دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

پایان نامه جهت اخذ مدرک کارشناسی ارشد در رشته

علوم گیاهی گرایش فیزیولوژی گیاهی

مقایسه اسیدهای چرب ، پروتئین محلول ، ترکیبات فنولی وفعالیت آنتی اکسیدانی دانه چند رقم ازهندوانه (*Citrullus lanatus*)

استاد راهنما :

پروفسور رضا حیدری

استاد مشاور :

دکتر عبدالله حسن زاده

تحقیق ونگارش:

محسن رحیم زاده

شهریور ماه ۱۳۹۳

حق چاپ ونشر برای دانشگاه ارومیه محفوظ است

تقدیمی کوچک اگر لایق باشد به محضر

آفرینده خوبیها و زیبایی‌ها، خدای منان، خدای زیبائیها و پیشگاه حضرت ولیعصر (عج)، بهار امامت و ولایت و پدر بزرگوارم که با غیرت خود الفبای زندگی را به من آموخت و مادر فداکارم که از اول آفرینش، هیچ واژه ای نتوانسته مهر او را معنی کند

خواهران و برادران مهربان و عزیزم، به پاس عاطفه سرشار و محبت های بی دریغشان که هرگز فروکش نمی کند

و آنانکه بی صدا شکستند تا طلوع سپیده را نظاره گر باشیم

تشکر و قدردانی

سپاس خدای را که سخنوران، در ستودن او بمانند و شمارندگان، شمردن نعمت های او ندانند و کوشندگان، حق او را گزاردن نتوانند. و سلام و درود بر محمّد و خاندان پاک او، طاهران معصوم، هم آنان که وجودمان وامدار وجودشان است؛ و نفرین پیوسته بر دشمنان ایشان تا روز رستاخیز. . .

از خانواده عزیزم که گرمابخش وجود من هستند و پشتوانه من در تمامی مراحل زندگی بوده اند

از اساتید عزیزم جناب اقای دکتر حیدری و دکتر حسن زاده به جهت راهنمایی هایشان قدر دانی می نمایم

از جناب آقای دکتر عباسپور و دکتر جامعی که زحمت داوری این پایان نامه را قبول کردند

خانم فرناد مسؤل محترم آزمایشگاه بیوشیمی و همچنین از هم خوابگاهیهای عزیزم آقایان محسن کریمی، محسن صدر محمدی، میکائیل عالی نژاد، حجت فرشی و صادق ابراهیمیان که مرا در طول این دو سال یاری نمودند تشکر می کنم

