DOI: 10.22059/ijbse.2019.281491.665188 مهندسی بیوسیستم ایران، دوره ۵۰، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۸ (ص ۸۷۲-۸۶۳)

Study of Fatty Acids Profile, Antioxidant Activity Properties and Polyphenol Compounds of Loquat Leaf

ZOHREH GOLMOHAMADI[1], MARYAM JALILI[2], LADAN RASHIDI[2*]

1. Department of Food Science and Technology, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University of Tehran. Tehran, Iran

2. Food and Agriculture Department, Faculty of Food Science and Technology, Standard Research Institute, Alborz, Iran.

(Received: June. 15, 2019- Revised: July. 29, 2019- Accepted: Aug. 25, 2019)

ABSTRACT

In this study, loquat leaf from Gilan province was analyzed in terms of fatty acids profile, total phenol content, total flavonoids, total tannin, antioxidant activity, type and amount of polyphenol content. Results showed the maximum amounts of unsaturated fatty acids of loquat leaf belonged to linolenic acid (25.3 ± 0.15%), oleic acid (18 ± 0.01%) and linolenic acid (9.7 ± 0.15%), respectively. Total phenol content and total tannin of leaf extract of loquat were, respectively, obtained 171.45 ± 0.55, 3.41 ± 0.22 mg gallic acid/ g dry matter. Total flavonoid content was obtained 790.4 ± 0.86 mg quercetin per g dry matter and antioxidant activity was 92.11 ± 1.10%. According to high-pressure liquid chromatography (HPLC), caffeic acid had the highest amount of polyphenol compound detected in loquat leaf. Loquat leaf can be consumed as a rich source of antioxidant (such as herbal drink).

Keywords: Loquat, Total flavonoid, Total phenol, Caffeic acid

*Corresponding Author's Email: l.rashidi@standard.ac.ir

بررسی پروفایل اسیدهای چرب، خواص آنتی اکسیدانی و ترکیبات پلی فنلی برگ ازگیل ژاپنی

زهره گل محمدی[۱]، مریم جلیلی[۲]، لادن رشیدی[۲*]

۱. گروه علوم وصنایع غذایی، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران،ایران

۲. گروه پژوهشی غذایی و کشاورزی، پژوهشکده غذایی و کشاورزی، پژوهشگاه استاندارد، البرز، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۳/۲۵- تاریخ بازنگری: ۱۳۹۸/۵/۷- تاریخ تصویب: ۱۳۹۸/۶/۳)

چکیده

در این پژوهش، برگ درخت ازگیل ژاپنی از گیلان به منظور تعیین پروفایل اسیدهای چرب، مقدار فنل کل، فلاونوئید کل، تانن کل، فعالیت آنتی اکسیدانی و نوع و مقدار ترکیبات پلی فنلی مورد بررسی و آنالیز قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیشترین اسیدهای چرب غیراشباع موجود در برگ ازگیل ژاپنی، به ترتیب، اسید لینولنیک (۰/۱۵ ۳/۲۵± درصد)، اولئیک (۰/۰۱ ۰/۱۸± درصد) و لینولئیک (۰/۱۵ ۷/۹± درصد) بود .محتوای فنل کل و تانن کل عصاره برگ ازگیل ژاپنی، به ترتیب، مقدار ۰/۵۵ ±۱۷۱/۴۵، ۰/۲۲ ±۳/۴۱ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم ماده خشک، محتوای فلاوونوئید۰/۸۶ ۴۰/۷۹۰± میلی گرم کوئرستین بر گرم ماده خشک و مقدار فعالیت آنتی اکسیدانی با استفاده از آزمون DPPH، ۱/۱۰ ۱۱/۹۲± بوده است. با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، مشاهده شد که کافئیک اسید بیشترین مقدار ترکیب پلی فنلی شناسایی شده در برگ ازگیل ژاپنی بوده است. برگ ازگیل ژاپنی منبع غنی از امگا ۳ است. برگ ازگیل را می‌توان به عنوان منبع غنی از آنتی‌اکسیدان مورد مصرف خوراکی (مانند دمنوش گیاهی) قرار داد.

واژه های کلیدی : ازگیل ژاپنی، فلاونوئید کل، فنل کل، کافئیک اسید

مقدمه

گیاهان معمولاً در صنایع داروسازی به عنوان مواد خام برای عصاره‌گیری ترکیبات فعال و پیش سازهای شیمیایی و همچنین برای تولید عصاره های مایع جهت داروها، چای و پودرها به کار می روند که این پودرها از گیاه کامل و یا عصاره خشک شده آن‌ها حاصل می‌شود (Ghasemzadeh, 2011).

ازگیل ژاپنی با نام علمی *Eriobotrya japonica* و نام انگلیسی *Loquat, Japanese medlar, Chinese*plum یک درخت میوه نیمه گرمسیری مهم متعلق به خانواده *Rosaceae*، زیرخانواده *Pomoideae* است (Radha &Mathew, 2007). درخت میوه ازگیل ژاپنی که با نام های گلابی جنگلی و یا گلابی وحشی نیز شناخته می شود، یک درخت همیشه سبز، بومی نواحی نیمه گرمسیری با برگ‌های کشیده براق است که هم در باغ‌های میوه درخت محبوبی است و هم به دلیل جلوه زیبا، زینت بخش باغچه ها و باغ‌های بزرگ است (Gong *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 1999; Ichinose, 1995).

میوه این درخت نارنجی رنگ، شبیه به زالزالک و دارای تعداد زیادی بذر قهوه‌ای رنگ براق است که معمولاً در بهار برداشت می شود. ازگیل ژاپنی در آفتاب کامل و/ یا نیمه سایه قادر به رشد است و آبیاری آن باید به طور منظم انجام شود و از طریق کاشت بذر می‌توان آن را تکثیر نمود (Morton, 1987; Lin *et al.*, 1999). این درخت دارای برگ های متناوب، ساده، چرمی، دندانه‌دار درشت؛ دمبرگ کوتاه؛ گل های کوچک، و سفید، در هرمی گسترده می‌باشد و معمولاً نوع نابالغ آن پشمالو و خوشه خوشه است که دارای برگچه تخم مرغی، مداوم، غلاف گل ۵ لوبی، تیز، مقاوم، ۵ گلبرگی، تخم مرغی تا تقریبا گرد، و چنگال دار است. میوه آن تخم مرغی کروی، و دارای دانه های (۱- ۹ عدد) بزرگ است (Lin *et al.*, 1999). برگ های همیشه سبز ازگیل ژاپنی به طول ۵ تا ۱۲ اینچ (۳۰/۵-۱۲ سانتیمتر) و عرض ۳ تا ۴ اینچ (۱۰/۵-۷ سانتی متر) است و به طور عمده در نوک شاخه‌ها به شکل مارپیچی، بیضوی و نیزه‌ای بوده که به صورت مجتمع بر شاخه می‌رویند؛ ساده، متناوب و کمی دندانه‌دار هستند و سطح آنها شیاردار است. برگ‌های تازه روییده آن سبز کمرنگ بوده و در کنار برگ‌های مسن‌تر و تیره‌تر جلوه چشم نوازی به این درخت می‌بخشند. از برگ این درخت دمنوشی که دارای خواص درمانی است، تولید می‌شود (Zhang *et al.*, 2015). اثرات مختلف دارویی و سلامتی عصاره برگ،گل، دانه و مغز ازگیل ژاپنی در مدل‌های تجربی مختلفی از جمله خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهاب، ضددیابت، ضدسرطان، و محافظت از دستگاه گوارش بررسی شده است (Zhang *et al.*, 2015). همچنین دم‌کرده برگ،

