مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۶، دوره ۷۲، شماره ۱، ۶۱- ۵۳
Journal of Veterinary Research. 72,1:53-61, 2017
Original Article

تعیین میزان ترکیبات فنولی، فعالیت‌های آنتی رادیکالی و آنتی اکسیدانی عسل سبلان

ابوالفضل کامکار[1*] سارا خدابخشیان[2]

۱) گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
۲) دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

(دریافت مقاله: ۲۵ مرداد ماه ۱۳۹۵، پذیرش نهایی: ۱۱ مهر ماه ۱۳۹۵)

چکیده

زمینه مطالعه: عسل به عنوان ماده‌ای با خواص بیولوژیکی مختلف، از جمله اثرات آنتی‌اکسیدانی شناخته شده است. اسیدهای فنولیک و فلاونوئیدها آنتی اکسیدان‌های اصلی این محصول می‌باشند. اندازه‌گیری این ترکیبات می‌تواند به انتخاب عسل با خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالا کمک کند. **هدف:** در این مطالعه میزان کل ترکیبات فنولیک، محتوای تام فلاونوئیدی و فعالیت آنتی اکسیدانی هشت نمونه عسل سبلان بررسی شد، علاوه براین چند آزمون کنترل کیفیت شیمیایی عسل از جمله: pH، اسیدیته، فعالیت دیاستازی (کیفی) و تشخیص وجود هیدروکسی متیل فورفورال (کیفی) نیز انجام گرفت. **روش کار:** مقدار کل ترکیبات فنولیک با استفاده از معرف فولین سیوکالتیو، فعالیت آنتی‌اکسیدانی با روش DPPH و مهار رنگ بری بتاکاروتن، محتوای تام فلاونوئیدی با استفاده از معرف کلرید آلومینیوم اندازه‌گیری گردید. از روش‌های ذکر شده در استاندارد شماره۹۲ سازمان ملی استاندارد ایران جهت اندازه‌گیری پارامترهای فیزیکوشیمیایی عسل استفاده شد. تجزیه وتحلیل داده‌ها با آزمون ANOVA(one-way)، با استفاده از نرم افزار SPSS صورت گرفت. **نتایج:** محدوده مقادیر بدست آمده حاصل از آزمون‌ها عبارتست از: میزان ترکیبات فنولیک (۱۵/۷۱-۴۱/۵۸ mg معادل گالیک اسید در ۱۰۰ g عسل)، محتوای تام فلاونوئیدی (۳/۸۰-۱۳/۲۰ mg معادل کوئرستین در ۱۰۰g عسل)، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH (۲۳/۱۹-۹۴/ ۲۵٪) و با روش مهار پراکسیداسیون بتاکاروتن- لینولئیک اسید (۶۹/۵۴-۸۵/۶۹ ٪)، pH (۳/۶۳-۳/۸۳)، اسیدیته آزاد (۱۱/۹۹ -۲۰/۵۰ mEq/kg). فعالیت دیاستازی تمام نمونه‌ها به جز (نمونه یک) منفی شد، نتیجه تست HMF تمام نمونه‌ها مثبت گردید. **نتیجه گیری نهایی:** نمونه‌های مورد آزمون فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی از خود نشان دادند، نتایج آزمون‌های شیمیایی مطابق با استانداردهای جهانی بود به استثنای آزمون دیاستاز و HMF که میتواند به علت شرایط نامناسب فرآوری و نگهداری، حرارت دادن محصول، تازه نبودن عسل وغیره باشد.

واژه‌های کلیدی: عسل، DPPH، فعالیت آنتی اکسیدانی، محتوای تام فنولی

مقدمه

عسل یک ماده طبیعی شیرین است که به توسط زنبورهای عسل از شهد گل‌ها، ترشحات بخش‌های زنده گیاهان و یا مواد دفعی حشرات ناشی از مکیدن بخش زنده گیاهان تولید می‌شود (۲،۹).

عسل عمدتاً مخلوط پیچیده‌ای از کربوهیدرات‌ها (فروکتوز و گلوکز) است (حدود ۷۷-۷۹٪) و ترکیبات دیگری (حدود ۳٪) نظیر فنول‌ها، اسیدهای آلی، آمینو اسیدها، پروتئین‌ها، مواد معدنی، ویتامین‌ها، لیپیدها و غیره در آن وجود دارد (۳،۲۵). این بخش نه تنها خواص عملکردی متعددی از خود نشان میدهد بلکه با توجه به فلور گیاهی، عوامل محیطی و گونه‌های زنبور عسل متفاوت می‌باشند. برخی از ترکیبات از شهد یا گرده وارد عسل شده و مابقی توسط زنبور عسل در طول فرآیند تولیدعسل در آن تشکیل می‌شوند (۲۳).

آنتی اکسیدان‌ها که از فعال‌ترین ترکیبات فیزیولوژیکی در عسل می‌باشند در حفاظت ازموجودات زنده در برابر آسیب اکسیداتیو نقش مهمی دارند واز بروز انواع بیماری‌های مزمن مانند سرطان، بیماری قلب وعروق و دیابت جلوگیری می‌کنند. عسل دارای انواع آنتی اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی شامل گلوکز اکسیداز، کاتالاز، ال-آسکوربیک اسید، فلاونوئیدها، اسیدهای فنولیک، کاروتنوئیدها و اسیدهای آلی، آمینواسیدها و پروتئین‌ها می‌باشد (۸). اسیدهای فنولیک وفلاونوئیدها دو ترکیب اصلی ایجاد کننده فعالیت آنتی‌اکسیدانی عسل می‌باشند که از واکنش اتواکسیداسیون جلوگیری کرده و اثر مهارکنندگی روی رادیکال‌های آزاد با مکانیسم‌های مختلف دارند (۱۳). مقدار آن‌ها به شدت تحت تأثیر عواملی نظیر منابع گل، فصل و عوامل محیطی می‌باشد، در این میان منشأ گیاهی عسل بیشترین تأثیر را برروی فعالیت انتی‌اکسیدانی آن دارد در حالی که فرآوری و نگهداری عسل به مقدار جزئی در این مورد مؤثرند (۳،۱۶).

با توجه به این که امروزه مصرف آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به علت اثرات بسیار مفید آن‌ها در درمان و پیشگیری بسیاری از بیماری‌ها رو به افزایش است، عسل می‌تواند به عنوان یک محصول دارای ترکیبات آنتی‌اکسیدانی طبیعی مورد استفاده قرار گیرد. انواع مختلف عسل حاوی ترکیبات فنولیک متفاوتی می‌باشند و اندازه‌گیری این ترکیبات در عسل‌های مختلف می‌تواند به انتخاب عسل با خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالا کمک کند. در این مطالعه که برای اولین بار در ایران صورت می‌گیرد میزان ترکیبات فنلی موجود در هشت نمونه عسل سبلان و همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌رادیکالی آن‌ها بررسی گردید. علاوه‌براین برخی پارامترهای فیزیکوشیمیایی نمونه‌های عسل مطابق با استاندارد ملی ایران تعیین گردیدند.

