Archive of SID

مجله پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۲۱ شماره ۱/ سال ۱۳۹۰

ارزیابی فعالیت ضد رادیکالی، قدرت احیاء کنندگی و ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره های فنولی یک واریته بلوط (*Q.branti var*. persica)

مریم قادری قهفرخی[۱]، علیرضا صادقی ماهونک[*۲]، مهران اعلمی[۲]، محمد قربانی[۲] و محمد حسین عزیزی [۳]

تاریخ دریافت: ۸۹/۷/۴ تاریخ پذیرش: ۹۰/۲/۱۲

۱-دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان- گروه علوم و صنایع غذائی،
۲-استادیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۳- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس
مسئول مکاتبه: E mail: sadeghiaz@yahoo.com

چکیده

علی رغم اینکه میوه بلوط از دیرباز در طب سنتی جهت درمان بسیاری از بیماری ها مورد استفاده قرار گرفته است، اما پتانسیل آنتی اکسیدانی ترکیبات فنولی این میوه به ویژه واریته‌های ایرانی ناشناخته مانده است. هدف از تحقیق حاضر ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های متانولی (۸۰٪)، اتانولی (۷۰٪) و آبی میوه یک واریته بلوط ایرانی (*Q.branti var persica*) می باشد. مقدار کل ترکیبات فنولی عصاره‌ها با روش اسپکتروفتومتری اندازه گیری و فعالیت آنتی اکسیدانی آنها با روش های میزان مهار رادیکال‌های آزاد، قدرت احیاء کنندگی و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل بررسی شد و با آنتی اکسیدان-های سنتزی BHA و BHT مقایسه گردید. عصاره متانولی بیشترین مقدار ترکیبات فنولی (۱۸۳/۹۶ میلی گرم معادل تانیک اسید در گرم عصاره)، قدرت مهار رادیکال‌های آزاد (EC_{50} =۴۹/۶۵µgr/ml)، قدرت احیاء کنندگی (EC_{50} =۲۳۰/۹ µgr/ml) و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل (EC50 =۴۲۴/۸۱ µgr/ml) را دارا بود و پس از آن عصاره های اتانولی و آبی قرار گرفتند. قدرت آنتی اکسیدان سنتزی BHT در تمامی آزمون‌های مورد بررسی به طور معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) بیشتر از عصاره‌ها بود. اگرچه فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های اتانولی و متانولی در آزمون مهار رادیکال‌های آزاد DPPP به طور قابل ملاحظه‌ای ($P<۰/۰۵$) بیشتر از BHA بود اما در آزمون فعالیت آنتی اکسیدانی کل اختلاف معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) بین آنها مشاهده نشد. بدین ترتیب می توان میوه بلوط را منبع مناسبی از آنتی اکسیدان‌های طبیعی دانست.

واژه های کلیدی: عصاره فنولی، فعالیت آنتی اکسیدانی، قدرت احیاء کنندگی، میوه بلوط

www.SID.ir

Archive of SID

Determmination of Antiradical Activity, Reducing Power and Total Antioxidant Activity of Phenolic Extracts of Acorn Fruit (*Q.branti ver persica*

M Ghaderi Ghahfarokhi[1], AR Sadeghi Mahoonak [2],M Alami[2],M Ghorbani[2] and MH Azizi[3]

Received: September 26, 2010 Accepted: May 02, 2011

[1] MSc Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
[2]Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
[3] Associate Professor, Department of Food Science and Technology, College of Agricultural, Tarbiat Modares , University, Tehran, Iran
[*]Corresponding author: Email: sadeghiaz@yahoo.com

Abstract

Despite of long use in traditional medicine, the potential of antioxidant activity of acorn fruit are still lacking. Our study goals were to assess the antioxidant potential of methanol (80%), ethanol (70%) and water extracts of Iranian acorn variety (*Q.branti var persica*). Total phenol content was evaluated spectrophotometrically and antioxidant activity was evaluated using three different methods including reducing power assay, scavenging effect on DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radicals and total antioxidant capacity and the results were compared with synthetic antioxidant, BHA and BHT. For all the methods tested the antioxidant activity was concentration dependent. Methanol extracts of acorn fruit showed the highest total phenol content (138.49 mg TAE/gr dry extract), DPPH scavenging effect (EC_{50}= 49.5 mg/ml), reducing power (EC_{50}=230.9 mg/ml) and total antioxidant activity (EC_{50}=424.81 mg/ml) compared to other methods. Results indicated that in all the methods tested, antioxidant activity of BHT was significantly higher ($P<0.05$) than extracts. Although the antioxidant activity of methanol and ethanol extracts in scavenging effect on DPPH was greater than that of the BHA, the difference was not significant in total antioxidant capacity assay ($P < 0.05$). The results indicated that acorn fruit are a potential source of natural antioxidants.The activity of the methanol and ethanol extracts in the scavenging effect on DPPH was greater than that of BHA but greater than that of a-tocophero