*نویسنده مسئول: l.rashidi@standard.ac.ir

برگ خشک شده آن یا پودر برگ برای از بین بردن اسهال و افسردگی و برای مقابله با مسمومیت ناشی از مصرف مشروبات الکلی به کار برده می‌شود (Morton, 1987). همچنین گزارش شده است که عصاره برگ ازگیل ژاپنی دارای خواص آنتی‌اکسیدانی خوب و ضد کلسترول بالا و عامل مهمی در کمک به فعالیت آنتی بیوتیک‌ها است (Singh *et al*., 2010). در چین یک فرمول ترکیبی، متشکل از تعدادی از گیاهان از جمله برگ ازگیل ژاپنی تهیه شده است که به عنوان یک داروی سنتی برای درمان بیماران مبتلا به سل ریوی استفاده می‌شود (Zhang *et al*., 2004). برگ ازگیل ژاپنی به عنوان یک داروی خلط‌آور و ضد التهاب شناخته شده (Hamada *et al*., 2004) و برای درمان بیماری‌های پوستی و از بین بردن درد (Sakuramata *et al*., 2004)، التهاب (Nishioka *et al*., 2002) و سرفه (Sakuramata *et al*., 2004) استفاده می‌شود (Lin *et al*., 1999). برگ ازگیل ژاپنی دارای اسید اورسلیک[1] و اسید اولئانولیک[2] است که هر دوی آنها دارای خواص هایپوگلایسمی[3] (کاهش قند خون) آنتی هایپرلیپیدمی[4] (ضد چربی خون بالا) هستند (Azhar, 2009). همچنین حاوی مواد ضد سرطان (Ito *et al*., 2002) و علاوه بر این دارای خواص ضد دیابتی (Sakuramata *et al*., 2004) است. در یک پژوهش، اثرات ضد التهابی و مکانیسم مولکولی چای ازگیل ژاپنی[5] مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که ترکیبات شیمیایی عصاره چای ازگیل ژاپنی متفاوت از ترکیبات آن در برگ‌های تازه است. همچنین فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و خصوصیات شیمیایی چای ازگیل ژاپنی در شرایط آزمایشگاهی نشان داد که چای ازگیل ژاپنی اثر ضد التهابی و عاملی برای بیماری ورم پنجه در موش‌ها داشته است (Khine Zar *et al*.,2014). از سوی دیگر گزارش شده است که عصاره گل گیاه ازگیل ژاپنی و ورزش می‌تواند سبب افزایش مقاومت عصبی در مقابل استرس ناشی از تزریق درون بطنی۶-هیدروکسی دوپامین در موش آزمایشگاهی شده و می‌تواند نقش حفاظت‌کننده‌ای در برابر بیماری پارکینسون داشته باشد (Fallah- Mohammadi *et al*., 2014). بر اساس نتایج حاصل از تحقیق انجام شده روی پلی ساکارید میوه و هسته ازگیل ژاپنی گزارش شد که توانایی ضد اکسایشی پلی‌ساکارید میوه ازگیل ژاپنی بیشتر از هسته آن بوده و پلی‌ساکاریدهای آن را می‌توان برای بهبود کیفیت مواد غذایی به کار برد (Hemmatyar *et al*., 2017). در یک پژوهش بیست نژادگان میوه ازگیل ژاپنی از مناطق مختلف شهر گرگان در استان گلستان مورد مطالعه قرار گرفت و میزان فنول کل، فلاونوئید کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آنها تعیین شد.

نتایج حاکی از مقادیر بالای ترکیبات بیوفنلی و ضداکسایشی حاصل از متابولیت‌های ثانویه در میوه ازگیل بوده که می‌تواند در صنایع غذایی و دارویی مورد توجه قرار گیرد (Rahimkhani *et al*., 2017).

در این پژوهش، برگ ازگیل ژاپنی از درختان واقع در شمال ایران، شهرستان گیلان، نمونه‌برداری شد. سپس عصاره متانلی برگ ازگیل ژاپنی استخراج شده و فعالیت آنتی‌اکسیدانی، مقدار و نوع ترکیبات پلی فنلی، فنل کل، میزان فلاونوئیدهای کل و تانن کل آن مورد آزمون قرار گرفت و از سوی دیگر، پروفایل اسیدهای چرب برگ ازگیل ژاپنی مورد شناسایی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی به کار رفته در آزمون‌ها

برگ ازگیل ژاپنی از منطقه شمالی ایران واقع در منطقه گیلان و به صورت انتخابی تهیه شد. استونیتریل ۹۹/۹۹ درصد، ارتوفسفریک اسید ۸۵ درصد و متانول ۹۹/۹۹ درصد با درجه خلوص مناسب کروماتوگرافی از شرکت علمی تحقیقاتی Fisher (Lisbon, Portugal) و معرف تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) و استانداردهای وانیلیک اسید، اولئوروپین، تیروزول، سینامیک اسید، لوتئین، کاتچین، گالیک اسید و فرولیک اسید از شرکت Sigma-Aldrich (امریکا) خریداری شدند.

مابقی مواد مانند هگزان نرمال، استونیتریل (ACN)، کلروفرم، یدید پتاسیم (KI)، پتاسیم هیدروکسید، سولفات سدیم، فولین سیو کالتیو، سدیم تیوسولفات، نشاسته، محلول هانوس، کلرید آلومینیوم ۶ آبه و کوئرستین از شرکت مرک آلمان خریداری شدند.

نمونه‌برداری برگ‌ها

در این پژوهش نمونه‌های اتفاقی از برگ‌های جوان درخت ازگیل ژاپنی (سالم و بدون هر گونه آسیب و زخم خوردگی) از منطقه شمالی ایران با عرض جغرافیایی ۳۴/۳۶° تا ۳۸/۲۷° شمالی و طول جغرافیایی۵۳/۴۸° تا ۳۴/۵۰° شرقی تهیه شده و پس از

1. Ursolic
2. Oleanolic
3. Hypoglycaemic
4. Antihyperlipidaemic

۵ .چای ازگیل ژاپنی از جوشاندن برگ تازه و برشته شده ازگیل ژاپنی در ۳۵۰ درجه سلسیوس و به مدت ۳۰ دقیقه در ظرف سرامیکی به دست می‌آید که امروزه به عنوان نوشیدنی برای سلامتی در ژاپن استفاده می شود.