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۰۲۱-۶۱۱۱۷۰۴۲ نمابر: ۰۲۱-۶۹۳۳۲۲۲ Email: akamkar@ut.ac.ir

مواد و روش کار

عسل: در این مطالعه تعداد هشت نمونه عسل از تولید کنندگان عمده عسل که به صورت شهد بودند تهیه و سپس در شرایط معمولی به آزمایشگاه منتقل شده و پس از آماده سازی‌های اولیه مطابق روش‌های معتبر برای هر کدام از فاکتورها مورد آنالیز و ارزیابی قرار گرفتند.

مواد شیمیایی: کلیه مواد و محلول‌های شیمیایی مورد استفاده در این مطالعه از درجه خلوص بالایی برخودار بوده و توسط شرکت‌های معروف دنیا تولید شده بودند.

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی عسل در حضور رادیکال DPPH: فعالیت آنتی اکسیدانی عسل در حضور رادیکال آزاد ۲و۲- دی فنیل ۱- پیکریل هیدرازیل (Sigma; DPPH) به روش اسپکتروفتومتری انجام گرفت. مقدار ۱/۲۵ml از محلول عسل (۰/۰۵ g/ml) حل شده در آب مقطر با ۱/۵ ml محلول متانولی DPPH (۰/۰۰۴ ٪) مخلوط شد و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای محیط و در تاریکی نگهداری شد، سپس جذب در طول موج ۵۱۷nm در برابر متانول- آب ۱:۱ به عنوان شاهد قرائت گردید. نمونه کنترل طبق روش بالا تهیه شد با این تفاوت که به جای محلول عسل، ۱/۲۵ml متانول با ۱/۵ml محلول DPPH مخلوط شد. فعالیت آنتی اکسیدانی عسل به صورت درصد بازدارندگی بیان شد و با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (۳۱).

درصد به دام انداختن رادیکال آزاد= [(Ablank – Asample/Ablank)]×۱۰۰

اندازه‌گیری فعالیت آنتی اکسیدانی عسل به روش مهار رنگ بری بتاکاروتن: برای انجام آزمایش ابتدا یک محلول پایه از بتاکاروتن- لینولئیک اسید) بتاکاروتن (Merck K ۱۵۵۵۵۸۳۶)، لینولئیک اسید (Sigma L ۱۳۷۶)تهیه گردید: {۰/۰۲۵ g بتاکاروتن در ۵۰ml کلروفرم (Merck k۳۴۹۴۵۴۳۱) حل شد، ۲ml از این محلول برداشت شد و به آن ۲۵ µl لینولئیک اسید و ۲۰۰mg توئین۴۰ (Riedel ۶۳۱۵۹)، اضافه گردید وکاملا مخلوط شد، پس از جداسازی و تبخیرکلروفرم ، ۱۰۰ml آب مقطر اشباع شده با اکسیژن همراه با تکان شدید به آن اضافه شد، در ادامه ۲/۵ml از محلول پایه تهیه شده فوق به لوله آزمایش منتقل شد و ۳۵۰µl محلول عسل (۰/۱ g/ml) به آن اضافه گردید. تمامی این مراحل در مورد محلول BHT (Sigma B۱۳۷۸) به عنوان استاندارد (کنترل مثبت) و شاهد(فقط حاوی ۳۵۰µl اتانول) انجام شد. نمونه‌ها درحمام آب گرم ۵۰°C قرار داده شدند وجذب نوری نمونه‌ها در زمان‌های صفر و ۱۲۰در طول موج ۴۷۰nm قرائت شد (۱۰).

نمونه شاهد: به جای ۱۰۰ µl محلول عسل، ۱۰۰ µl آب مقطر اضافه شد و بقیه مراحل طبق روش بالا انجام گرفت.

اندازه‌گیری مقدار کل ترکیبات فنولیک: مقدار کل ترکیبات فنولیک موجود در عسل به روش فولین- سیوکالتو (Merck ۳۲۵۲۵۶۲) مورد بررسی قرار گرفت. ۱g از هر نمونه عسل در ۱۰ml آب مقطر حل و توسط کاغذ فیلتر واتمن ۴ صاف شد. ۱۰۰ µl از این محلول با ۱ml از فولین سیوکالتو ۱۰٪ نرمال، مخلوط گردید و به مدت پنج دقیقه تکان داده شد، پس از آن ۶۰۰µl سدیم کربنات (Merck ۱۰۲۲۵۶۲)۲۰٪ به محلول اضافه گردید و به مدت دو ساعت در دمای محیط و در تاریکی نگهداری شد، سپس مقدار جذب محلول توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۰nm در برابر نمونه شاهد قرائت گردید (۵).

نمونه شاهد: به جای ۱۰۰µl محلول عسل، ۱۰۰µl آب مقطر اضافه شد و بقیه مراحل طبق روش بالا انجام گرفت. مقدار کل ترکیبات فنولیک از روی معادله خط رسم شده برای اسید گالیک، بر مبنای "میلی گرم معادل اسید گالیک (Merck ۳۰۰۵۶۲)، بر ۱۰۰g عسل" بیان گردید.

اندازه‌گیری محتوای تام فلاونوئیدی: محتوای تام فلاونوئیدی با استفاده از معرف کلرید آلومینیوم (Merck۷۳۶۲۵۶۲) اندازه‌گیری شد. پنج سی‌سی محلول آلومینیوم کلراید (۲٪) با ۵ ml محلول عسل (۰/۱g/ml) مخلوط شد. جذب نوری مخلوط پس از ۱۰ دقیقه نگهداری در دمای اتاق، در طول موج ۴۱۵nm در مقابل بلانک خوانده شد. کوئرستین (Sigma Q:۰۱۲۵) به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد. مقدار فلاونوئید بر مبنای "میلی گرم معادل کوئرستین بر ۱۰۰g عسل" بیان گردید (۱۲).

تعیین pH: مقداری عسل (حدود ۱۰g) را در یک بشر وزن و در۷۵ml آب مقطر بدون CO۲ حل شده و با کمک دستگاه pH متر که با بافر ۴و ۷ کالیبره شده بود میزان pH را در دمای ۲۰°C بدست آمد.