فهرست

چکیده..... ۱

فصل اول: مقدمه..... ۳

منشا و توصیف گیاه شناختی ۳

ترکیبات غذایی هندوانه ۳

ترکیبات غذایی بخش خوراکی میوه..... ۳

ترکیبات غذایی دانه هندوانه..... ٤

خواص دارویی هندوانه ٦

ترکیبات فنولی درگیاهان ٦

فلاونوئیدها..... ۱۱

نقش فلاونوئیدها در گیاهان..... ۱۱

مکانیزم عمل آنتی اکسیدان ها و سنجش آنها ۱۲

اسیدهای چرب..... ۱۳

ساختار اسیدهای چرب..... ۱۳

نام گذاری اسیدهای چرب..... ۱٤

ویژگی های فیزیکی..... ۱۵

استفاده از روغن گیاهی در صنعت ۱۵

سابقه ی تحقیق..... ۱٦

هدف..... ۱۷

فصل دوم : مواد وروش ها ۱۹

فراهم کردن مواد گیاهی و شیمیایی ۱۹

اصول کروماتوگرافی گازی ۱۹

روش کار و اجزاء دستگاه گاز کروماتوگرافی (G.C) ۲۰

قسمت تزریق نمونه..... ۲۰

قسمت تفکیک کننده نمونه..... ۲۰

قسمت آشکار ساز..... ۲۰

برنامه ریزی دمایی و اندازه گیری اسیدهای چرب ۲۱

آنالیز اسید های چرب با دستگاه گاز کروماتوگرافی ۲۱

استخراج روغن..... ۲۱

تهیه متیل استراسیدهای چرب ۲۲

اندازه گیری درصد پروتئین محلول ۲۲

روش تهیه بافر و استخراج عصاره پروتئینی..... ۲۲

تهیه عصاره های متانولی ۲٤

تعیین محتوای فنول کل ۲٤

تعیین محتوای فلاوونوئید ۲٤

ظرفیت جاروب کنندگی رادیکال های DPPH..... ۲۵

سنجش FRAP..... ۲۵

ظرفیت جمع آوری رادیکال های نیتریک اکسید ۲٦

سنجش درصد جمع آوری رادیکال هیدروژن پراکسید ۲٦

آنالیز آماری..... ۲۷

فصل سوم: نتایج ۲۸

آنالیز اسیدهای چرب به وسیله کروماتوگرافی ۲۸

محتوی پروتئین محلول ۳۰

محتوی فنول ۳۱

محتوی فلاونوئید ۳۲

ظرفیت جاروب کنندگی رادیکال های DPPH ۳۳

درصد جمع آوری رادیکال های نیتریک اکسید ۳۳

قدرت احیاء آهن FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) ۳٤

درصد جمع آوری رادیکال های هیدروژن پراکسید ۳۵

فصل چهارم: بحث ۳۷

آنالیز اسید های چرب مغز دانه در ارقام مختلف هندوانه ۳۷

میزان پروتئین محلول ۳۹

استخراج ترکیبات فنولی ۳۹

محتوی فنول و فلاونوئید ٤۰

ظرفیت جاروب کنندگی رادیکال های DPPH ٤۱

سنجش FRAP ٤۳

ظرفیت جمع آوری رادیکال های نیتریک اکسید ٤٤

سنجش درصد جمع آوری رادیکال هیدروژن پراکسید ٤۵

نتیجه گیری کلی ٤٦

پیشنهادات ٤٦

فصل پنجم: ضمائم ۵٤

منحنی های استاندارد ٥٤
کروماتوگرام ها..... ..... ٥٦
چکیده انگلیسی..... ٦١

چکیده

هندوانه گیاهی از تیره Cucurbitaceae با دانه های روغنی می‌باشد. ایران با تولید سالیانه ۲ میلیون و ۲۰۰ هزار تن هندوانه در سال رتبه چهارم جهانی تولید هندوانه را به خود اختصاص داده است. امروزه مصرف آجیلی دانه هندوانه به صورت گسترده ای مورد توجه قرار گرفته است . در این پژوهش عصاره متانولی مغز و پوسته ۸ رقم دانه هندوانه شامل، سه رقم آجیلی (کلاله ، تربت جام ، جوین) ، سه رقم دیم محلی (پیرانشهر ، کرج ، انزل) و دو ژنوتیپ (فرفاکس ، بلاک لی) از نظر محتوی فنولی ، فلاونوئیدی و خاصیت آنتی اکسیدانی مورد بررسی قرار گرفتند . چهار آزمایش مهار رادیکال های DPPH ، FRAP ، نیتریک اکسید و پراکسید هیدروژن برای ارزیابی خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره متانولی پوست ومغز دانه به کار گرفته شدند. آنالیز آماری تک سویه (ANOVA) تفاوت معنی داری را بین نمونه ها نشان داد. در این آزمایشات پوست دانه های تربت جام وپیرانشهر که قسمت بلا استفاده و دور ریز دانه می‌باشد محتوی فنولی، فلاونوئیدی و فعالیت آنتی اکسیدانی بسیار بالایی از خود نشان دادند.

همچنین پروتئین محلول پودر مغز بدون روغن و محتوی اسید های چرب دانه ها نیز اندازه گیری شد. آنالیز آماری تک سویه (ANOVA) تفاوت معنی داری را بین نمونه ها نشان نداد.

همچنین آنالیز اسید چرب روغن دانه هندوانه توسط کروماتوگرافی گازی نشان داد که این روغن به دلیل وجود میزان بالایی از اسید های چرب غیر اشباع برای مصارف تغذیه ای مناسب می باشد. روغن دانه هندوانه از اسید چرب های پالمیتیک، استئاریک، اولئیک ، لینولئیک، لینولنیک اسید، اروسیک اسید و آراشیدیک اسید تشکیل شده است. اسید های چرب غالب پالمیتیک، استئاریک، اولئیک و لینولئیک اسید بودند.

کلید واژه ها: دانه هندوانه، اسید چرب، ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی، فعالیت آنتی اکسیدانی ، کروماتوگرافی گازی

فصل اول

مقدمه

۱-۱ منشا و توصیف گیاه شناختی

هندوانه از فرمانرو گیاهان (متافیتا) ، شـاخه (جنین داران) Embryophyta ، رده دولپه ایها ، راسـته کدوئیان ، تیره کدوئیان ، جنس *Citrullus* و گونه *Lanatus* می باشد(Robinson and Decker, 1997).

هندوانه میوه ای تولید می‌کند که ۹۳ درصـد آن آب اسـت از این رو نام watermelon را برای آن انتخاب کرده اند. بخش melone از این واقعیت میوه که بزرگ وگرد وشـیرین اسـت و مغز گوشـتالو دارد، گرفته شـده اسـت. اسـم علمی هندوانه هم از ریشه یونانی وهم از ریشه لاتین گرفته شده است. بخش سیترولوس از کلمه *citrus* که مربوط به میوه است . بخش *lanatus* ریشه لاتین داشته و معنی آن کرک دار است که دلالت بر کرک های موجود روی ساقه و برگ گیاه دارد (Baker, et al., 2012).

هندوانه به نظر می رسـد از جنوب آفریقا منشـا می گیرد چون در این مناطق به صـورت وحشی می روید و تمام اشکال متنوع در آنجا یافت می شـود. هندوانه به مدت ٤ هزار سـال در آفریقا کشت شده است(Robinson and Decker, 1997).

هندوانه به صورت خوابیده یا بالا رونده از گیاهان یک ساله یا چند ساله با چندین ساقه محکم تا ارتفاع سه مترمی باشد. بخش های جوان تر با کرک های متراکم متمایل به زرد تا قهوه ای ، در حالی که بخش های مسن تر فاقد کرک هستند. برگ ها علفی ولی محکم هسـتند که در دوطرف دندانه ای شـده اسـت. پیچک ها محکم هسـتند و در بخش بالایی به دوقسـمت تقسـیم می شود. گل های نر و ماده هر دو در یک گیاه وجود دارند. هندوانه گیاهی تک پایه است . میوه در اشکال کروی ، نیمه کروی، تخم مرغی و بیضـی شـکل دیده می شـود(Van, *et.al*, 2004; Fursa, 1981, Maynard, 2001; Oyolu, 1977).

۱-۲ ترکیبات غذایی هندوانه

۱-۲-۱ ترکیبات غذایی بخش خوراکی میوه

ترکیب هندوانه برای هر صد گرم بخش خوردنی شامل ۹۱/۵ گرم آب، ۱۳٤Kj انرژی، پروتئین ۰/٦گرم، چربی ۰/٤ گرم، کربوهیدرات۷/۲ گرم، کلسیم ۸ میلی گرم، فسفر ۹ میلی‌گرم آهن ۰/۱۷میلی‌گرم، تیامین۰/۰۸میلی‌گرم، ریبوفلاوین ۰/۰۲میلی گرم، نیاسین ۰/۲میلی گرم، فولات ۲میلی گرم، آسکوربیک اسید۹/٦ میلی‌گرم می باشد (Schippers, 2002).

