH توسط عصاره استنی صنوبر در غلظت‌های مختلف..... ۸۵

جدول ۴-۹ درصد مهار رادیکال DPPH توسط عصاره استنی بلوط در غلظت‌های مختلف..... ۸۶

جدول ۴-۱۰ میزان قدرت احیاکنندگی اسیدآسکوربیک به عنوان استاندارد در غلظت‌های مختلف..... ۸۸

جدول ۴-۱۱ میزان جذب یا قدرت احیاکنندگی عصاره استنی راش در غلظت‌های مختلف..... ۸۹

جدول ۴-۱۲ میزان جذب یا قدرت احیاکنندگی عصاره استنی ممرز در غلظت‌های مختلف..... ۹۰

جدول ۴-۱۳ میزان جذب یا قدرت احیاکنندگی عصاره استنی صنوبر در غلظت‌های مختلف..... ۹۱

جدول ۴-۱۴ میزان جذب یا قدرت احیاکنندگی عصاره استنی بلوط در غلظت‌های مختلف..... ۹۲

صفحه

عنوان

جدول ۴-۱۵ آنالیز واریانس داده‌های چهار گونه راش، ممرز، صنوبر و بلوط در آزمون قدرت

احیاکنندگی..... ۹۴

جدول ۴-۱۶ درصد مهار نیتریک اکساید توسط استاندارد کوئرستین در غلظت‌های مختلف..... ۹۶

جدول ۴-۱۷ درصد مهار نیتریک اکساید توسط عصاره استنی راش در غلظت‌های مختلف..... ۹۷

جدول ۴-۱۸ درصد مهار نیتریک اکساید توسط عصاره استنی ممرز در غلظت‌های مختلف..... ۹۸

جدول ۴-۱۹ درصد مهار نیتریک اکساید توسط عصاره استنی صنوبر در غلظت‌های مختلف..... ۹۹

جدول ۴-۲۰ درصد مهار نیتریک اکساید توسط عصاره استنی بلوط در غلظت‌های مختلف..... ۱۰۰

جدول ۴-۲۱ درصد مهار پراکسید هیدروژن توسط استاندارد BHA در غلظت‌های مختلف.....۱۰۲

جدول ۴-۲۲ درصد مهار پراکسید هیدروژن توسط عصاره استنی ممرز در غلظت‌های مختلف.....۱۰۳

جدول ۴-۲۳ درصد مهار پراکسید هیدروژن توسط عصاره استنی بلوط در غلظت‌های مختلف.....۱۰۴

جدول ۴-۲۴ درصد مهار پراکسید هیدروژن توسط عصاره استنی راش در غلظت ۲۵ (میکروگرم در میلی-

لیتر).....۱۰۵

جدول ۴-۲۵ درصد مهار پراکسید هیدروژن توسط عصاره استنی صنوبر در غلظت ۵۰ (میکروگرم در میلی-

لیتر).....۱۰۵

جدول ۴-۲۶ مساحت سطح زیر پیک اسیدهای فنلی در استاندارد با غلظت ۴۰ میلی گرم در لیتر.....۱۰۷

جدول ۴-۲۷ مساحت سطح زیر پیک اسیدهای فنلی در عصاره استنی راش.....۱۰۸

جدول ۴-۲۸ مساحت سطح زیر پیک اسیدهای فنلی در عصاره استنی ممرز.....۱۱۰

عنوان صفحه

جدول ۴-۲۹ مساحت سطح زیر پیک اسیدهای فنلی در عصاره استنی صنوبر.....۱۱۱

جدول ۴-۳۰ مساحت سطح زیر پیک اسیدهای فنلی در عصاره استنی بلوط.....۱۱۳

جدول ۴-۳۱ میزان اسیدهای فنلی در عصاره‌های استنی راش، ممرز، صنوبر و بلوط (میلی گرم بر گرم

عصاره).....۱۱۴

فهرست اشکال

صفحه	عنوان
۱۸.....	شکل ۱-۱ ساختمان کلی فلاونوئیدها.....
۱۹.....	شکل ۲-۱ ساختار کوئرستین
۳۳.....	شکل ۳-۱ نحوه اتصال فلزات به فلاونوئید.....
۳۴.....	شکل ۴-۱ ساختار رادیکال DPPH.....