Keywords: Acorn Fruits, Antioxidant activity, Phenolic extract, Reducing Power

مقدمه

روغن های خوراکی حاوی مقادیر بالایی از اسیدهای چرب غیر اشباع (به ویژه اسیدهای چرب چند غیر اشباعی) بسیار مستعد به اکسیداسیون می‌باشند. اکسیداسیون لیپیدها نه تنها منجر به گسترش مزه تند در آنها می گردد بلکه با ایجاد بوی ناخوشایند و تغییرات رنگی نامطلوب، ارزش تغذیه ای و ایمنی آن را به دلیل تجزیه محصول کاهش می دهند و اثرات مضر و جبران ناپذیری را بر سلامت انسان به جای می گذارند (ژانگ و همکاران ۲۰۱۰).

در بسیاری از کشورها، به منظور تاخیر یا جلوگیری از تخریب اکسیداتیو این محصولات، آنتی اکسیدان های سنتزی نظیر بوتیلات هیدروکسی آنیزول (BHA)، بوتیلات هیدروکسی تولوئن (BHT) و ترت بوتیل هیدروکینون (TBHQ)، کاربرد گسترده ای به عنوان افزودنی های غذائی دارند. آنتی اکسیدان‌های سنتزی

www.SID.ir

Archive of SID

ارزان و در دسترس بوده و به دلیل ثبات و کارآیی بالا، مورد توجه قرار گرفته‌اند. در سال‌های اخیر استفاده از آنتی اکسیدان‌های سنتزی، همانند سایر افزودنی‌های شیمیایی، به دلیل سمیت احتمالی و سرطان‌زایی آنها، محدود شده است (شهیدی و واناسوندارا ۱۹۹۲).

امروزه بیشتر تحقیقات صورت گرفته در این زمینه بر استفاده از آنتی اکسیدان‌های جدید و بدون خطر از منابع گیاهی، حیوانی، میکروبی و غذایی، تمرکز یافته‌اند. از مهمترین منابع آنتی اکسیدانی موجود در رژیم غذایی می‌توان به توکوفرول‌ها، گلوتاتیون‌ها، اسید آسکوربیک و نمک‌های آسکوربات، کاروتنوییدها و ترکیبات فنولی اشاره کرد (پوکورنی ۲۰۰۷). از بین ترکیبات گیاهی که دارای خواص آنتی اکسیدانی می‌باشند، ترکیبات فنولی توزیع گسترده‌ای در بسیاری گیاهان دارند. ویژگی‌های آنتی اکسیدانی ترکیبات فنولی عمدتاً ناشی از قدرت احیاء کنندگی و ساختار شیمیائی آنهاست که آنها را قادر به خنثی کردن رادیکال‌های آزاد، تشکیل کمپلکس با یون‌های فلزی و خاموش کردن مولکول‌های اکسیژن یگانه و سه گانه می‌سازد. ترکیبات فنولی از طریق اهداء الکترون به رادیکال‌های آزاد واکنش‌های اکسیداسیون چربی را مهار می‌کنند (احمدی و همکاران ۲۰۰۷).

تاثیر آنتی اکسیدان‌های سنتزی و طبیعی را می‌توان با اندازه‌گیری محصولات اولیه و ثانویه‌ی پراکسیداسیون چربی‌ها در مواد غذایی و سیستم‌های بیولوژیکی ارزیابی کرد. امروزه روش‌های دیگری نیز برای ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدان‌های سنتزی و طبیعی وجود دارد. برخی از این روش‌ها عبارتند از ظرفیت جذب رادیکال‌های اکسیژن، مهار رادیکال‌های آزاد، روش رنگبری بتا کاروتن، ظرفیت آنتی اکسیدانی معادل ترولکس[1]، قدرت احیا کنندگی و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل. در هر یک از این روش‌های فوق اساس واکنش و نوع سوبسترای اکسید شونده متفاوت است، بنابراین بهتر است به منظور ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی از مجموعه‌ای از روش‌های شیمیایی و بیوشیمیایی استفاده گردد (شهیدی و همکاران ۱۹۹۴).