هندوانه منبع غنی لیکوپن هست. لیکوپن یک کاروتنوئید مورد علاقه به خاطر خاصیت آنتی اکسیدانی و تاثیرات آن بر سلامتی می‌باشد(Rhodes and zhang, 1999).

گیاهان تیره کدو حاوی ترکیباتی مثل کوکوربیتاسین، تری ترپن ها، استرول ها و آلکالوئیدها می‌باشند. همچنین آمینواسید سیترولین از هندوانه جدا و شناسایی شده است(Yuan, et al., 2006).

۱-۲-۲ ترکیبات غذایی دانه هندوانه

دانه های هندوانه غنی از پروتئین وچربی هستند. ۷۵درصد دانه هندوانه از چربی و پروتئین تشکیل شده است(Gopalan et al., 1989; FAO, 2004).

دانه برای غنی کردن پروتئینی غذاهای مختلف به کار می رود. همچنین ماتریکس پروتئینی دانه هندوانه زیست دسترس پذیری مواد معدنی(mineral bioaccesibility) بسیار خوبی نشان داده است. درمقابل پروتئین سویا مانع جذب آهن و روی مواد غذایی افزوده شده به غذا می شود(El-Adaway and Taha, 2001). پروتئین دانه هضم پذیری خوبی را در آزمایشگاه نشان داده است همچنین دانه میزان بسیار کمی عوامل ضد تغذیه ای دارد. ترکیب آمینو اسیدی (آرژنین بالا) نشان دهنده خواص پزشکی دانه می باشد(Kane and Miller, 1984; Lynch, Dassenko, Cook, Luillerat & Hurrell, 1994).

جدول۱-۲-۲-۱و۱-۲-۲-۲ نشان دهنده ترکیبات غذایی دانه هندوانه می باشد.

Chemical composition of watermelon seed meal, defatted flour and protein isolate -per 100 g[a].

Component	Watermelon seed components		
	Whole meal	Defatted flour	Protein isolate
Moisture (%)	4.86 ± 0.06	3.80 ± 0.01	5.00 ± 0.04
Fat (g)	46.83 ± 0.44	0.95 ± 0.15	0.75 ± 0.13
Protein (g)	27.59 ± 0.33	61.29 ± 0.17	87.95 ± 0.68
Ash(g)	2.87 ± 0.05	5.21 ± 0.13	1.28 ± 0.04
Crude fibre (g)	4.68 ± 0.25	9.50 ± 0.00	3.00 ± 0.20
Iron (mg)	7.3 ± 0.46	10.1 ± 1.20	12.3 ± 0.96
Calcium (mg)	100.0 ± 8.60	150.0 ± 9.4	158.0 ± 6.9
Zinc (mg)	5.2 ± 0.23	8.3 ± 0.56	9.3 ± 0.56
Antinutritional factors			
Phytate (g)	0.99 ± 0.05	1.53 ± 0.16	0.80 ± 0.09
Tannin (g)	320.0 ± 9.51	505.9 ± 15.45	380.0 ± 18.3
Trypsin inhibitor (TIU/mg protein)	–	8.26 ± 0.73	7.29 ± 0.56
Oxalate (g)			
Total	0.213 ± 0.003	0.342 ± 0.09	0.107 ± 0.02
Soluble	0.021 ± 0.004	0.086 ± 0.004	0.32 ± 0.01

جدول۱-۲-۲-۱: ترکیب شیمیایی دانه،آرد بدون چربی وایزوله پروتئینی در هر ۱۰۰ گرم(Lakshmi et al., 2011)

Amino acid profile of watermelon seed protein isolate.

Amino acid	g/100 g protein	Essential amino acid score
Aspartic acid	9.48 ± 0.22	
Glutamic acid	20.71 ± 0.47	
Serine	5.91 ± 0.21	
Glycine	5.82 ± 0.22	
Histidine	2.46 ± 0.12	
Arginine	16.89 ± 0.59	
Threonine[a]	3.47 ± 0.23	90.8
Alanine	6.25 ± 0.18	
Proline	4.26 ± 0.34	
Valine[a]	2.91 ± 0.03	58.6
Methionine[a]	0.33 ± 0.05	35.7
Cysteine[a]	0.96 ± 0.00	
Isoleucine[a]	1.44 ± 0.06	37.0
Leucine[a]	7.44 ± 0.32	109.4
Phenylalanine[a]	5.18 ± 0.11	135.3
Tyrosine	2.85 ± 0.03	
Lysine[a]	2.18 ± 0.13	41.3
Tryptophan[a]	1.07 ± 0.03	107.0

[a] Essential amino acids; *the data represents the average of three replicates.*

جدول ۱-۲-۲-۲: محتوی آمینو اسیدی ایزوله پروتئینی دانه هندوانه(Lakshmi et al., 2011)

۱-۳ خواص دارویی هندوانه

هندوانه در سیستم طب سنتی گیاه محبوبی هست و شناخته شده که حاوی ترکیبات فعال زیستی مثل کوکوربیتاسین، تری ترپن ها، استرول ها، آلکالوئیدها، ویتامین ها ومواد معدنی می‌باشد(Erhirhie et al., 2013).

میوه هندوانه وقتی به طور کامل برسد یا حتی قسمتی از آن فاسد شود به عنوان طب بر استفاده می‌شود.

ریشه گیاه یک مسهل است و در دوزهای بالا به عنوان یک استفراغ آور عمل می‌کند(Grieve et al., 1984).