شکل ۱-۵ نمودار واکنش رادیکال DPPH با آنتی‌اکسیدان و تغییرات رنگ حاصل از آن..... ۳۵

شکل ۱-۶ مولکول فروسیانید فریک..... ۳۶

شکل ۱-۷ پایان واکنش احیا و ظهور رنگ آبی پروس..... ۳۷

شکل ۱-۸ ساختار سدیم نیتروپروساید..... ۴۱

شکل ۱-۹ مکانیسم واکنش نیتريت و واکنشگر گریس..... ۴۲

شکل ۱-۱۰ پایان واکنش نیتريت و واکنشگر گریس (تولید رنگ قرمز غلیظ دی آزو)..... ۴۳

شکل ۱-۱۱ نمونه‌ای از یک دستگاه HPLC..... ۴۷

شکل ۳-۱ پوست چهار گونه راش، ممرز، صنوبر و بلوط..... ۵۹

عنوان صفحه

شکل ۳-۲ دستگاه سوکسوله..... ۶۰

شکل ۳-۳ دستگاه اسپکتروفتومتر..... ۶۱

شکل ۳-۴ دستگاه حمام آب (بن‌ماری)..... ۶۲

شکل ۳-۵ دستگاه تقطیر خلا دوار..... ۶۳

شکل ۳-۶ دستگاه فریزدرایر..... ۶۴

شکل ۳-۷ دستگاه HPLC..... ۶۵

شکل ۴-۱ نمودار استاندارد اسید گالیک برای تعیین محتوای تام فنلی..... ۷۸

شکل ۴-۲ نمودار استاندارد کوئرستین برای تعیین محتوای تام فلاونوئیدی..... ۷۹

شکل ۴-۳ محتوای تام فنلی عصاره استخراج شده با استن پوست درختان راش، ممرز، صنوبر و

بلوط..... ۸۰

شکل ۴-۴ محتوای تام فلاونوئیدی عصاره استخراج شده با استن پوست درختان راش، ممرز، صنوبر و

بلوط..... ۸۱

شکل ۴-۵ نمودار استاندارد میزان به دام اندازی رادیکال DPPH توسط استاندارد BHA در غلظت های

متفاوت..... ۸۲

عنوان صفحه

شکل ۴-۶ نمودار میزان به دام اندازی رادیکال DPPH توسط عصاره استنی راش در غلظت های

متفاوت..... ۸۳

شکل ۴-۷ نمودار میزان به دام اندازی رادیکال DPPH توسط عصاره استنی ممرز در غلظت های

متفاوت..... ۸۴

شکل ۴-۸ نمودار میزان به دام اندازی رادیکال DPPH توسط عصاره استنی صنوبر در غلظت های

متفاوت..... ۸۵

شکل ۴-۹ نمودار میزان به دام اندازی رادیکال DPPH توسط عصاره استنی بلوط در غلظت های

متفاوت..... ۸۶

شکل ۴-۱۰ مقایسه میزان جذب یا قدرت احیا کنندگی عصاره های استنی چهار گونه راش، ممرز، صنوبر و

بلوط با استاندارد اسید آسکوربیک..... ۹۳

شکل ۴-۱۱ نمودار استاندارد میزان جذب نیتریک اکساید توسط استاندارد کوئرستین در غلظت های

متفاوت..... ۹۶

شکل ۴-۱۲ نمودار میزان جذب نیتریک اکساید توسط عصاره استنی راش در غلظت های

متفاوت..... ۹۷

صفحه

عنوان

شکل ۴-۱۳ نمودار میزان جذب نیتریک اکساید توسط عصاره استنی ممرز در غلظت های

متفاوت..... ۹۸

شکل ۴-۱۴ نمودار میزان جذب نیتریک اکساید توسط عصاره استنی صنوبر در غلظت های

متفاوت..... ۹۹