تعیین اسیدیته آزاد: ۱۰g از نمونه عسل را وزن و در ۷۵ ml آب مقطر بدون CO۲ (تازه جوشیده وسرد شده) حل شد، محلول در مجاورت شناساگر فنل فتالئین و یا با کمک pH متر تا رسیدن به PH (۸/۳) با سود ۰/۱ N تیتر شد. آزمایش شاهد برای آب مقطر و شناساگر انجام گرفت. نتیجه آزمون طبق فرمول اسیدیته بر حسب mEq/kg بیان شد.

اسیدیته = ۱۰۰۰× N (V–V') /W

N: نرمالیته سود مصرفی، V: میلی‌لیتر سود مصرفی نمونه، 'V: میلی‌لیتر سود مصرفی شاهد، W: وزن نمونه به گرم

تعیین فعالیت دیاستازی (روش کیفی): ۱۰ g از هر نمونه در ۲۰ml آب حل و در دو لوله آزمایش هر یک ۱۰ml از این محلول ریخته شد، به یکی از لوله‌ها (لوله نمونه)، ۱ml محلول نشاسته ۱٪ اضافه گردید و در بن ماری با دمای ۴۵ °C به مدت یک ساعت قرار داده شد سپس به ان ۱ml محلول ید اضافه و رنگ حاصل با رنگ لوله شاهد مقایسه گردید.

لوله شاهد: بلافاصله ۱ml محلول نشاسته و ۱ml ید به محلول عسل اضافه شد.

تشخیص وجود هیدروکسی متیل فورفورال (HMF)- روش کیفی: ۲۰g عسل را در ۲۰ml آب سرد حل نموده، ۴ ml اتر اتیلیک به آن افزوده

و به آرامی به هم زده و مخلوط گردید ، قسمت اتری را در یک بشر کوچک انتقال داده و اجازه داده شـد تا تبخیر شود باقیمانده تبخیر را در ۱۰ml اتر حل کرده و به ۲ml از این عصاره اتری ۲ ml محلول ۱٪ رزورسـینول در اسید کلریدریک غلیظ اضافه شد. هرگاه بلا فاصله رنگ صورتی در قسمت اسیدی ظاهر شود نتیجه مثبت بوده و دلیل وجود قند اینورت در نمونه است. ایـن رنگ صورتی پس از ۲۰ دقیقه تیره و تبدیل به رنگ قرمز آلبالویی در حد فاصل دو قسمت اتری و اسیدی می‌شود.

آزمون‌هـای آماری مورد اسـتفاده در تحلیل نتایـج: پس از جمع‌آوری داده‌هـا، یافته‌ها در قالب جـداول آماری ارائه گردید. برای بررسـی نرمال بودن توزیع متغییرهای مورد بررسـی از آزمون کولموگروف- اسـمیرنوف Kolmogorov–Smirnov test استفاده شد، برای مقایسه میانگین بین گروه‌ها از آزمون آنالیز واریانس و تسـت تکمیلی توکی استفاده شد. سطح معنی‌دار ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

فعالیت آنتی اکسیدانی در حضور رادیکال DPPH: رادیکال DPPH با آنتی اکسیدان‌های دهنده هیدروژن، واکنش داده و رنگ محلول از بنفش تیره به زرد روشن تبدیل می‌شود، هرچه فعالیت آنتی اکسیدانی نمونه بیشتر باشد تغییر رنگ محلول مشهودتر و عدد جذب در طول موج ۵۱۷nm کمتر خواهـد بود. نتایج آزمون به صورت فعالیت نسـبی در برابر کنترل ارزیابی گردید و به درصد گزارش شد.

درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها در نمودار ۱ ارائه شده است. نتایج بدسـت آمده بصورت میانگین ± انحراف معیار بـرای نمونه‌های مختلف عسل گزارش شد. براسـاس اطلاعات بدست آمده نمونه‌های عسل مورد مطالعه از نظر فعالیت ضـد رادیکالی دارای محـدوده (۲۳/۱۹±۷/۷۲) الی (۹۴/۲۵±۱/۲۵) بودند که از میان آن‌ها نمونه شـماره شـش و هفت دارای کمترین و نمونه شماره هشت دارای بیشترین میزان فعالیت انتی رادیکالی بودند. در میان نمونه‌های مورد مطالعه میزان فعالیت آنتی اکسیدانی بعضی از انها نظیر نمونه‌های شـماره یک و دو و از طرف دیگر نمونه سـه و چهار دارای فعالیت انتی رادیکالی تقریبا برابربودند.

براسـاس آنالیزهای آماری، فعالیت آنتی‌اکسـیدانی نمونه هشـت با نمونه‌های یک، دو، شش، هفت متفاوت بود ($p<۰/۰۵$).

نمونـه هفت کمترین فعالیت بازدارندگی رادیکال آزاد را نشـان داد و از این نظر اختلاف آماری معنی‌داری با سـایر نمونه‌ها داشـت ($p<۰/۰۵$). آزمون تعیین همبسـتگی، همبسـتگی مثبت، مسـتقیم و شـدیدی بین ترکیبات کل فنولی و تست DPPH نشان داد که از نظر آماری معنی‌دار بود ($p=۰/۰۲, R=+۰/۷۷$)، همچنین، همبستگی مثبت، مستقیم و ضعیفی بین آزمون‌های فلاونوئیدها و DPPH مشـاهده شد که از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p=۰/۳۴, R=+۰/۳۹$).

جـدول۱. محتـوای تـام فنولـی نمونه‌هـای عسـل (میلی گرم معـادل گالیک اسـید/g ۱۰۰عسل) (Mean±SD). *حروف بالانویس متفاوت بیانگر معنی‌دار بودن میانگین‌ها است.

sample	TP mgGAE/۱۰۰g honey	sample	TP mgGAE/۱۰۰g honey
۱	۳۳/۲±۰/۱۸ ac	۵	۳۰/۹۵±۰/۸۹ac*
۲	۳۳/۳۳±۰/۴۵ ac	۶	۱۵/۷۱±۰/۲۱ ade
۳	۳۰/۱۶±۰/۰۰ ac	۷	۲۳/۱۷±۰/۶۷adf
۴	۳۴/۴۵±۰/۰۱ ac	۸	۴۱/۵۸±۳/۸۱ b

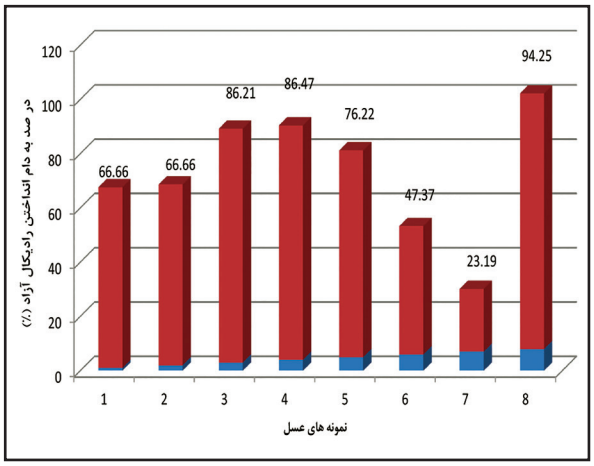
جـدول ۲ . محتـوای تـام فلاونوئیـدی (میلـی گـرم معادل کوئرسـتین/g ۱۰۰ عسـل) (Mean±SD). *حروف بالانویس متفاوت بیانگر معنی‌دار بودن میانگین‌ها است.