همچنین میوه ادرار آور است (Grieve et al., 1984) و در درمان ورم و سنگ کلیه موثر است(Chiej, 1984).

دانه یک مسکن و نیرو بخش است (Duke et al.,1985) و گاهی برای درمان عفونت اجزای سیستم ادراری به کار می‌رود(Grieve et al., 1984).

تحقیقات مقدماتی نشان داده است که مصرف هندوانه ممکن است اثر کاهش دهنده روی فشار خون داشته باشد(USA, 2012).

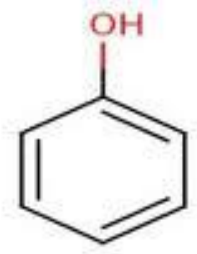
روغن دانه هندوانه همانند عصـاره آبی والکلی، گزارش شده است که کرم های حلقوی و نواری را فلج می‌کند(Chopra , 1958).

Madhavi و همکاران در سـال 2012 خاصـیت ضـد التهابی روغن دانه هندوانه را روی التهاب حاد پنجه القا شـده در موش های رت (rat) آزمایش کردند که در مقایسـه با داروی ضـد التهابی غیر استروئیدی دیکلوفناک نتایج قابل توجهی را نشان داد(Madhavi et al., 2012).

Adesanya و همکاران با مطالعه بر روی تاثیر عصـاره متانولی دانه هندوانه روی هایپر پلازی خوش خیم پروستات ایجاد شـــده در ویســـتـار رت (Wistar Rat)، کاهش وزن پروســـتات وابســـته به دوز عصـــاره متانولی دانه هندوانه را گزارش کردند(Adensanya et al., 2011).

۱-٤ ترکیبات فنولی درگیاهان

ترکیبات فنولی یا پلی فنول ها گروه بزرگ و متنوعی از نظر شیمیایی هستند که از اسیدهای فنولی ساده تا پلی مرهای بسیار بزرگ و پیچیده مانند تانن ها و لیگنین ها را شامل می شوند. همچنین رنگدانه های فلاونوئیدی نیز از جمله این ترکیبات هستند. ساختمان پایه تشکیل دهنده این ترکیبات فنول است که به صورت یک حلقه آروماتیک با یک گروه هیدروکسیل است. به نظر می رسد که ترکیبات فنولی نیز مانند سایر ترکیبات در واکنش بین گیاه و گیاه خوار دخیل هستند. برخی از این ترکیبات مانند لیگنین جزو ترکیبات مهم ساختمانی هستند در حالی که سایر ترکیبات فنولی محصول مسیر های متابولیکی هستند که فاقد نقش مشخصی اند(Hopkins., 2008).



شکل ۱-٤-۱: اساس ترکیبات فنولی

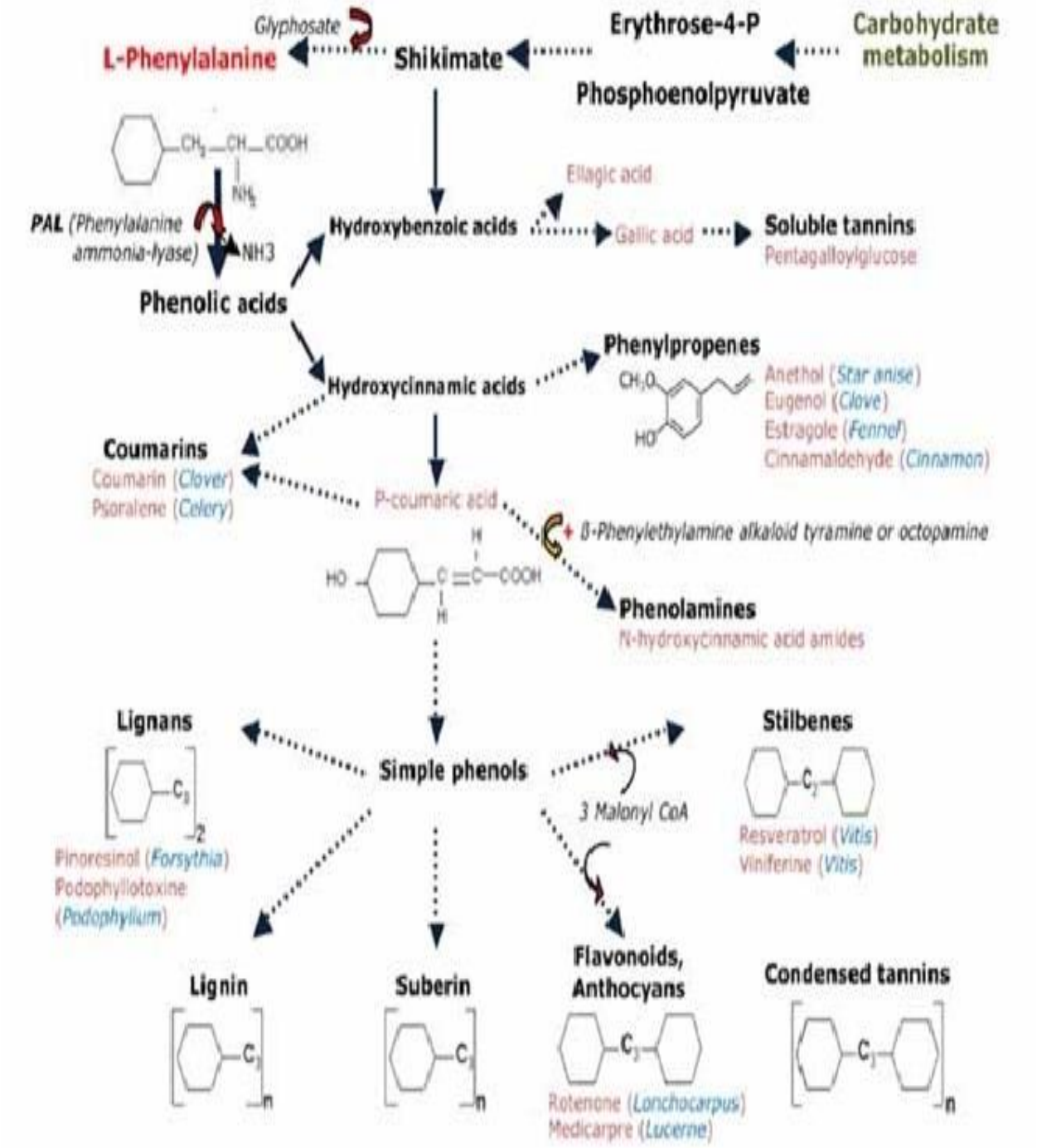
چهار دسته از متابولیتهای ثانویه که به صورت عمده در گیاهان حضور دارند شامل ترپنوئیدها، آلکالوئیدها، ترکیبات حاوی سولفور و ترکیبات فنولی هستند(Bravo 1998).