شست و شو با آب، در دمای محیط (۲۵ درجه سلسیوس)، در مدت زمان ۴۸ الی ۶۰ ساعت، خشک شدند. برگ‌های خشک شده توسط آسیاب برقی به پودر تبدیل شده و سپس از الکی با مش ۸۰ عبور داده شدند تا پودر ریز و یکنواختی به دست آید.

اندازه‌گیری اسید های چرب

تهیه متیل استرهای اسیدهای چرب و تعیین پروفایل اسیدهای چرب برگ ازگیل ژاپنی طبق INSO. No. 14880 انجام شد. به این منظور از دستگاه کروماتوگرافی گازی مدل YUNG Lin 6500 ساخت کشور کره جنوبی مجهز به آشکارساز یونش شعله استفاده شد. ستون مورد استفاده CP-Sil88 به طول ۶۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت ۰/۲۵ میکرومتر از شرکت Suplco خریداری شد. دمای تزریق‌کننده در ۲۸۰ درجه سلسیوس و دمای آشکارساز در ۳۰۰ درجه سلسیوس تنظیم شد. همچنین آون با برنامه گرادیانی، ابتدا در دمای ۱۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه و با سرعت ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه به دمای ۲۱۰ درجه سلسیوس رسید و در این دما به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد. گاز حامل هیدروژن و شدت جریان آن ۳۶ سانتیمتر بر ثانیه، سامانه تزریق شکافت (دوقسمتی) با نسبت ۱ به ۵۰ بود.

متیلاسیون برگ ازگیل ژاپنی

یک گرم پودر برگ خشک شده ازگیل ژاپنی با دقت وزن شده و در ویال شیشه‌ای با ۶ میلی‌لیتر هگزان و ۲ میلی‌لیتر پتاس متانولی ۲ مولار مخلوط شد و سپس مخلوط به خوبی تکان داده شد. سپس محتویات ویال به مدت ۱۵ دقیقه در حمام فراصوت ده با فرکانس ۶۰ کیلوهرتز (S60H, Elmasonic، آلمان)، بدون آنکه حرارت افزایش یابد، قرار داده شد. سپس سانتریفیوژ شده و فاز رویی (مایه سبز رنگ تیره) جدا شد (برای آبگیری مقداری سولفات سدیم اضافه شد).

پس از آن مقدار ۱ میکرولیتر از فاز شفاف رویی به منظور شناسایی اسیدهای چرب موجود در برگ ازگیل به دستگاه کروماتوگرافی گازی مجهز به آشکارساز یونیزاسیون شعله تزریق شد (INSO. No. 13126-4 & 13126-2).

استخراج ترکیبات بیوفنلی موجود در برگ ازگیل

استخراج بیوفنل‌ها از برگ با توجه به INSO. No. 16323 (روش اندازه‌گیری بیوفنل‌ها به وسیله کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا) انجام شد. به این منظور، به ۵ گرم پودر برگ خشک شده، ۱۰ میلی لیتر حلال متانل: آب (۸۰:۲۰) اضافه شد. سپس ظرف حاوی نمونه داخل حمام فراصوت ده قرار گرفت. پس از صاف کردن، مایع سبز رنگ تیره‌ای به دست می‌آید و فاز الکلی (حلال) توسط دستگاه خشک‌کن تحت خلاء (Memmert، آمریکا)در دمای ۳۰ درجه سلسیوس از عصاره جدا شد.

شرایط عملیاتی دستگاه HPLC

حلال‌های استفاده شده، به ترتیب، حلال A، آب و ۰/۲ درصد H_2PO_4 و حلال B استونیتریل و متانول است. دستگاه HPLC (کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا) مورد استفاده یانگ لین کره جنوبی، مدل ۹۱۰۰ و ستون (ستون: ۴/۶ میلی‌متر × ۲۵۰ میلی‌متر× ۱۰۰ آنگستروم، ۵ میکرومتر) C18-WP بود. این روش بر پایه استخراج مستقیم ترکیبات جزیی بیوفنولی قطبی از عصاره برگ ازگیل با استفاده از محلول متانول بوده، که توسط HPLC مجهز به آشکارساز UV در طول موج ۲۸۰ نانومتر شناسایی و اندازه‌گیری می‌شود. برنامه دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا در جدول ۱ ارائه شده است:

جدول ۱- برنامه حلال دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

زمان	A	B
اولیه	۹۶	۴
۴۰	۵۰	۵۰
۴۵	۴۰	۶۰
۶۰	۰	۱۰۰
۷۰	۰	۱۰۰
۷۲	۹۶	۴
۸۲	۹۶	۴
۸۵	۹۶	۴

محلول A: آب + ۰/۲ درصد اسید ارتوفسفریک، محلول B: استونیتریل + متانول ۵۰:۵۰

اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیبات فنلی موجود در برگ

اندازه‌گیری توانایی عصاره در مهار رادیکال های آزاد، طبق روش Arabshahi & Urooj (2007) انجام شد. به این صورت که ۱ میلی‌لیتر از محلول متانولی DPPH (با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار) به ۳ میلی لیتر از عصاره (با غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) افزوده شده و مخلوط به دست آمده به شدت هم زده شد. لوله‌های آزمایش به مدت ۳۰ دقیقه در محل تاریکی قرار داده شدند. بعد از این مدت میزان جذب با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (پرکین المر Lambda 25، آمریکا) در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد.

لازم به ذکر است که در نمونه کنترل، عصاره با ۳ میلی‌لیتر متانول جایگزین شده و در نهایت درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH توسط عصاره از طریق فرمول (۱) محاسبه شد.

(Ac و As به ترتیب جذب کنترل و جذب نمونه می‌باشند)

(رابطه ۱) $(Ac-As) / Ac \times 100$ = درصد مهار رادیکال آزاد

آماده سازی عصاره برای اندازه گیری فنل کل، تانن کل و فلاوونوئید کل

به این منظور مقدار ۱ گرم برگ و ۵۰ میلی لیتر از حلال متانول آبی ۸۰ درصد برای استخراج فنل کل، تانن کل و ترکیبات فلاوونوئیدی کل در مدت زمان ۶۰ دقیقه و دمای۹۰ درجه سلسیوس استفاده شد. همچنین شفاف‌سازی عصاره با استفاده از سانتریفیوژ در ۱۹۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه (Beckman، سوئیس) در دمای ۴ درجه سلسیوس برای استخراج ترکیبات فنلی و تانن کل انجام شد و در انتها مایه شفاف رویی جدا شد. لازم به ذکر است که برای استخراج ترکیبات فلاوونوئیدی، از سانتریفیوژ با ۹۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد. سپس مایع شفاف رویی به دست آمده با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر جمع آوری شد، و بلافاصله به قسمت های مساوی (هر کدام ۵۰۰ میکرولیتر) تقسیم شده و در۲۰- درجه سلسیوس تا زمان استفاده ذخیره شد (Mohammed & Manan, 2015).