sample	TP mgGAE/۱۰۰g honey	sample	TP mgGAE/۱۰۰g honey
۱	۱۲/۷۷±۰/۱۱ a	۵	۱۳/۲۰±۰/۳۱ b*
۲	۱۱/۳۷±۰/۴۶ a	۶	۳/۸۰±۰/۵۳ a
۳	۱۱/۸۳±۰/۰۶ a	۷	۱۱/۰۴±۱/۲۶ b
۴	۱۰/۶۷±۰/۳۳ a	۸	۱۲/۳۸±۱/۲۶ b

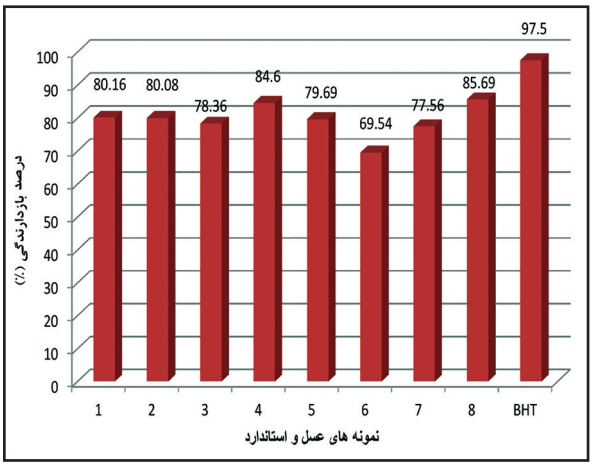
جدول۳. pH و اسـیدیته آزاد (mEq/kg) نمونه‌های عسـل (Mean±SD). * حروف بالانویس متفاوت بیانگر معنی‌دار بودن میانگین‌ها است.

sample	pH	Acidity (mEq/kg)
۱	۳/۶۳±۰/۰۳۵a	۲۰/۵±۳/۵۴a*
۲	۳/۸۲±۰/۰۳۵b	۱۲/۷۴±۳/۱۸b
۳	۳/۸۳±۰/۰۳۵b	۱۱/۹۹±۲/۱۳b
۴	۳/۷۵±۰/۰۴۹b	۱۴/۹۹±۲/۱۳ab
۵	۳/۷۳±۰/۰۳۵b	۱۷/۹۹±۲/۱۳a
۶	۳/۸۲±۰/۰۳۵b	۱۲/۷۴±۱/۰۶b
۷	۳/۸۰±۰/۰۳۵b	۱۳/۴۹±۲/۱۳b
۸	۳/۷۶±۰/۰۶۹b	۱۴/۲۴±۳/۴۱b

مهـار پراکسیداسـیون بتاکاروتن- لینولئیک اسـید: در این آزمون از BHT به عنوان کنترل مثبت اسـتفاده شـد. اثر مهاری نمونه‌ها به درصد گزارش و با فعالیت آنتی اکسـیدانی استاندارد مقایسه گردید. محلول‌های عسـل نسبت به محلول استاندارد عملکرد نسبتاً ضعیف‌تری از خود نشان دادند. درصد بازدارندگی نمونه‌های عسل و استاندارد در نمودار ۲ نشان داده شده اسـت. میانگین درصد بازدارندگی نمونه‌ها ± انحراف معیار به ترتیب بـرای: نمونه یـک (۸۰/۱۶±۶/۰۵)، نمونه دو (۸۰/۰۸±۴/۴۷)، نمونه سـه (۷۸/۳۶±۰/۸۹)، نمونـه چهار(۸۴/۶۰±۴/۹۶)، نمونـه پنج (۷۹/۶۹±۱/۱۷)، نمونـه شـش (۶۹/۵۴±۴/۳۰)، نمونه هفت (۷۷/۵۶±۸/۲۸)،نمونه هشـت (۸۵/۶۹±۱/۱۷)، BHT (۹۷/۵±۳/۵۴) بدست آمد. براساس اطلاعات موجود نمونه شماره هشت پس از BHT دارای بیشترین اثر مهاری در اکسیداسیون اسـید لینولئیک در سیسـتم بتا کاروتن - لینولئیک بوده و نمونه شـماره شـش نسـبت به بقیه موارد عملکرد ضعیف تری از خودش نشـان داد .در آزمون‌های تعیین همبستگی، همبستگی منفی، معکوس و متوسطی بین آزمون‌های ممانعت از اکسیداسـیون اسید لینولئیک بتا کاروتن و DPPH



نمودار۱. فعالیت آنتی رادیکالی نمونه‌های عسل سبلان در آزمون DPPH در شرایط برون تنی.



نمودار ۲. درصد باز دارندگی نمونه‌های عسل از پراکسیداسیون بتا کاروتن.

مشاهده شد که از نظر آماری معنی‌دار نبود (p =۰/۲۱, R=-۰/۵۰) از طرف دیگر همبستگی منفی، معکوس و ضعیفی بین آزمون‌های فلاونوئیدها و ممانعت از اکسیداسیون اسید لینولئیک بتا کاروتن مشاهده شد که از نظر آماری معنی‌دار نبود (p =۰/۴۰, r=-۰/۳۵). همبستگی منفی، معکوس و بسیار ضعیفی بین آزمون‌های ترکیبات کل فنولی و تست ممانعت از اکسیداسیون اسید لینولئیک بتا کاروتن مشاهده شد که از نظر آماری معنی‌دار نبود (p =۰/۷۲, R=-۰/۱۵).

مقدار کل ترکیبات فنولیک: محتوای تام فنولی نمونه‌های عسل به روش فولین سیوکالتیو و بر مبنای ترکیب استاندارد گالیک اسید اندازه‌گیری شد. میانگین نتایج ± انحراف معیار در جدول ۱ ارائه شده است. محتوای تام فنولی نمونه‌های عسل دارای محدوده ۱۵/۷۱mg الی ۴۱/۵۸mg گالیک اسید /g ۱۰۰عسل بود.

با توجه به نتایج به دست آمده ، نمونه هشت بیشترین مقدار ترکیبات فنولیک را دارا بود و از این لحاظ تفاوت آماری معنی‌داری با سایر نمونه‌ها داشت (p<۰/۰۵). در آزمون تعیین همبستگی، همبستگی مثبت، مستقیم و شدیدی بین آزمون‌های ترکیبات کل فنولی و فلاونوئیدها مشاهده شد که از نظر آماری معنی‌دار بود (p =۰/۰۲, R=+۰/۶۷).