ترکیبات فنولی گروه پیچیده و بزرگی هستند که فنول های ساده تا ترکیبات با پلیمریزاسیون بالا از جمله تانن ها را شامل می شوند(Dillard et al., 2000).

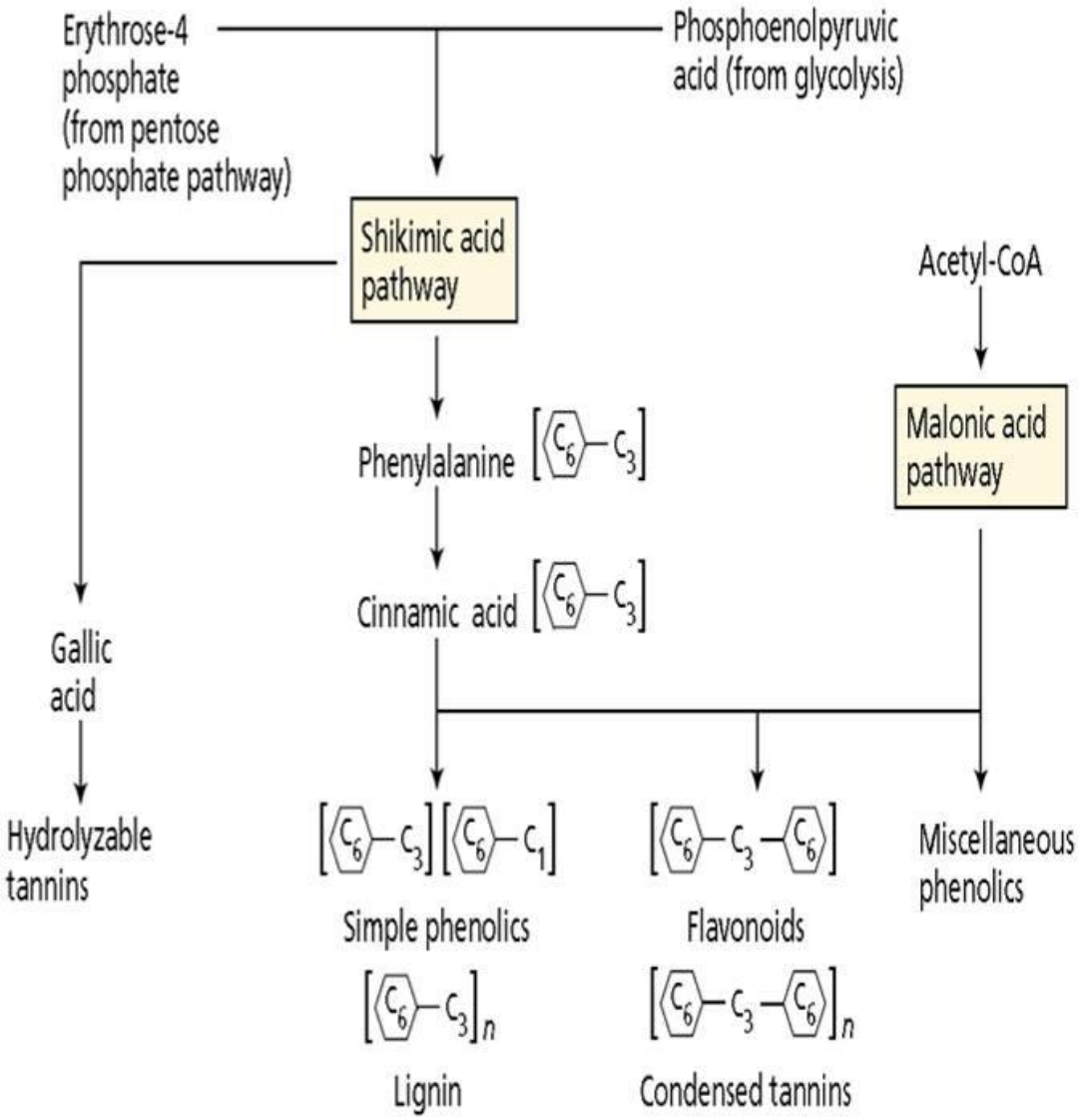
بیوسنتز بسیاری از ترکیبات فنولی با اسید آمینه آروماتیک فنیل آلانین، تیروزین و تریپتوفان شروع می‌شود. این اسید آمینه آروماتیک نیز، در اثریک رشته از واکنش های متوالی که به مسیر اسید شیکیمیک معروف است، با ادغام دو مولکول فسفوانول پیروات و اریتروز-٤- فسفات سنتز می شوند. مسیر سنتز ترکیبات فنولی در شکل ۲ نشان داده شده است. مسیر اسید شیکیمیک در گیاهان، قارچ ها و باکتری ها وجود دارد و در جانوران دیده نشده است. از طرفی فنیل آلانین و تریپتوفان جزو اسید آمینه های ضروری برای انسان هستند بدین معنی که بایستی از منابع غذایی تامین شوند و این دو اسید آمینه منبع تشکیل تمام مولکول های آروماتیک در حیوانات هستند(Hopkins., 2008).