تعیین محتوای فنل کل (TPC)[1]

محتوای فنل کل از روش Mohammed & Manan (2015) با استفاده از روش رنگ سنجی تعیین شد. ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره متانولی برگ، ۸۰۰ میکرولیتر آب مقطر، با ۱۰۰ میکرولیتر از معرف فولین-سیوکالتیو (Folin-Ciocalteu) مخلوط شده و به مدت ۳ دقیقه در دمای اتاق گرمخانه گذاری شد. ۳۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم (Na_2CO_3) (۲۰ درصد وزنی/حجمی) به مخلوط اضافه شده و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق در تاریکی گرمخانه‌گذاری شد. سپس جذب با استفاده از اسپکتروفتومتر UV-VIS (پرکین المر Lambda 25، آمریکا) در طول موج ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. نمونه شاهد با آب مقطر به جای عصاره تهیه شد. قبل از شروع آزمون منحنی استاندارد گالیک اسید از ۲۰۰-۰ میلی گرم برمیلی لیتر گالیک اسید در اتانول به دست آمد (شکل ۲-الف). محتوای فنل کل به صورت میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم ماده خشک بیان شد. آزمون هر دو نمونه و استاندارد در سه تکرار انجام می‌شود (Mohammed & Manan, 2015).

تعیین محتوای تانن کل (TTC)[2]

محتوای تانن با استفاده از روش فولین- سیوکالتیو مشخص شد. به این منظور ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره آبی به ۷۵۰ میکرولیتر آب مقطر و ۵۰۰ میکرولیتر معرف فولین- سیوکالتیو و ۱۰۰۰ میکرولیتر از کربنات سدیم (Na_2CO_3) ۳۵ درصد اضافه شد. مخلوط بعد از رقیق کردن با ۱۰ میلی لیتر آب مقطر به شدت تکان داده شد. مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق گرمخانه گذاری شد و جذب آن در ۷۲۵ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر UV-VIS خوانده شد. آب مقطر به عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفت. محلول استاندارد گالیک اسید با توجه به توضیحات بالا آماده شد. محتوای کل تانن به عنوان میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم ماده خشک بیان گردید و بر اساس منحنی استاندارد تهیه شده از نسبت ۰ - ۱۰۰ میلی گرم بر اسید گالیک، محاسبه شد (Mohammed & Manan, 2015).

تعیین محتوای فلاوونوئیدهای کل (TFC)[3]

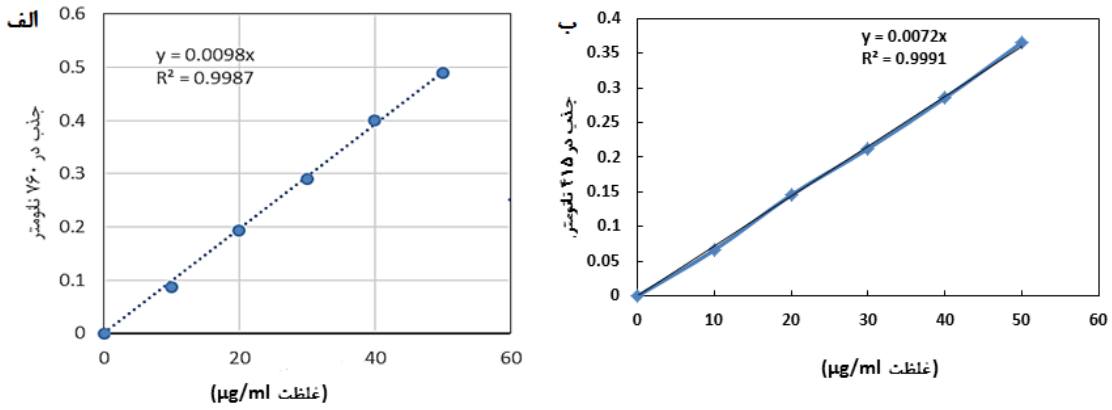
محتوای فلاوونوئید کل با استفاده از تجزیه و تحلیل رنگی تعیین شد. به این منظور مخلوطی از ۲۰۰ میکرولیتر عصاره و ۱۵۰ میکرولیتر از نیتریت سدیم ($NaNO_2$) (۵ درصد وزنی/حجمی)، به مدت ۶ دقیقه در دمای اتاق گرمخانه‌گذاری شد. در مرحله بعد، ۱۵۰ میکرولیتر از کلرید آلومینیوم شش آبه ($AlCl_3$ $6H_2O$) (۱۰ درصد وزنی/حجمی) اضافه شده و به مدت ۶ دقیقه در دمای اتاق گرمخانه‌گذاری شد. سپس۸۰۰ میکرولیتر محلول سود (۱۰ درصد وزنی/حجمی) به آن اضافه شده و در دمای اتاق به مدت ۱۵ دقیقه گرمخانه‌گذاری شد. برای شاهد، عصاره با آب مقطر جایگزین می‌شود.

جذب با استفاده از اسپکتروفتومتر UV-VIS در ۵۱۰ نانومتر خوانده می‌شود. منحنی استاندارد کوئرستین با استفاده از غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کوئرستین در اتانول ۸۰ درصد (به عنوان محلول مادر) و تهیه غلظت های ۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از محلول مادر به دست آمد (شکل ۱– ب). محتوای فلاونوئیدهای کل بر حسب میلی‌گرم کوئرستین معادل (QE) بر گرم ماده خشک بیان می‌شود (Mohammed & Manan, 2015).

آنالیز آماری

آزمایشات این پژوهش در سه تکرار انجام شد. نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS مورد بررسی قرار گرفت و مقایسه میانگین داده‌ها به وسیله آزمون دانکن در سطح ۱ درصد انجام شد. شکل‌ها به وسیله نرم افزار اکسل ۲۰۱۰ رسم شدند و نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شدند. تجزیه و تحلیل هر نمونه در ۳ تکرار انجام شد.

1. Total Phenol Content
2. Total Tannin Content
3. Total Flavonoid Content



شکل ۱- منحنی‌های کالیبراسیون الف) گالیک اسید، ب) کوئرستین

نتایج و بحث

پروفایل اسیدهای چرب به دست آمده از برگ ازگیل ژاپنی در جدول ۲ آورده شده است. نتایج بیان‌گر آن است که اسید چرب غالب در برگ ازگیل ژاپنی، اسید پالمیتیک است. ضمن آنکه اسید چرب چند غیراشباع غالب نیز اسید لینولنیک به میزان ۰/۱ ± ۲۵/۳۰ درصد تخمین زده شد. میزان اسیدهای چرب چند غیر اشباعی (PUFA)[1] برگ گیاه ازگیل به مقدار ۳۵ درصد بود. از سوی دیگر مجموع اسیدهای چرب اشباع به دست آمده (SFA)[2]، ۳۹/۱۳ درصد و اسیدهای چرب تک غیر اشباع (MUFA)[3] ۲۸/۷ درصد به دست آمد. نسبت MUFA/PUFA حدود ۰/۸۲ به دست آمد. پروفایل اسید چرب این برگ نشانگر غنی بودن چربی آن از اسید لینولنیک یا امگا تری است. نتایج حاصل تاییدکننده آن است برگ ازگیل ژاپنی منبع مناسبی از اسیدهای چرب ضروری است.