درخت بلوط متعلق به خانواده فاگاسه[2] و جنس کوئرکوس[3] می‌باشد. میوه‌ی این درخت عمدتاً از نشاسته تشکیل شده و پروتئین، روغن، فیبر، مواد معدنی و ویتامین‌هائی نظیر A، C و ویتامین‌های گروه B، سایر ترکیبات تشکیل دهنده‌ی آن می‌باشند. علاوه بر مصارف غذائی (استفاده از آرد آن در تهیه نان، کیک و غذاهای سنتی) از دیرباز کاربرد زیادی در طب سنتی داشته است و میوه ای گرم و خشک به شمار می‌آید (ابوتراب ۱۳۸۷). میوه‌ی بلوط حاوی مقادیر قابل توجهی از ترکیبات فعال بیولوژیکی می‌باشد که از آن جمله می‌توان به تانن، گالیک اسید، الاجیک اسید و مشتقات گالویل یا هگزا هیدروکسی دی فنوئیل اشاره کرد که تمامی این ترکیبات دارای خواص آنتی اکسیدانی هستند (راکیک و همکاران ۲۰۰۷).

در کشور ما، جنگل‌های بلوط توزیع گسترده‌ای در نواحی غرب، جنوب غرب، شمال و شمال غرب دارند و تاکنون گونه‌ها و واریته‌های زیادی از این درختان در این مناطق شناسائی شده است. هر درخت بلوط در سال‌های میوه‌دهی خود حداقل ۱۵ کیلوگرم میوه تولید می‌نماید و میزان تولید سالیانه میوه‌ی بلوط در کشور هزاران تن می‌باشد. متاسفانه این میوه‌ها به جزء استفاده‌ی محدود در خوراک دام و نیز صنایع تولید تانن، کاربرد دیگری نداشته و در جنگل بدون استفاده هدر می‌روند. هدف از تحقیق حاضر بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ی فنولی میوه‌ی بلوط با روش های مختلف و مقایسه‌ی آن با آنتی اکسیدان‌های BHA و BHT می باشد. نتایج حاصل از این تحقیق می تواند زمینه استفاده از این محصول جنگلی را در صنایع غذائی و داروسازی فراهم نماید.

مواد و روش ها

تهیه عصاره

[1] Trolux

[2] Fagaceae

[3] Quercus

www.SID.ir

Archive of SID

در این تحقیق از میوه‌ی یک واریته بلوط ایرانی به نام *Q.branti var persica* استفاده شد که از جنگل‌های بلوط استان چهارمحال و بختیاری در آبان ماه ۱۳۸۷جمع آوری گردید. میوه‌ها پس از خشک کردن در دمای محیط و جدا کردن پوست‌های چوبی و داخلی، توسط آسیاب چکشی (ایران خودساز) به صورت آرد (مش ۶۰) در آمدند. جهت تهیه عصاره فنولی از حلال های متانول ۸۰٪ (حجمی: حجمی)، اتانول ۷۰٪ (حجمی: حجمی) و آب استفاده شد. ۱۰۰ میلی‌لیتر از حلال های مربوطه به ۱۰ گرم پودرافزوده و مخلوط حاصله به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط با همزن مغناطیسی هم زده شد. پس از این مرحله، بخش جامد به وسیله کاغذ صافی معمولی جدا گردید. حلال به وسیله تبخیر کننده چرخان (مدل Laborata4000، ساخت کمپانی هایدولف) در دمای ۴۰°C تغلیظ و در نهایت عصاره‌ها توسط خشک‌کن انجمادی (Operun- FDB550 ساخت کره جنوبی) در دمای ۵۰°C- به پودر تبدیل شدند و تا زمان استفاده در ظروف غیر قابل نفوذ به هوا در فریزر ۱۸°C- قرار گرفتند (کوالسکی ۲۰۰۹). تمامی مواد مورد استفاده در این پژوهش با درجه خلوص بالا و از شرکت های مرک و سیگما تهیه شدند.