مهم ترین زیر رده های فنول ها در میوه ها اسید های فنولی (هیدروکسی بنزوئیک و هیدروکسی سینامیک اسیدها)، کومارین ها، فلاونوئیدها، تانن های قابل هیدرولیز و تانن های متراکم می‌باشند(Bravo 1998; Hounsome , 2004; Macheix, 1990).

سنتز اسید های آمینه آروماتیک از طریق ادغام یک مولکول اریتروز-٤- فسفات که از مسیر تنفسی پنتوز فسفات حاصل شده با یک مولکول انول پیروات حاصل از گلیکولیز، آغاز می شود. قند ۷ کربنه تولید شده ابتدا حلقوی شده، سپس احیا می شود تا ترکیبی به نام شیکیمات را ایجاد کند که نام مسیر نیز از همین ترکیب گرفته شده است. کلوریسمات نقطه انشعاب است که یا از یک طرف به فنیل آلانین و یا از طرف دیگر به تریپتوفان تبدیل می‌شود. سنتز بیشتر ترکیبات فنولی با جدا شدن گروه آمین از فنیل آلانین و تبدیل آن به اسید سینامیک آغاز می‌شود. آنزیمی که این واکنش را کاتالیز می‌کند فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) نام دارد که در مسیر تولید ترکیبات فنولی یک آنزیم کلیدی است زیرا مسیر واکنش های اسید شیکیمیک را از تولید پروتئین ها به سمت تولید ترکیبات فنولی منحرف می‌کند. مسیر دیگر برای تولید این ترکیبات، جدا شدن گروه آمین از اسید آمینه تیروزین است که P-کوماریک اسید را تولید می‌نماید و به نظر می‌رسد این واکنش اغلب در گراس ها اتفاق می‌افتد. اهمیت نسبی PAL به وسیله چندین بررسی توزیح داده شده است. به عنوان مثال، فعالیت این آنزیم توسط تابشهای قرمز و فرابنفش تحریک می شود در ضمن این دو تابش موجب افزایش فلاونوئید های مختلف نیز می‌شوند. همچنین وقتی بعد از تلقیح سویا با قارچ ها، مقدار فیتو الکسین گلیسئولین افزایش می‌یابد، میزان PAL نیز افزایش می یابد. ترکیب حاصل از فعالیت این آنزیم یعنی اسید سینامیک قادر است فعالیت هورمون گیاهی به نام اکسین را متوقف نماید اما این مطلب در شرایط طبیعی ودلخواه گیاه هنوز مشاهده نشده است. (با اضافه شدن یک گروه هیدروکسیل به اسید سینامیک، اسید P-کوماریک تولید می‌شود با اضافه شدن متوالی گروه های هیدروکسی متوکسی به ترکیب حاصله نیز به ترتیب اسیدهای کافئیک وفرولیک تولید می‌شوند (Hopkins., 2008). هیچ یک از این ترکیبات ساده به صورت زیادی تجمع نمی یابند. احتمال دارد که این ترکیبات بیشتر نقش پیش ساز ترکیبات پیچیده تری مانند کومارین ها، لیگنین ها، فلاونوئیدها و ایزو فلاونوئیدها را ایفا می کنند (شکل های۱-۳-۱و ۱-۳-۳).



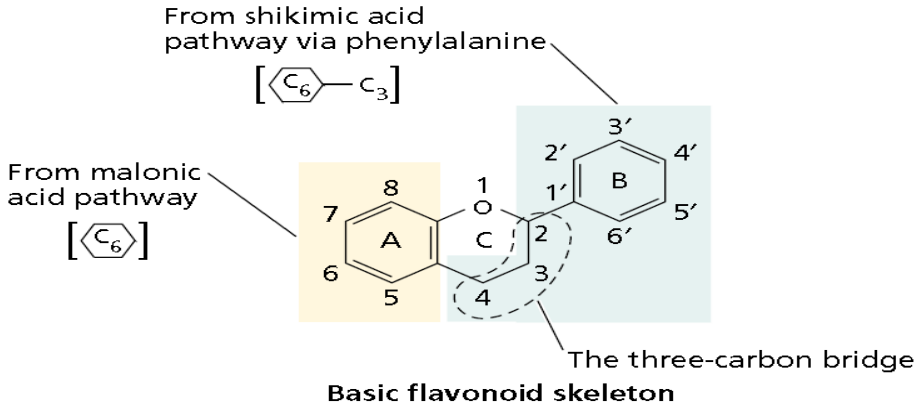
شکل ۱-۳-۱: مسیر ساده شده سنتز ترکیبات فنولی(Douce., 2005)



شکل ۱-۳-۲ :مسیر اسید شیکمیک وتولید اسید آمینه های آروماتیک ودر ادامه ترکیبات فنولی،(Taiz & Zeiger., 2010)