محتوای تام فلاونوئیدی: محتوای تام فلاونوئیدی با استفاده از معرف کلرید آلومینیوم اندازه‌گیری شد. کوئرستین به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده گردید و نتایج بر مبنای میلی گرم معادل کوئرستین در ۱۰۰g عسل گزارش شد (جدول۲). محتوای تام فلاونوئیدی نمونه‌های مختلف عسل دارای محدوده ۳/۸۰ الی ۱۳/۲۰mg معادل کوئرستین/g ۱۰۰ عسل بوده ولی میزان ترکیبات فلاونوئیدی نمونه شش به صورت معنی‌داری کمتر از سایر نمونه‌ها می‌باشد (p<۰/۰۵).

کیفیت شیمیایی عسل: pH، اسیدیته آزاد، تعیین فعالیت دیاستازی (کیفی)، تشخیص وجود هیدروکسی متیل فورفورال (کیفی)، از جمله پارامترهایی است که مورد آزمون قرار گرفتند. میانگین داده‌های بدست آمده مربوط به pH و اسیدیته آزاد هشت نمونه عسل مورد آزمون، به ترتیب: ۳/۷۶، ۱۴/۸۳(mEq/kg) می‌باشد. بیشترین وکمترین میزان pH به ترتیب مربوط به عسل‌های نمونه سه و یک می‌باشد. اختلاف آماری معنی‌داری بین pH نمونه یک با سایر نمونه‌ها وجود دارد (p<۰/۰۵).

براساس اطلاعات موجود درجدول ۳ بیشترین وکمترین میزان اسیدیته به ترتیب مربوط به نمونه‌های یک و سه بود. بین اسیدیته نمونه یک با نمونه‌های دو، سه، شش، هفت و هشت اختلاف اماری معنی‌داری مشاهده گردید (p<۰/۰۵). تفاوت معنی‌داری بین اسیدیته نمونه چهار با سایر نمونه‌ها دیده نشد (p>۰/۰۵). تست فعالیت دیاستازی تمام نمونه به جز (نمونه شماره یک)، منفی شد و تست HMF در تمام نمونه‌ها مثبت گردید.

بحث

آنتی اکسیدان‌ها از فعال‌ترین ترکیبات فیزیولوژیک عسل می‌باشند. عسل حاوی انواع آنتی اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی شامل گلوکز اکسیداز، کاتالاز، ال آسکوربیک اسید، فلاونوئیدها، اسیدهای فنولیک، کارتنوئیدها، اسیدهای آلی، آمینواسیدها و پروتئین‌ها می‌باشد. تفاوت در فعالیت آنتی اکسیدانی انواع عسل به مقدار و نوع آنتی اکسیدان‌های آن به خصوص ترکیبات فنولیک نسبت داده می‌شود (۹) .

Socha و همکارانش در سال ۲۰۱۱، فعالیت آنتی اکسیدانی و پروفایل اسیدهای فنولیک هشت نمونه عسل مختلف لهستان را مورد بررسی قرار دادند معلوم گردید که با افزایش میزان ترکیبات فنولی میزان فعالی انتی اکسیدانی عسل بالا می‌رود (۲۷) مشابه این یافته Silici و همکارانش در سال ۲۰۱۰، با بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی و محتوای فنولیک ۵ نمونه عسل از ترکیه به این نتیجه رسیدند که بین فعالیت انتی اکسیدانی نمونه‌های عسل مورد مطالعه و میزان ترکیبات فنلی آن‌ها ارتباط قوی وجود دارد (۲۵). مطالعه دیگری نیز در این زمینه توسط Chua و همکاران در سال۲۰۱۳ انجام شدکه، در آن میزان ارتباط فعالیت آنتی‌اکسیدانی با

ترکیبات فنولیک و فلاونوئید سه نمونه عسل مالزیایی موردپایش قرار گرفت، نتایج در اینجا نیز بیانگر این واقعیت بود که عسل‌هایی که دارای ترکیبات فنلی بالایی هستند در آزمون‌های تعیین قدرت آنتی اکسیدانی از کارایی و قدرت بیشتری برخودار هستند (۷).

در مطالعه ما، با توجه به اطلاعات موجود در نمودار ۱، نمونه هشت دارای بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی بوده و میزان ترکیبات فنولیک آن از بقیه بیشتر می‌باشد ($p<0/05$) و نمونه‌های دیگر که کارآیی آنتی اکسیدانی کمتری را در تست‌های آنتی اکسیدانی از خود نشان داده بودند دارای ترکیبات فنولی کمتری می‌باشند.

از عوامل اصلی مؤثر در فعالیت آنتی اکسیدانی عسل فلاونوئیدها و اسیدهای فنولیک هستند (کوئرستین، کامپفرول، گالانژین، نارینژین، لوتئولین، پنوکمبرین) از جمله فلاونوئیدها و (کافئیک اسید، سینامیک اسید، گالیک اسید، کوماریک، کلروژنیک) از جمله اسیدهای فنولیک موجود در عسل می‌باشند. این ترکیبات در طعم و رنگ عسل نیز مؤثرند، به گونه‌ای که عسل‌های تیره‌تر، حاوی ترکیبات فنولیک بیشتری هستند (۱۰،۱۸،۲۰) .

Ferreres و همکاران در سال ۱۹۹۴ پروفایل فلاونوئیدی ده نمونه عسل Heather پرتغالی را به روش HPLC مورد آنالیز قرار دادند، (پینوکمبرین، پینوبانکسین) از فلاونون‌ها و (کرسین، گالانژین) ازفلاون‌ها بیشترین مقدار را نسبت به سایر فلاونوئیدها در نمونه‌های عسل مورد آزمون دارا بودند (۱۱).

از جمله عوامل دیگری که هم روی مقدا و هم روی نوع ترکیبات فنلی عسل مؤثر می‌باشد می‌توان به نوع فلور گیاهی منطقه پرورش زنبور عسل اشاره نمود که این مسئله در مطالعه Petrus و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان داده شد در این مطالعه ترکیبات فلاونوئیدی نظیر گالانژین، کامپفرول، کوئرستین، لوتئولین در همه نمونه‌های مورد آزمون وجود داشت (۱۹). در مطالعه دیگری توسط Perna و همکارانش در سال ۲۰۱۳ تأثیر منابع گیاهی و فصل و عوامل محیطی روی میزان ترکیبات فنلی پنج نمونه عسل از انواع اکالیپتوس، شاه بلوط، و شکوفه مرکبات در کشور ایتالیا مطالعه شد. آن‌ها به این نتیجه رسیدند که منشأ گیاهی عسل بیشترین نفش را از نظر میزان ترکیبات فنلی دارا می‌باشد. در ضمن فرآوری و نگهداری عسل از این نظر کمترین سهم را به خودشان اختصاص می‌دهند (۱۸).