جدول ۲- ترکیب اسیدهای چرب برگ ازگیل ژاپنی

اسید چرب	(%)	اسید چرب	(%)
C12:0	۰/۰۵ ± ۰/۱۳	C18:2c	۰/۱۵± ۹/۷۰
C14:0	۰/۰۱ ± ۱/۹۰	C18:3 n-3,9C,12C,15t	۰/۱۵± ۲۵/۳۰
C14:1 t	۰/۰±۲۰/۰۲	C20:0	۰/۰۵± ۰/۵۰
C14:1 c	۰/۰۱± ۰/۸۰	C20:1	۰/۰۵± ۰/۵۰
C16:0	۰/۱۵± ۳۱/۲۰	C22:0	۰/۰۱± ۰/۳۰
C16:1 c	۰/۱۵ ± ۱/۴۰	C24:0	۰/۰۱± ۱/۰۰
C17:0	۰/۰۵± ۰/۷۰	C24:1c	۰/۰۱± ۶/۹۰
C17:1 c	۰/۰۵± ۰/۴۰	SFA	۳۹/۱۳
C18:0	۰/۱۵± ۳/۹۰	MUFA	۲۸/۷۰
C18:1 c	۰/۰۱± ۱۸/۰۰	PUFA	۳۵/۰۰

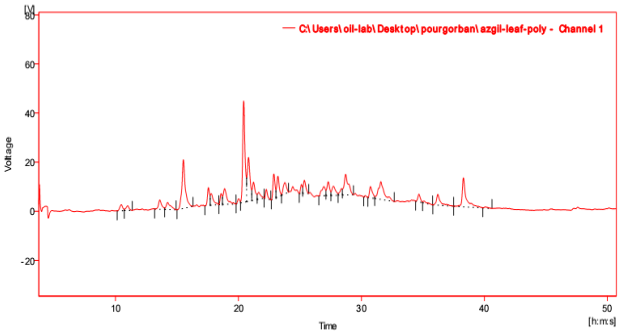
از سوی دیگر، ساختار اسیدهای چرب برگ ازگیل ژاپنی تا حدودی شبیه به ساختار اسیدهای چرب به دست آمده از برگ گیاه برگ بو، *Laurus nobilis*، است. اسیدهای چرب غالب در گیاه برگ بو نیز اسید لینولنیک (C18:3)، پالمیتیک (C16:0) و پالمیتولئیک (C16:1)، به ترتیب، مقادیر ۲۵/۹۵، ۲۱/۲۵ و ۱۶/۴۹ درصد گزارش شده است. همچنین میزان اسیدهای چرب چند غیر اشباعی (PUFA) برگ گیاه برگ بو به دلیل مقدار بالای اسید لینولنیک و پالمیتولئیک آن، به مقدار ۴۰/۲۱ درصد بود. همچنین اسیدهای چرب اشباع (SFA) و تک غیر اشباع (MUFA) آن، به ترتیب، مقادیر ۲۹/۸۸ و ۲۹/۸۶ درصد است. از مقایسه پروفایل اسیدهای چرب برگ بو و ازگیل ژاپنی می‌توان دریافت که مقدار لینولنیک اسید در برگ بو و ازگیل ژاپنی شایان توجه بوده و هر دو سرشار از امگا ۳ هستند (Nematshah *et al.*, 2016).

در این پژوهش اسید لینولنیک (امگا ۳) به مقدار قابل توجه ۲۵/۳ درصد در برگ ازگیل به دست آمد که به طور عمده در دانه‌ها و مغزها از جمله تخم کتان و شاهدانه، روغن ماهی و به طورکلی ماهی‌های چرب مثل قزل آلا، ماهی آزاد، کپور و غیره وجود دارد. اسید لینولئیک (امگا ۶) در انواع روغن‌های نباتی مثل آفتابگردان و اسید اولئیک (امگا ۹) به وفور در روغن زیتون و مغزها مثل گردو، بادام، پسته، فندق و تخمه‌های آجیلی مثل تخمه آفتابگردان و تخمه کدو و .... وجود دارد. اسید اولئیک خطر سکته قلبی و گرفتگی عروق را کاهش داده و از بروز سرطان جلوگیری می‌کند که مقدار آن در عصاره برگ ازگیل ژاپنی در حدود ۱۸ درصد به دست آمد. همچنین ترکیبات اسید چرب برگ ازگیل ژاپنی قابل مقایسه با پروفایل اسیدهای چرب برگ گیاه خرفه در دو استان ایران می باشد که در آنها نیز اسیدهای چرب

1.Poly Unsaturated Fatty Acid
2. Saturated Fatty Acid
3. Mono unsaturated Fatty Acid

غالب، اسید پالمیتیک و اسید لینولنیک است. میزان اسید لینولنیک به دست آمده از برگ گیاه خرفه شمال ۴۴/۱۷ درصد و در نمونه خرفه جنوب ۴۴/۳۷ درصد به دست آمده است که در مقایسه با برگ ازگیل ژاپنی دارای مقدار بیشتری است. همچنین میزان اسید پالمیتیک به دست آمده از خرفه منطقه شمالی در حدود ۲۳/۷۵ درصد و میزان آن در خرفه جنوب ۳۰/۹۳ درصد بوده است که نزدیک به مقدار به دست آمده از برگ ازگیل ژاپنی است (Afshar *et al.*, 2015).

کروماتوگرام ترکیبات پلی فنلی شناسایی شده در برگ ازگیل ژاپنی در شکل ۲ آورده شده است. همچنین درصد ترکیبات پلی فنلی موجود در برگ ازگیل ژاپنی در جدول ۳ ارائه شده است. با توجه به نتایج به دست آمده مشاهده شد که کافئیک اسید (۲۶/۳۶ درصد) بیشترین ترکیب پلی فنلی موجود در برگ ازگیل ژاپنی بوده است. کافئیک اسید یک آنتی اکسیدان مهم است که باعث افزایش قابلیت زنده‌مانی سلول‌ها شده و دارای اثرات محافظتی در برابر آسیب DNA ناشی از گونه های اکسیژن فعال (ROS) می‌باشد (Li *et al.*, 2015).