۱-۵ فلاونوئیدها

هرچند دنیای گیاهان اغلب سبز است، ولی این رنگهای زیبای گلبرگ گلها، میوه ها، برگچه ها و گهگاهی برگ ها هستند که بیشتر موجب جذب انسان و حیوانات به سمت گیاهان می‌شود. این رنگ های متنوع سرخ، صورتی ، بنفش ، آبی و ... به دلیل وجود رنگدانه های دیگری به اسم آنتوسیانین ها به گروه بزرگی از ترکیبات که به فلاونوئیدها معروفند تعلق دارند. سایر دسته های فلاونوئیدها (ازقبیل چالکون ها و آرون ها) در رنگ زرد برخی گلها مشارکت دارند. در حالیکه سایر فلاون ها مسئول سفیدی گلبرگ های گل می باشند. بدون آنها گلبرگ ها به جای داشتن رنگ سفید، نیمه شفاف به نظر می‌رسند. فلاونوئیدها به سادگی جدا می شوند و به دلیل رنگ های چشم نواز از مانهای باستان به عنوان منبعی برای تهیه رنگ ها شناخته شده‌اند.فلاونوئیدها از مشتقات فنیل پروپان که یک ترکیب پایه (C6-C3-C6) دارند تشکیل می‌شوند (شکل۱-٤-۱). اسکلت اصلی برای گروه فلاونوئید، فلاوان است که در اتصال C3، یک حلقه پیرون هتروسیکلیک را تشکیل داده است. در فلاوان حلقه هتروسیکلیک کاملا احیاء می‌شود.تقریبا ۱۲ گروه شناخته شده از فلاونوئیدها وجود دارند که اختلاف آنها از یکدیگر فقط در حالت اکسیداسیونی این حلقه هتروسیکلیک است(Hopkins., 2008).



شکل۱-۵-۱: ساختار پایه ترکیبات فلاونوئیدی(Taiz and Zeiger., 2010)

۱-۵-۱ نقش فلاونوئیدها در گیاهان

در گیاهان فلاونوئیدها در گل و رنگدانه ای شدن ، باروری و تولید مثل گیاهان و در واکنش های دفاعی متعدد برای محافظت در برابر استرس های غیر زیستی مثل نور uv یا استرس های زیستی مثل حیوانات شکارچی و حملات پاتوژن ها نقش دارند(Forkmann and Martens, 2001; Winkel-Shirley, 2001; Weisshaar and Jenkins, 1998).

این ترکیبات در رشد و نمو گیاه نیز نقش دارند زیرا شواهد نشان داده است که در انتقال قطبی اکسین نقش

دارند(Murphy et al., 2000; Brown et al., 2001).

درحبوبات در تثبیت همزیستانه نیتروژن در دو مرحله ایفای نقش می‌کنند. اول اینکه آنها سنتز عوامل (Nodulation factors) NOD یا عوامل تنظیم کننده را در ریزوبیوم تنظیم می‌کنند که مسئول شروع گرهک می باشد (Peters et al., 1986; Zaat et al., 1988; Recourt et al., 1992)، ثانیا آنها به عنوان سیگنال های مولکولی در مسیر هدایت عوامل NOD که باعث بازدارندگی انتقال اکسین در سلول های پوست ریشه می شود و باعث تشکیل پریموردیوم گرهک می‌شود (Mathesius et al., 1998).

علاوه بر این شواهدی وجود دارد که نشان دهنده نقش احتمالی فلاونوئیدها در همزیستی آوندی میکوریزا می باشد(Harrison and Dixon, 1993; Harrison and Dixon, 1994; Akiyama et al., 2002).

این ترکیبات در بردارنده سه حلقه آروماتیک که توسط متیلاسیون و هیدروکسیلاسیون استخلاف شده اند. اکثر آگلیکون های فلاونی به صورت فرم گلیکوزیله در سلول های گیاهی وجود دارند. که به نظر می رسد آنها را از تخریب محافظت می‌کند. همچنین از تاثیرات سمی آنها می کاهد و به انتقال آنها از غشا با افزایش حلالیت آن در آب کمک می‌کند (Jones and Vogt, 2001).

این ترکیبات در اشکال آگلیکون یا گلیکوزیله در واکوئل سلول های گیاهی قرار گرفته اند و در بخش های محلول قطبی قرار دارند. بنابر این فلاونوئیدها می‌توانند به راحتی توسط حلال های قطبی مثل متانول که در مورد لیگنین و تانن های غیر محلول که به پروتئین ها در شکستن سلول در طول عصاره گیری متصل هستند صدق نمی‌کند. بنابر این فلاونوئیدها و دیگر فنول های موجود در بخش حلال قطبی می‌تواند به وسیله فاز معکوس HPLC که به PDA مجهز شده جدا شود که بر اساس طیف جذب نوری از نور مرئی و uv دریافت شده از هر ترکیب بنا شده است . ترکیبات فنولی آروماتیک هستند و جذب قوی در ناحیه uv طیف نشان می‌دهند(Jones and Vogt, 2001).

۱-٦ مکانیزم عمل آنتی اکسیدان ها و سنجش آنها

در سیستم های زیستی حداقل ٤ منبع عمومی آنتی اکسیدانی وجود دارد.

۱- آنزیم ها: برای مثال سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز
۲- مولکول های بزرگ (آلبومین، سروپلاسمین، فریتین و دیگر پروتئین ها)
۳- مولکول های کوچک (آسکوربیک اسید، گلوتاتیون، اوریک اسید، توکوفرول ها، کاروتنوئیدها، پلی فنول ها)
٤- برخی هورمون ها (استروژن، آنژیوتنسین، ملاتونین و...)(Roland et al., 2005).

آنتی اکسیدان ها رادیکال ها را با دو مکانیزم مهم غیر فعال می‌کنند Hydrogen Atom Transfer (HAT) و Single Electron Transfer (SET).