در مطالعه پنج نمونه عسل با منشأ گیاهی مختلف درکشور تونس میزان ترکیبات فنولیک در محدوده ۱۱۹/۴۹-۳۲/۷ قرار داشت، ضمن اینکه عسل نعناع دارای بیشترین میزان ترکیبات فنولیک، فلاونوئید و فعالیت آنتی اکسیدانی نسبت به سایر نمونه‌ها بود. در مطالعه نمونه‌های عسل اقاقیا از کشور مالزی طی یک دوره دو ساله، نمونه‌هایی که در ابتدای سال (ژانویه) سال جمع‌آوری شده بودند دارای رنگ تیره تر، قدرت انتی اکسیدانی بالاتر و مقدار ترکیبات فنولیک بیشتری بودند (۱۷). Saric و همکاران در سال ۲۰۱۲ تأثیر انبار مانی روی قدرت آنتی اکسیدانی و محتوای فنولی در نمونه‌های مختلف عسل را در دوره‌های شش ماهه به مدت دو سال مورد بررسی قرار دادند.نتایج نشان داد که پس از یکسال انبارمانی، محتوای فنولیک و فلاونوئیدی نمونه‌های عسل به ترتیب ۹۱/۸٪ و ۴۵/۶٪ نسبت به مقدار اولیه کاهش یافت و فعالیت انتی اکسیدانی نیز پس از دوسال ۳۰٪ کاهش پیدا کرد (۲۴).

در ایران بیشتر، کیفیت شیمیایی عسل مورد تحقیق قرارگرفته و خیلی کمتر به بررسی فعالیت انتی اکسیدانی و تعیین مقدار ترکیبات فنولیک و فلاونوئیدی پرداخته شده است.ولی در این مطالعه پتانسیل آنتی اکسیدانی نمونه‌های عسل سبلان به دو روش DPPH و مهار بی‌رنگ شدن بتاکاروتن در سیستم بتاکاروتن- لینولئیک اسید مورد ارزیابی قرار گرفت. اساس روش واکنش بتاکاروتن غیر اشباع با رادیکال آزاد تولید شده در نتیجه تشکیل هیدروپراکسید از لینولئیک اسید است که به دنبال ان ساختار بتاکاروتن تغییر یافته و رنگ نارنجی خود را از دست می‌دهد. حضور انتی اکسیدان‌ها می‌تواند از گسترش بی‌رنگ شدن بتاکاروتن با خنثی کردن رادیکال لینولئات ودیگر رادیکال‌ها در سیستم، جلوگیری کند (۲۸).

فعالیت آنتی اکسیدانی نمونه‌های مورد آزمون در مطالعه حاضر به روش‌های DPPH و CBI به ترتیب دارای محدوده ۹۴/۲۵-۲۳/۱۹ و ۸۵/۶۹-۶۹/۵۴ ٪ بود.

مطالعات انجام شده در کشورهای دیگر نظیر ایتالیا و لهستان با استفاده از آزمون‌های DPPH و تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی نشان داد که فعالیت انتی اکسیدانی و ضد رادیکالی نمونه‌های عسل مورد مطالعه ما دارای قدرت مهار رادیکالی و انتی اکسیدانی بیشتری نسبت به این دو گروه در دو کشور مختلف بودند (۱۸،۲۷).

به منظور ارزیابی تأثیر تیمار حرارتی، نوع عسل، منشاء گیاهی و منطقه جغرافیایی روی قدرت آنتی اکسیدانی عسل در نقاط مختلف دنیا مطالعاتی صورت پذیرفت که نتایج آن‌ها نشان داد که تیمار حرارتی با توجه به نوع عسل روی قدرت آنتی اکسیدانی عسل تأثیر متفاوتی دارد به عنوان مثال در عسل اقاقیا بدون تغییر، در عسلک کاهش، و در عسل لیمو و گندم افزایش می‌یابد که از جمله دلایل آن تشکیل ترکیبات پلیمری ملانوئیدی به دنبال واکنش میلارد ذکر شده است. فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی د رنمونه‌های عسل مورد مطالعه Alzahrani و همکاران در سال ۲۰۱۲ با توجه به منطقه جغرافیایی و منشاء گیاهی متفاوت بود (۳،۴،۱۵،۳۰).

مطالعات قبلی نشان داده که شرایط استخراج و نگهداری عسل روی pH عسل مؤثر بوده و تغییر pH بر پایداری، بافت، زمان انبارمانی آن اثر می‌گذارد. در این ارتباط کاویا و همکاران میزان تغییرات pH و اسیدیته را پس از ۲۰ ماه انبارمانی بررسی و بیان داشتند، میانگین pH نمونه‌ها پس از این دوره افزایش و اسیدیته کاهش یافت (۶،۲۹).

لازم به توضیح است که اسیدیته عسل عمدتاً به علت حضور اسیدهای

آلی نظیر اسید گلوکونیک، اسـید پیروویک، اسیدمالئیک و یون‌های غیر آلی مانند سولفات، فسفات و کلرید می‌باشد. تفاوت در اسیدیته عسل‌های مختلف می‌تواند به دلیل تفاوت در منشـأ گیاهی نیز باشـد Ramirez و همکاران در سال ۲۰۰۰ دو نوع عسل مکزیکی را به مدت ۱۵،۹،۶،۳ دقیقه (۵۵°C) حرارت دادند، سپس به مدت سه و نیم ماه در دمای اتاق نگهداری کردند. پس از طی دوره آزمایشـات کنترل کیفی انجام گرفت نتایج نشان دادکه حرارت باعث تغییرپارامترهای کیفیت می‌شـود ضمن اینکه عکس العمل عسل‌های مورد آزمون در طول دوره نگهداری متفاوت بود (۲۶،۲۱).

استاندارد جهانی pH عسل دارای محدوده ۴/۵-۳/۲ (میانگین ۳/۳۹) و برای اسـیدیته در طـرح اروپایی حداکثر تـا ۴۰meq و در طرح کدکس حداکثر تا ۵۰meq می‌باشـد (این افزایش به خاطر وجود عسل‌هایی است که اسـیدیته طبیعی بالاتری دارند). براین اسـاس و با توجه به مقادیر pH و اسـیدیته نمونه‌های مورد آزمـون در مطالعه حاضر، کـه در جدول ۲ به آن اشـاره شده است، نتایج بدسـت آمده مطابق با مقادیر گزارش شده در استاندارد ملی کشور و کدکس می‌باشد (۲۶).