شکل ۲- کروماتوگرام ترکیبات پلی فنلی عصاره اتانولی برگ ازگیل ژاپنی

جدول ۳- ترکیب درصد ترکیبات پلی فنلی شناسایی شده در برگ ازگیل ژاپنی

پلی فنل های برگ	درصد
گالیک اسید	۰/۱۰ ± ۲/۰۰
کاتچین	۰/۲۰ ± ۵/۰۰
کافئیک اسید	۰/۱۵ ± ۲۶/۳۶
وانیلین	۰/۲۰ ± ۹/۸۰
سینرجیک اسید	۰/۱۵ ± ۱/۴۳
وانیلیک اسید	۰/۱۰ ±۳/۱۰
پی - کوماریک اسید	۰/۲۵ ± ۴/۳۶
فرولیک اسید	۰/۳۰ ± ۲/۴۰
روتین	۰/۱۵ ± ۲/۲۶
ناشناخته‌ها	۰/۲۰ ± ۳۴/۲۶

بسیاری از گیاهان دارویی حاوی کافئیک اسید، در چین مانند Du Huo (*Angelica pubescens*) در طب سنتی، به عنوان یک درمان برای ورم مفاصل، کمر درد، و سرماخوردگی (Chen *et al.*, 1995) استفاده می‌شوند. همچنین گونه‌ای سرخس، *mariesiDavallia*، وجود دارد که در طب سنتی کره‌ای در درمان سرماخوردگی، درد عصبی (*neuralgia*)، سرطان معده، و در طب سنتی چین برای درمان کمر درد، روماتیسم، دندان درد، و وزوز گوش (Cui *et al.*,1990) استفاده می‌شود که سرشار از کافئیک اسید می‌باشد. همچنین در هند، ریشه‌های بوته همیشه سبز خاردار (*Carissa*) *spinarum*، به عنوان ملین و برای درمان روماتیسم استفاده می‌شود. کافئیک اسید در خانواده نعناع، بقولات، هفت بندیان، خاراشکنیان، سولاناسه، چاییان، چتریان و سنبل الطیبیان وجود دارد (Herrmann,1956).

کافئیک اسید به صورت محلول در آب سرد بوده و بیشتر به فرم سیس یافت می‌شود، زیرا بسیار به نور خورشید و ماوراء بنفش حساس بوده و فرم ترانس آن به سیس تبدیل می‌شود. مشتقات آن کلروژنیک اسید و ایزو کلروژنیک اسید است که در اثر نور خورشید و ماوراء بنفش ممکن است به lactone و aesculetin تبدیل می‌شوند.

منحنی‌های کالیبراسیون گالیک اسید و کوئرستین، در غلظت‌های مختلف، در شکل ۱ آورده شده است.

مقادیر محاسبه شده محتوای فنل کل، تانن کل و فلاوونوئیدهای کل برگ ازگیل ژاپنی، بر اساس معادلات به دست آمده از منحنی‌های کالیبراسیون ترسیم شده در جدول ۴ ارائه شده است.

محتوای فنل کل (TPC) و تانن کل به دست آمده از عصاره برگ ازگیل ژاپنی، به ترتیب، مقدار ۰/۵۵ ±۱۷۱/۴۵ و ۰/۲۲ ±۴۱/۳ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم ماده خشک به دست آمد. مقدار به دست آمده از این محتوا برای تعیین خواص آنتی اکسیدانی عصاره مهم می‌باشد (Mohammed & Manan, 2015). همچنین محتوای فلاوونوئید به دست آمده از عصاره برگ ازگیل ژاپنی ۰/۸۶±۷۹۰/۴۰ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم ماده خشک به دست آمد. فلاوونوئیدها ترکیباتی هستند که به طور طبیعی در مواد طبیعی یافت می شوند. نتایج بیان‌گر آن است که عصاره متانولی برگ ازگیل ژاپنی حاوی فنل کل مناسبی است. همچنین محتوای فنل کل میوه ازگیل ژاپنی در میان میوه‌جات انتخاب شده در حدود ۱۳/۱ ± ۱۹۹/۴ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم ماده خشک گزارش شد که از میزان به دست آمده در برگ ازگیل ژاپنی مقدار آن بیشتر بود (Lin & Tang , 2007). از سوی دیگر، در یک پژوهش میزان فعالیت ضد باکتریایی برگ گیاه ازگیل تعیین شد و نتایج نشان داد عصاره برگ ازگیل ژاپنی

بیشترین اثر مهارکنندگی و کشندگی باکتریایی را روی سوش *کلبسیلا پنومونیه* داشت. همچنین محتوای فنل کل ۱۰±۹۰ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم عصاره و میزان تانن تام ۴±۱۰ میلی‌گرم تانیک اسید بر گرم عصاره به دست آمد (Davoodi *et al.*, 2017). این در حالی است که میزان فنل کل و تانن کل برگ ازگیل ژاپنی در این پژوهش، به ترتیب، ۰/۵۵ ± ۱۷۱/۴۵ و ۰/۲۲ ± ۳/۴۱ تعیین شد. در یک پژوهش دیگر، میزان ترکیبات فنلی موجود در عصاره آبی، متانولی و استونی برگ زیتون دو واریته کرونایکی و روغنی بین ۰/۵۵±۱۰۵/۶۵ و ۶۰/۳۳±۱۹۶/۰ میلی‌گرم معادل اسید تانیک در گرم عصاره گزارش شد که قابل مقایسه با مقدار به دست آمده از برگ ازگیل ژاپنی است (Rafiei *et al.*, 2011). همچنین میزان ترکیبات فنلی به دست آمده از عصاره متانولی برگ زیتون واریته پرتغالی ۴۰/۱-۱۱/۷ میلی‌گرم تانیک اسید در هر گرم برگ گزارش شد و میزان ترکیبات فنولی عصاره‌های آبی برگ زیتون ترکیه ۳/۴ میلی گرم معادل تانیک اسید در گرم برگ گزارش شد که بسیار کمتر از مقدار به دست آمده از برگ ازگیل ژاپنی است (Silva *et al.*, 2006).

جدول ۴- ترکیبات پلی فنلی موجود در برگ ازگیل ژاپنی

آزمون	برگ ازگیل ژاپنی
محتوای فنل کل(میلی گرم گالیک اسید بر گرم ماده خشک)	۱۷۱/۰±۴۵/۵۵
محتوای تانن کل (میلی گرم گالیک اسید بر گرم ماده خشک)	۳/۰±۴۱/۲۲
محتوای فلاونوئید کل (میلی گرم کوئرستین بر گرم ماده خشک)	۷۹۰/۰±۴۰/۸۶
درصد فعالیت آنتی اکسیدانی	۹۲/۱±۱۱/۱۰