اندازه گیری مقدار کل ترکیبات فنولی عصاره ها

مقدار کل ترکیبات فنولی با روش فولین سیوکالته با روش اسلینکارد و سینگلتون (۱۹۷۷) اندازه‌گیری شد. برای این منظور ۲۰ µm از محلول عصاره با ۱/۱۶۰ml آب مقطر و ۱۰۰ µm محلول فولین سیو کالته مخلوط شد. بعد از گذشت ۱ تا ۸ دقیقه ۳۰۰ µm محلول کربنات سدیم (۲۰٪) به آنها افزوده شد. لوله‌های آزمایش درون حمام آب با دمای ۴۰° C قرار گرفته و پس از گذشت ۳۰ دقیقه جذب آنها در طول موج ۷۶۰ نانومتر قرائت گردید. جهت رسم منحنی استاندارد، از اسید تانیک استفاده شد. مقدار کل ترکیبات فنولی موجود در عصاره بر حسب معادل تانیک اسید و با استفاده از معادله به دست آمده از منحنی استاندارد محاسبه و نتایج بر حسب میلی‌گرم تانیک اسید در هر گرم عصاره پودر شده بیان شد.

۲-۳- میزان به دام اندازی رادیکال‌های آزاد DPPH

برای این منظور، محلول‌هائی با غلظت‌های مختلف (۲۰۰-۱۲/۵ میکروگرم در میلی لیتر) از عصاره‌ها و نیز آنتی اکسیدان‌های سنتزی BHT و BHA در حلال متانول آماده شدند. یک میلی‌لیتر از محلول متانولی DPPH [4](با غلظت ۰/۱ میلی مولار) به ۳ میلی‌لیتر از عصاره افزوده و مخلوط حاصله به شدت هم زده شد. لوله های آزمایش به مدت ۳۰ دقیقه در محل تاریک قرار گرفتند. بعد از این مدت میزان جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد. لازم به ذکر است در نمونه کنترل ، عصاره با ۳ میلی لیتر متانول جایگزین شد. در نهایت درصد مهار رادیکال‌های DPPH توسط عصاره با فرمول زیر محاسبه گردید.

$$\text{به دام اندازی رادیکال آزاد (٪)} = \frac{(A_c - A_s)}{A_c} \times 100$$

که در این رابطه A_c و A_s به ترتیب جذب کنترل و جذب نمونه می باشند (شیمادا و همکاران ۱۹۹۲).

قدرت احیاء کنندگی

محلول‌هائی با غلظت‌های مختلف (۵۰۰-۱۲/۵ میکروگرم در میلی لیتر) از عصاره‌های پودر شده و نیز BHA و BHT تهیه گردید. ۱ میلی‌لیتر از محلول عصاره یا آنتی اکسیدان سنتزی با ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات (pH =۶/۶) و ۲/۵ میلی‌لیتر پتاسیم فری‌سیانید (۱۰ گرم در لیتر) مخلوط شد و به مدت نیم ساعت در حمام آب با دمای ۵۰°c قرار گرفت. پس از افزودن ۲/۵ میلی‌لیتر تری کلرو استیک اسید ۱۰٪ (وزنی:حجمی) نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۶۵۰g سانتریفوژ (Centurion K2042) شدند. از محلول روئی پس از سانتریفوژ ۲/۵ میلی‌لیتر به دقت برداشته و پس از افزودن ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر، جذب نمونه‌ها در

[4] 2, 2`- diphenyl 1-2- picryl hydrazyl

www.SID.ir

Archive of SID

طول موج ۷۰۰ نانومتر قرائت گردید (یلدریم و همکاران ۲۰۰۱).

ظرفیت آنتی اکسیدانی کل

۰/۱ میلی لیتر از محلول عصاره و آنتی اکسیدان های سنتزی BHA و BHT با ۱ میلی‌لیتر از معرف (اسید سولفوریک ۰/۶ مولار، فسفات سدیم ۲۸ میلی مولار و آمونیوم مولیبدات ۴ میلی مولار) در لوله آزمایش مخلوط شد و به مدت ۱/۵ ساعت در حمام آب با دمای ۹۵ °C قرار گرفت. پس از سرد کردن، جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۹۵ نانومتر قرائت گردید. در نمونه کنترل به جای عصاره از ۰/۱ میلی لیتر متانول استفاده شد (پرایتو و همکاران ۱۹۹۹).

آنالیز آماری

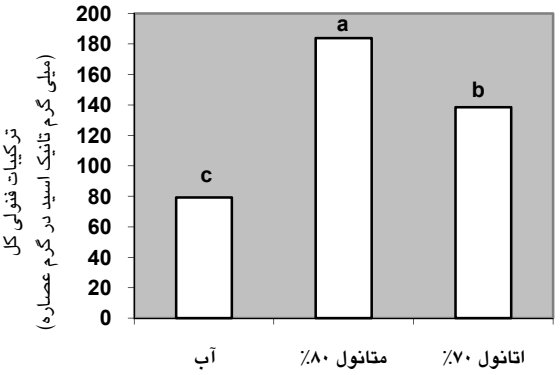
در روش‌های اندازه‌گیری ترکیبات فنولی کل، میزان به دام اندازی رادیکال‌های آزاد، قدرت احیاء کنندگی و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل، مقایسه‌ی میانگین‌های به دست آمده از سه تکرار با آزمون دانکن ($P<0/05$) بر پایه‌ی طرح کاملاً تصادفی صورت گرفت.