فعالیت دیاستازی شاخص تعیین اعمال یا عدم اعمال فرآیند حرارتی در عسل است، این آنزیم حساس به حرارت‌دهی و شرایط نگهداری می‌باشد. نوع گیاه مورد استفاده توسط زنبور عسل بر میزان محتوای دیاستاز عسل به طور قابل توجهی تأثیر دارد (۲۶).

به منظور تسهیل فرآیند و حفظ کیفیت ، عسل تازه معمولاً حرارت داده می‌شود اما تیمار حرارتی بیش از اندازه منجر به شکل‌گیری ۵- هیدروکسی متیل فورفورآلدهید (HMF) گشته و از کیفیت عسل می‌کاهد. این ترکیب می‌تواند در اثر واکنش میلارد یا از طریق آبگیری تحت شـرایط اسـیدی ایجاد شـود. این ترکیب طی فرآیند حرارتی در اثـر خروج مولکول آب از اسید هگزوزها مثل فروکتوز وگلوکز در شرایط کاتالیزه شده حاصل می‌گردد (۲۹). عوامل متنوعی در شکل گیری HMF نقش دارند به طوری که تیمار حرارتی عسل تنها عامل تأثیرگذار نمی‌باشد، بلکه درجه حرارت، مدت زمان حرارت‌دهی، شرایط نگهداری، ترکیب عسل، pH، منابع گیاهی و گل نیز نقش دارند (۱) . مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۵ اثر تیمار حرارتی و انبارمانی را بر میزان HMF و فعایت دیاستازی انجام گردید و معلوم شد که تیمار حرارتی تأثیری بر فعایت دیاستازی نداشته اما انبارمانی سبب کاهش آن شده است و میـزان HMF در اثر تیمار حرارتی و همچنین انبـار مانی افزایش قابل ملاحظه‌ای داشـته است (۲۲،۳۰). در مطالعه دیگری در سال ۲۰۱۰ میزان HMF نمونه‌های عسل مالزیایی را پس از ۶ و ۲۴ ماه انبارمانی اندازه‌گیری شد و معلوم گردید، میزان HMF پس از دو سال انبارمانی ۱۰ برابر افزایش داشته است. تغییرات آنتی اکسیدانی و تشکیل هیدروکسی متیل فورفورال چهار نمونه عسـل قبل و بعـد از تیمار حرارتی (۶۰ دقیقـه در بن ماری با دمای بالای ۹۰°C) مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتایج حاصله، افزایش معنی‌داری در میزان HMF بعد از اعمال حرارت به نمونه‌ها مشاهده گردید (۱۴،۱۵). در مطالعه‌ای که در مورد کیفیت شیمیایی نمونه عسل‌های تهران صورت گرفت میانگین pH ۳/۸و میانگین اسیدیته۱/۳ گزارش شد، ۲۳/۴٪ از نمونه‌ها دیاستاز مثبت بودند. ۱۰٪ نمونه‌ها HMF مثبت داشتند (۱۳).

نتیجه گیری: تمامی نمونه‌ها فعالیت آنتی اکسـیدانی قابل توجهی را نشـان دادند. نتایج بدسـت آمده مربوط به pH و اسـیدیته آزاد، مطابق با مقادیر گزارش شده در استاندارد ملی کشور و کدکس بود. شرایط نامناسب نگهداری و فرآوری، تیمار حرارتی می‌تواند از علل نتایج نامطلوب تسـت دیاستاز و HMF باشد.

پیشـنهادات: بررسـی و مقایسـه ویژگی‌هـای فیزیکوشـیمیایی و آنتی‌اکسـیدانی نمونه‌های عسـل مربوط به مناطق جغرافیایی مختلف با شـرایط آب و هوایی متفاوت ایران پیگیری و بررسـی استفاده از عسل به عنوان ماده‌ای با قابلیت‌های بالای آنتی‌اکسیدانی در محصولات غذایی و صنعت دارویی.

تشکر و قدردانی

نگارندگان از حمایت‌های مالی معاونت پژوهشـی دانشـگاه تهران در انجام این طرح قدردانی و سپاس خود را ابراز می‌نمایند.

References

1. Ajlouni, S., Sujrapinyokul, P. (2009) Hydroxymethyl furfuraldehyde and amylase content in Australian honey. Food Chem. 119: 1000-1005.
2. Alonso-Torre, S.R., Cavia, M.M., Fernandez-Muino, M.A., Moreno, G., Huidobro, J.F., Sancho, M.T. (2006) Evalution of acid phosphatase activity of honey from different climate. Food chem. 97: 750-757.
3. Alvarez-Suarez, J.M.S., Tulipani, D., Díaz, Y., Estevez, S., Romandini, F., Giampieri, E., Damiani, P., Astolfi, S., Bompadre, M., Battino, M. (2010) Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, content and other chemical compounds, Food Chem Toxicol. 48: 2490-2499.
4. Alzahrani, H.A., Alsabehi, R., Boukraâ, L., Abdellah, F., Bellik, K. (2012) Antibacterial and antioxidant potency of floral honeys from different botanical and geographical origins. Molecules.17: 10540-10549.
5. Beretta, G., Granata, P., Ferrero, M., Orioli, M., Maffei Facino, R. (2005) Standardization of an-

tioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/ fluorimetric assays and chemometrics. Anal Chim Acta. 533: 185-191.
6. Cavia, M.M., Fernandez-Munio, M.A., Alonso-Torre, J.F., Maria, T. (2007) Evaluation of acidity of honeys from continental climate: Influenced granulation. Food Chem. 100: 1728-1733.
7. Chua, L.S., Rahman, N.L.A., Adnan, N.A. (2013) Antioxidant activity of three honey sample in relation with their biochemical components. J Anal Methods Chem. 2013: 1-9.
8. Dong, R., Zheng, Y., Xu, B. (2013) Phenolic profiles and antioxidant capacities of Chinese unifloral honeys from different botanical and geographical sources. Food Bioprocess Tech. 6: 762-770.
9. Escuredo, O., Silva,L.R., Valentao,P., Seijo, M.C., Andrade, P.B. (2012) Assessing Rubus Honey Value: Pollen and phenolic compounds content and antibacterial capacity. Food Chem. 130: 671-678.
10. Ferreira, I.C.F.R., Aires, E., Barreira, J.C.M., Estenovinho, M. (2009) Antioxidant activity of Portuguese honey sample: different contributions of the entire honey and phenolic extract. Food Chem. 114: 1438-1443.
11. Ferreres, F., Andrad, P., Tomas-Barberan, F., Soler, C. (1994) A simple extractive technique for honey flavonoid HPLC analysis. Apidologie. 25: 21-30.
12. Isla, M.I, Craig, R., Ordonez, C., Zampini, J., Sayago, E., Alvarez, V. (2011) Physico chemical and bioactive properties of honey from Northwestern Argentina. LWT-Food Sci Technol. 44: 1922-1930.
13. Kamkar, A., Jahed Khaniki, Gh.R., Golestani, M.A., Zygham Monfared, M.M. (2012) Evaluation of physico- chemical properties of distributed honeys in Tehran city. Vet J (Pajouhesh & Sazandegi). 95: 10-17
14. Khalil, M.I., Sulaiman, S.A., Gan, S.H. (2010) High 5-hydroxymethylfurfural concentrations are found in Malaysian honey samples stored for more than one year. Food Chem Toxicol. 48: 2388-2392.
15. Kowalski, S. (2013) Changes of antioxidant activity and formation of 5-hydroxymethylfurfural in honey during thermal and microwave processing. Food Chem. 141: 1378-1382.
16. Lachman. J., Orsak, M., Hejtrnànkovà. A., Castano-Tostado, E. (2012) Quality parameters and antioxidant and antibacterial properties of some Mexican honeys. J Food Sci. 77: C121-C127.
17. Moniruzzaman, M., Sulaiman, S.A., Gan, S.H. (2013) Tow-year variations of phenolics, flavonoids and antioxidant contents in acasia honey. Molecules.18: 14695-14710.
18. Perna, A., Simonetti, A., Intaglietta, I., Gambacorta, E. (2013) Antioxidant properties, polyphenol content and colorometric characteristics of different floral origin honeys from different areas of southern Italy. J Life Sci. 7: 428-436.
19. Petrus, K., Schwartz, H., Sontag, G. (2011) Analysis of flavonoids in honey HPLC coupled with coulometer electrode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. Anal Bioanal Chem. 400: 2555-63.
20. Pontis, J.A., da Costa, L.A.M.A., da Silva, S.J.R., Flach, A. (2014) Color, phenolic and flavonoid content, and antioxidant activity of honey from Roraima, Brazil. Food Sci Technol. 34: 69-73.
21. Ramirez, C.M.A., Gonez à Lez, N.S.A., Sauri, D.E. (2000) Effect of the temporary thermic treatment of honey on variation of the quality of same during storage. Apiacta. 35: 162-170.
22. Sahinler, N., Gul, A. (2005) Effect of heating and storage on honey Hydroxymethylfurfural and diastase activity. J Food Technol. 3: 152-157.
23. Sant'Ana, L.D.O.O., Sousa, J.P., Salgueira, F.B., Lorenzon, M.C.A., Castro, R.N. (2012) Characterization of monofloral honeys with multivariate analysis of their chemical profile and antioxidant activity. J Food Sci. 77: C135-C140.
24. Šarić, G., Marković, K., Major, N., Krapan, M., HruŠka, M., Vahĉić, N. (2012) Changes of antioxidant activity and phenolic content in acasia and multifloral honey during storage. Food technol. Biotechnol. 50: 434-441.
25. Silici, S., Sagic, O., Ekici, L. (2010) Total phenolic content, antiradical, antioxidant and antimi-

crobial activities of Rhododendron honeys. Food Chem. 121: 238-243.
26. Silva, L.R., Videria, R., Monteiro, A.P., Valentao, P., Nalepka, K. (2009) Physicochemical characteristics and mineral content. Microchem J. 93: 73-77.
27. Socha, R., Juszczak, L., Pietrzyk, S., Galkowska, D., Fortuna, T., witczak, T. (2011) Phenol profile and antioxidant properties of polish honeys. Int J Life Sci. 7: 428-436.
28. Sowndhararajan, K., Joseph, M.J., Arunachalam, K., Manian, S. (2010) Evaluation of Merremia tridentate (l.) Hallier. F. for in vitro antioxidant activity. Food Sci Biotec. 19: 663-669.
29. Terrab, A., Diez, M.J., Heredia, F.J. (2002) Characterization of Moroccan unifloral honeys by their physicochemical characteristics. Food Chem. 79: 373-379.
30. Turkmen, N., Sari, F., Poyrazoglu, E.S., Velioglu, Y.S. (2006). Effect of prolonged heating on antioxidant activity and colour of honey. Food Chem. 95: 653-657.
31. Vela, L., de Lorenzo, C., Perez, R.A. (2007) Antioxidant capacity of Spanish honeys and its correlation with polyphenol content and other physicochemical properties. J Sci Food Agric. 87: 1069-1075.

Determination of the total phenolic, flavonoid and antioxidant activity of Sabalan Honey

Kamkar, A.[1*], Khodabakhshiyan, S.[2]

[1]*Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*
[2]*Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*
(Received 15 August 2016, Accepted 2 October 2016)

Abstract:

BACKGROUND: Honey is recognized as having different biological properties including antioxidant effects. Phenolic acids and flavonoids are the main antioxidant in this apiary product. **OBJECTIVES:** In this study eight samples of Sabalan honey were screened to evaluate the antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content. **METHODS:** Antioxidant activity of honey samples was determined by DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl) method and β-carotene bleaching assay, total phenolic and flavonoid by Folin-Ciocalteu and Aluminium chloride methods, in addition, in all samples, some physicochemical parameters (pH, acidity, diastase activity, existence or nonexistence of HMF) were measured according to Iranian National Standardization N92. Data were analyzed using ANOVA (one-way). **RESULTS:** Total phenolic and flavonoid content of honeys ranged respectively from 15.71- 41.58 (mg GAE/100g honey) and 3.80-13.20 (mg QE/100g honey). Antioxidant activity was between 23.19%-94.25%, β-carotene bleaching inhibition 69.54%-85.69%, pH ranged from 3.63-3.83, Acidity 11.99-20.50 mEq/kg , diastase activity of all samples was negative except sample No.1. All samples had positive HMF results. **CONCLUSIONS:** Regarding the above results, it could be concluded that the honey samples have significant antioxidant activity. All parameters of physicochemical test were according to the international specifications except diastase and HMF tests, which may be due to improper processing and storage condition, heating treatment, old honey,etc.

Keyword: honey, DPPH, antioxidant activity, total phenol content

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Amount of total phenolic content of Sabalan honey samples. (mgGAE/100g honey). (Mean±SD). Different superscript letters indicate significant differences between the means.

Table 2. Amount of flavonoids content of Sabalan honey samples. (mg QE/100g honey). (Mean±SD). Different superscript letters indicate significant differences between the means.

Table 3. pH and acidity (mEq/kg) of Sabalan honey samples.

Graph 1. In vitro antiradical activity of Sabalan honey in DPPH assay.

Graph 2. Antioxidant activity of Sabalan honey defined as inhibition percentage through β-carotene-linoleic acid assay.

***Corresponding author's email: akamkar@ut.ac.ir, Tel: 021-61117042, Fax: 021-66933222**