فلاوونوئیدها شناخته شده‌ترین گروه ترکیبات فنلی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی موجود در میوه‌ها، سبزی‌ها و سایر غذاهای گیاهی هستند. این ترکیبات نقش مهمی در خصوصیات تجاری، حسی و تغذیه‌ای محصولات کشاورزی دارند. میوه ها و سبزیجات پر رنگ منابع خوبی از ترکیبات فنولی، از جمله فلاونوئیدها و آنتوسیانین و کاروتنوئیدها هستند (Cieslik *et al.*, 2006; Sass-Kiss *et al.*, 2005). بیشترین محتوای فلاوونوئید کل در میان سبزیجات، در اسفناج سیلان در حدود ۱/۲±۱۳۳/۲۶ و در میوه ازگیل ژاپنی در حدود ۰/۹±۱۴/۲ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم ماده خشک گزارش شد که در مقایسه با مقدار به دست آمده از برگ ازگیل ژاپنی بسیار کمتر است (Lin & Tang, 2007). از سوی دیگر، در یک پژوهش میزان محتوای فلاوونوئیدی در برگ‌های سنجد استان خراسان رضوی بین ۰/۸۵ ± ۸ و ۱/۸۰ ± ۱۴/۸۱ اکی والان کوئرستین بر گرم ماده خشک و میزان فنل کل آن بین ۰/۰۸±۴/۰۳ و ۰/۲۰ ± ۶/۲۸ بر حسب گالیک اسید بر گرم ماده خشک گزارش شد (Seadatmand *et al.*, 2014). در بسیاری از مطالعات اپیدمیولوژیک، رابطه بین غذاهای غنی از فلاوونوئیدها (مانند چای، انواع توت‌ها، کاکائو، شکلات، و شراب) و بیماری‌های قلبی عروقی (CVD) و رابطه بین مصرف فلاوونوئید و خطر CVD را بررسی کرده‌اند. شواهد اپیدمیولوژیک و تجربی یک رابطه محافظت کنندگی بین مصرف مواد غذایی غنی از فلاوونوئیدها و خطر ابتلاء به CVD را نشان داده است. بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که فلاوونوئیدها اثرات محافظتی در برابر شروع و پیشرفت آترواسکلروز (*Atherosclerosis*) یا تصلب شرایین دارند (Seadatmand *et al.*, 2014).

تانن‌ها جزء گروه ترکیبات پلی فنولیک محلول در آب هستند که به طور طبیعی در غلات، حبوبات، دانه غلات و حبوبات و عمدتاً در بسیاری از میوه‌ها و سبزیجات یافت می‌شوند و باعث محافظت در برابر طیف گسترده‌ای از عوامل استرس زا می‌گردند. تانن‌ها همچنین دارای چندین اثر دارویی، از جمله آنتی‌اکسیدانی و جلوگیری از فعالیت‌های رادیکال آزاد و همچنین خواص ضد میکروبی، ضد سرطان، ضد تغذیه و خواص محافظت از قلب می‌باشند. آن‌ها همچنین دارای اثرات مفیدی روی اختلالات متابولیکی هستند و از بروز بیماری‌های مختلف مرتبط با استرس اکسیداتیو جلوگیری می‌کنند. مقدار فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ ازگیل ژاپنی ۱/۱ ±۹۲/۱۱ درصد با استفاده از آزمون DPPH به دست آمد.

بر اساس مطالعات متعدد، مصرف آنتی‌اکسیدان‌های غذایی باعث پیش‌گیری از بسیاری آسیب‌ها شامل انواع سرطان‌ها، بیماری‌های قلبی- عروقی و عصبی و اختلالات مربوط به افزایش سن می‌شود (Rafiei *et al.*, 2011). از سوی دیگر، میزان مهار رادیکال آزاد در عصاره آبی، متانولی و استونی برگ زیتون دو واریته کرونایکی و روغنی بین ۰/۵۵ ±۱۰۶/۶۵ و ۰۴۱/۵۸±۲۷۷/۰ گزارش شده است که مقدار به دست آمده از برگ ازگیل ژاپنی نیز در این محدوده است (Rafiei *et al.*, 2011).

نتیجه گیری کلی

امروزه با توجه به اثرات سوء مواد و داروهای شیمیایی، بسیاری از کشورهای دنیا، از جمله کشورهای پیشرفته در فکر تغییر الگوی مصرف داروها از شیمیایی به گیاهی شده‌اند به طوری‌که اکنون قریب به ۵۰ درصد از داروهای مصرفی در اروپا گیاهی است، در حالی‌که این رقم در کشور ما بسیار پایین است و همه محققان بایستی در پی راهی برای گسترش هرچه بیشتر صنایع دارویی بر پایه گیاهی باشند، تا این ضعف در کشور جبران شود. نتایج نشان داده است که گیاه ازگیل ژاپنی سرشار از امگا ۳ است لذا می‌تواند به عنوان منبع غنی از اسیدهای چرب غیراشباع ضروری مورد مصرف انسان قرار گیرد. همچنین با توجه به میزان ترکیبات فعال ثانویه (محتوای پلی فنلی و فلاوونوئیدی) به دست آمده از برگ ازگیل ژاپنی می‌توان آن را به عنوان یکی از منابع مهم دارای خواص آنتی اکسیدانی به شمار آورد. بنابراین با توجه به اینکه درختچه ازگیل ژاپنی یک درخت همیشه سبز می باشد و طی سال قابل دسترس است، می‌توان از آن به عنوان یک ماده خام با قیمت مناسب که غنی از ترکیبات پلی‌فنلی بوده و حاوی مقدار مناسبی از اسیدهای چرب لینولنیک (امگا -۳) است، آن را در تهیه داروهای خاص استفاده نمود و/ یا همانند برگ زیتون و سایر برگ‌های گیاهی در غنی سازی روغن‌های گیاهی به کار برده و/یا به عنوان دمنوش گیاهی مورد استفاده قرار داد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از سازمان ملی استاندارد، پژوهشگاه استاندارد، پژوهشکده غذایی و کشاورزی به دلیل فراهم نمودن تجهیزات و مواد شیمیایی مورد نیاز آزمون‌ها تشکر و قدردانی کرده، همچنین از کلیه اساتید و اعضای محترم پژوهشکده غذایی و کشاورزی، آزمایشگاه روغن‌ها و چربی‌های خوراکی سپاسگزاری می‌شود.

REFERENCES

Afshar, M., Ghiasi Tarzi, B., Gharchurlu, M., Basiri, AS. R. & Baqueda, H. (2015). Evaluation and comparison of chemical compounds and fatty acids in leaves of two samples of Iranian *Portulaca Oleracea* (*Purslane*) belonging to the north (Gilan province) and south (Fars province). *Journal of Food Science and Nutrition*, 12(3), 59-64.(In Farsi)

Arabshahi, S. & Urooj, A. (2007). Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morusindica* L.) Leaves. *Food Chemistry*, 102, 1240-1233.

Azhar, H., Nadeem, A. A., Ishfaq, A. H., Attiq, A. (2009). Morpho-physical characteristics of eight loquat genotypes cultivated in Chakwal district, *Pakistan Journal of Botany*, 41(6), 2841-2849.

Chen, YF., Tsai, H.Y., and Wu, T. S. (1995). Anti-inflammatory and analgesic activities fromroots of Angelica pubescens. *Planta Medica*. 61, 2-8.

Cieslik, E., Greda, A. & Adamus, W. (2006). Contents of polyphenols infruit and vegetables. *Food Chemistry*, 94, 135–142.

Cui, C. B., Tezuka, Y., Kikuchi, T., Nakano, H., Tamaoki, T. & Park, J.H. (1990). Constituents of a fern, *Davallia mariesii* Moore. I. Isolation and structures of davallialactone and a new flavanone glucuronide. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 38, 3218-3225.

Davoodi, A., Ebrahimzadeh, MA., Fathalinezhad, F., Khoshvishkaie E. (2017). Antibacterial activity of mespilusgermanica leaf extract. *Journal of Mazandaran University Medical Science*, 26(146), 173-178.