مکانیزم انتقال الکترون کوپله شده با پروتون ممکن است به صورت موازی با HAT رخ دهد که مکانیزم غالب در یک سیستم توسط ساختار و ویژگی های آنتی اکسیدانت، انحلال پذیری، ضریب تجزیه و حلال سیستم تعیین می‌شود. انرژی تفکیک پیوند (BDE) و پتانسیل یونیزاسیون (IP) گروه های عاملی دو فاکتور مهمی هستند که قدرت تاثیر آنتی اکسیدانت هارا تعیین می‌کنند(Wright et al., 2001).

پلی فنول ها فعالیت چندگانه دارند و نوع فعالیت بسته به محیطی است که در آن قرار دارند بنابراین پروتوکل های سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی این مواد باید چندین ویژگی را اندازه گیری کنند. روش های سنجش آنتی اکسیدانی مبتنی بر HAT ،توانایی یک آنتی اکسیدان را برای از بین بردن رادیکال ها با دادن هیدروژن نشان می دهد. واکنش پذیری مربوطه در روش HAT توسط BDE گروه عاملی آنتی اکسیدان تعیین می شود. که برای اغلب این ترکیبات - ≈ ΔBDE 10Kcal/mol و ΔIP<-36Kcal/mol می باشد. واکنش های HAT معمولا مستقل از pH و حلال هستند ومعمولا خیلی سریع درچند ثانیه تا دقیقه رخ میدهند. وجود عوامل کاهنده، شامل فلزات در سنجش های مبتنی بر HAT مشکل ایجاد می کنند(Wright et al., 2001).

مکانیزم های SET وHAT تقریبا همیشه در همه نمونه ها باهم رخ می‌دهند که تعادل یا بالانس این دو واکنش به وسیله ساختار آنتی اکسیدانی و PH مشخص می‌شود. واکنش پذیری مربوطه در روشSET اصولا بر دپروتونه شدن(Lernanska et al., 2001) و پتانسیل یونیزاسیون گروه های عاملی واکنش گر مبتنی است بنابراینSET به pH وابسته است. عموماIP با افزایش pH کاهش می‌یابد که بازتاب دهنده افزایش ظرفیت الکترون دهی با دپروتونه شدن می‌باشد. این واکنش ها آهسته اند و برای کامل شدن نیاز به زمان بیشتری دارند. فلزات با این روش تداخل می کنند و می‌توانند موجب تغییرات زیاد و ثبات کمتر نتیجه شوند(Wright et al., 2001).

۱-۷ اسیدهای چرب

۱-۷-۱ ساختار اسیدهای چرب

چربی ها و روغن ها اشکال ذخیره ای اصلی انرژی در اکثر ارگانیسم ها هستند.

چربی ها و روغن هایی که به طور نسبتا رایج به منظور ذخیره انرژی به کار رفته اند، مشتقات اسید های چرب می باشند. اسید های چرب مشتقات هیدروکربن با سطح پایین اکسیداسیون (یعنی شدیدا احیا) همانند هیدروکربن های موجود در سوخت های فسیلی هستند.

اسیدهای چرب اسید های کربوکسیلیک با زنجیره های هیدروکربنی به طول ٤تا ٣٦ کربن (C_4تاC_{36}) هستند. در برخی اسیدهای چرب ، این زنجیره بدون شاخه وکاملا اشباع می‌باشد(فاقد پیوند دوگانه)، در بقیه موارد حاوی یک یا چند پیوند دوگانه است. تعداد کمی از اسیدهای چرب ، شاخه های حاوی حلقه های سه کربنی، گروه های هیدروکسیل، یا گروههای متیل دارند(Lehninger., 2008).

۱-۷-۲ نام گذاری اسیدهای چرب

در نام گذاری استاندارد شماره۱ به کربن کربوکسیل(c-1) و شماره ۲ به کربن α تعلق می گیرد.

موقعیت هریک از پیوندهای دوگانه توسط علامتΔ به همراه یک شماره در بالای آن نشان داده می‌شود که نشان دهنده کربنی دارای شماره کمتر در باند دوگانه است.

برای اسید چرب های دارای چند پیوند غیر اشباع یک قاعده فرعی وجود دارد که کربن ها را از جهت مخالف شماره گذاری کرده وشماره ۱ به کربن متیل انتهای زنجیره هیدروکربنی تعلق می‌گیرد.

این کربن به صورت کربن ω (آخرین حرف الفبای یونانی) مشخص می‌گردد و موقعیت پیوندهای دوگانه نسبت به کربن ω مشخص می شود.

اسیدهای چرب دارای چند پیوند غیر اشباع PUFAs که دارای پیوند دوگانه بین سومین و چهارمین کربن از انتهای متیل زنجیره هستند اهمیت خاصی در تغذیه انسان دارند و امگا۳ نامیده می‌شوند.

آلفا لینولئیک یک اسید چرب امگا۳ می‌باشد که بدن می تواند ۲ اسید چرب امگا۳ دیگر (ایکوزاپنتاانوئیک اسید و دوکوزاهگزاانوئیک اسید) که دارای فعالیت سلولی مهمی هستند را از آن سنتز کند.

عدم تعادل دراسید چرب هایPUFAs امگا۳ وامگا ٦ در رژیم غذایی با افزایش خطر بیماری های قلبی ارتباط دارد.

نسبت غذایی بهینه امگا ۳ به امگا ٦ بین ۱:۱تا٤:۱ است اما متاسفانه این نسبت در افراد جامعه به ۱۱:۱ تا ۳۰:۱ می‌باشد. یعنی مصرف امگا ٦ در اغلب افراد ۳۰ برابر امگا ۳ می باشد(Lehninger., 2008).