Fallah-Mohammadi, Z., Aghasi, M. & Ahmadi-Kordasiai, M. (2014). Neuroprotective effects of exercise with hydroalcoholic extraction of *Eriobotrya japonica* on MANF in the Brainstem of parkinson's rats. *Journal of Shahrekord University of Medical Sciences*, 16(3), 43-52.

Ghasemzadeh, A. & Ghasemzadeh, N. (2011). Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human, *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(31), 6697-6703.

Gong, R. G, Lai, J., Yang, W. Liao, M. A., Wang, Z. H. & Liang, G. L. (2015). Analysis of alterations to the transcript oneof Loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) underlow temperature stress via de novo sequencing. *Genetics and Molecular Research (GMR*), 14(3), 9423-9436.

Hamada, A., Yoshioka, S., Takuma, D., Yokota, J., Cui, T., Kusunose, M., Miyamura, M., Kyotani, S. & Nishioka, Y. (2004). The effect of *Eriobotrya japonica* seed extract on oxidative stress in adriamycin induced nephropathy in rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27, 1961-1964.

Hemmatyar, S., Hojjati, M., Jooyandeh H.& Barzegar H. (2017). Study of chemical composition of *Eriobotrya japonica*L. and extraction of its polysaccharide as an antioxidant. *Journal of Food Research*, 27, 171-181. https://foodresearch.tabrizu.ac.ir/.

Herrmann, K. (1956). On caffeic acid and chlorogenic acid. *Pharmazie*, 11,433-449. (Cited by IARC, 1993).

Ichinose, I. (1995). The origin and development ofloquat (in Japanese). *Series of Agriculture and Technology*.4 (Suppl.), 1-5.

Iranian National Standards Organization (INSO). No. 14880. (2013). Oil seeds - Extraction of oil and preparation of methyl esters of triglyceride fatty acids for analyses by gas chromatography (rapid method). (In Farsi).

Iranian National Standards Organization (INSO). No. 16323. (2013). Olive oil- Determination of biophenols by HPLC – Test method. (In Farsi).

Iranian National Standards Organization (INSO). No. 13126-4. (2016). Animal and vegetable fats and oils-

Gas chromatography of fatty acid methyl esters- Part 4: Determination by capillary gas chromatography.

Iranian National Standards Organization (INSO). No.13126-2. (2016). Animal and vegetable fats and oils- Gas chromatography of fatty acid methyl esters- Part 2: Preparation of fatty acid methyl esters.

Ito, H., Kobayashi, E., Li, S. H., Hatano, T., Sugita, D., Kubo, N., Shimura, S., Itoh, Y., Tokuda, H., Nishino, H. & Yoshida, T. (2002). Antitumor activity of compounds isolated from leaves of *Eriobotrya japonica*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 2400–2403.

Khine Zar, Ph., Morishita, A., Hashimoto, F., Sakao, K., Fujii, M., Wada, K. & Hou, De. X. (2014). Anti-inflammatory effects and molecular mechanisms of loquat (*Eriobotrya japonica*) tea. *Journal of Functional Food*, 6, 523-533.

Li, Y., Chen, L.J., Jiang, F., Yang ,Y., Wang , X.X., Zhang, Z., Li, Z. & Li, L.(2015). Caffeic acid improves cell viability and protects against DNA damage:involvement of reactive oxygen speciesand extracellular signal-regulated kinase. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 48(6), 502-508.

Lin, J.Y. & Tang, CH.Y. (2007). Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. *Food Chemistry*, 101, 140–147.

Lin, S.h., Sharpe, R.H. &Janick, J. (1999). Loquat: Botany and Horticulture. *Horticultural Review*. 23, 233-276.

Mohammed, S. & Manan, F.A. (2015). Analysis of total phenolics, tannins and flavonoids from *Moringaoleifera* seed extract. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, (7)1, 132-135.

Morton, J. F.& Dowling, C. F. (1987). *Fruits of warm climates* (Vol. 20534). Miami, FL: JF Morton.

Nematshahi, M.M., Haddad Khodaparast, M., Alhamami Rad, A. M, Hoshamnd Dalir, M. A. & Nemat Shahi, N. (2016). Investigation of chemical compounds and antioxidant properties of Laurus nobilis L. extract and its effect on the stability of canola oil during storage. *Journal of Innovation in Food Science and Technology*, 1, 63-73. (In Farsi).

Nishioka, Y., Yoshioka, S., Kusunose, M., Cui, T., Hamada, A., Ono, M., Miyamura, M. & Kyotani, S. (2002). Effects of extract derived from *Eriobotrya japonica*on liver function improvement in rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25, 1053-1057.

Radha, T. & Mathew, L. (2007). Fruit crops. Horticulture Science Series, New India publishing Agency, pitam pura, new Dehli, vol-3, 216-221. ISBN 81-89422-46-4.

Rafiei, Z., Jafari, S. M., Alami, M., & Khomeiri, M. (2011). Antioxidant properties of olive leaf extract and its application in sunflower oil. *Journal of Food Industry Research*, *21*(1), 12-22.

Rahimkhani, R., Varasteh, F.&Seifi E. (2017). Comparison of fruit biochemical and qualitative attributesof loquat genotypes(*Eriobotrya japonica L.*) of Gorgan. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 48, 413-421.

Sakuramata, Y., Oe, H., Kusano, S. & Aki, O. (2004). Effects of combination of Caiapo with other plant-derivedsubstance onanti-diabetic efficacy in KK-Ay mice. *Biofactor*s, 22, 149–152.

Sass-Kiss, A., Kiss, J., Milotay, P., Kerek, M. M. & Toth-Markus, M. (2005). Differences in anthocyanin and carotenoid content of fruits and vegetables. *Food Research International*, 38, 1023–1029.

Seadatmand, L., Ghorbanli, M. & Niakan, M. (2014). Phytochemical and antioxidant activity of *Eleagnus angustifolia L*. in different regions of Razavi Khorasan province. *Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants*, 1(4), 58-67. (In Farsi).

Silva, S., Gomes, L, Leitao, F, Coelho, A.V.& Boas, L.V. (2006). Phenolic compounds and antioxidant activity of *oleaeuropaea* l. fruits and leaves. *Food Science and Technology International*, 12, 385–396.

Singh, B., Gairola, S., Kumar, D.H., Gupta, V. & Bansal, P. (2010). Pharmacological potential of *Eriobotrya Japonica* – An Overview. *International research Journal of Pharmacy*, 1(1), 95-99.

Zhang, L., Wang, H., Gong, L. K., Li, X. H., Cai, Y., Qi, X. M., Liu, L. L., Liu, Y. Z., Wu, X. F., Chen, F. P., Huang, C. G. & Ren, J. (2004). Feitai attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27, 634-640.

Zhang, W., Zhao, X., Sun, Ch., Li, X. & Chen, K. (2015). Phenolic composition from different loquat (*Eriobotrya japonica* lindl.) cultivars grown in china and their antioxidant properties. *Molecules Journal*, 20, 542-555.