نتایج و بحث

مقدار کل ترکیبات فنولی

شکل ۱ مقایسه میانگین مقدار ترکیبات فنولی عصاره‌های حاصل از حلال‌های مختلف را نشان می‌دهد. نتایج آنالیز واریانس نشان داد، نوع حلال مورد استفاده جهت استخراج تأثیر معنی‌داری ($P<0/05$) بر مقدار ترکیبات فنولی عصاره‌ها دارد. در واریته مورد بررسی، بیشترین مقدار ترکیبات فنولی به ترتیب در عصاره‌های متانولی (۸۰٪)، اتانولی (۷۰٪) و آبی حاصل گردید و عصاره‌های حاصل از این نظر اختلاف معنی‌داری داشتند.

در بررسی انجام شده توسط راکیک و همکاران (۲۰۰۷) مقدار ترکیبات فنولی کل عصاره متانولی میوه بلوط گونه کوئرکوس روبور و کوئرکوس سوبور به ترتیب ۰/۲۲۳ و ۰/۲۲۹ میلی‌گرم معادل اسید گالیک در میلی‌گرم عصاره بود. به استثنای تحقیق یاد شده، هیچ گزارش دیگری در ارتباط با استخراج ترکیبات فنولی از میوه‌ی بلوط با حلال‌های مختلف در منابع علمی یافت نشد اما تحقیقات زیادی در زمینه استخراج این ترکیبات با سامانه‌های مختلف حلال از منابع گیاهی دیگر انجام شده است.



شکل ۱- مقدار کل ترکیبات فنولی عصاره های حاصل از حلال های مختلف.

حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵٪ است.

برای استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی کاکل ذرت از ۹ حلال مختلف با قطبیت متفاوت استفاده شد. مقدار ترکیبات فنولی کل عصاره‌های اتانولی، متانولی و آبی به ترتیب حاوی ۰/۱۵۷، ۰/۱۱۲ و ۰/۰۷۳٪ گزارش شد. آنها تفاوتهای مشاهده شده بین عصاره‌های مختلف را با تفاوت در قطبیت حلال مورد استفاده مرتبط دانستند و گزارش کردند حلال‌هائی با درجه قطبیت پائین نظیر هگزان، استون، بوتانول و کلروفرم نسبت به حلال‌های قطبی توانائی کمتری در استخراج این ترکیبات دارند (رومبائوآ و همکاران ۲۰۰۹). حلالیت ترکیبات فنولی بسته به نوع حلال، درجه پلیمریزاسیون آنها و بر هم کنش آنها با سایر ترکیبات موجود در بافت‌های گیاهی متفاوت است. در کل حلال‌های اتانول و متانول به صورت مخلوط با آب (۸۰-۴۰٪) توانائی بیشتری نسبت به حالت خالص در استخراج ترکیبات فنولی از بافت‌های گیاهی دارند

www.SID.ir

Archive of SID

(سوزوکی و همکاران، ۲۰۰۲). استفاده از آب به عنوان حلال استخراج، یک محیط کاملاً قطبی ایجاد می‌کند که در آن برخی از ترکیبات فنولی با درجه قطبیت پائین به میزان کمتری استخراج می‌شوند. افزودن آب به حلال‌های آلی با تشکیل یک محیط نسبتاً قطبی همراه بوده و بنابراین از استخراج مقادیر و انواع بیشتری از ترکیبات فنولی در این شرایط اطمینان حاصل می‌گردد. علاوه بر این عصاره‌ی آبی حاوی مقادیر زیادی از ناخالصی‌هائی نظیر اسیدهای آلی، پروتئین‌ها و قندهای محلول می‌باشد که می‌توانند در تشخیص و تعیین مقدار ترکیبات فنولی تداخل ایجاد نمایند (چرینوس و همکاران ۲۰۰۷).

توانایی مهار رادیکال‌های DPPH

اندازه‌گیری میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH یکی از روش‌های معتبر، دقیق، آسان و مقرون به صرفه با قابلیت تکرار پذیری بالا می‌باشد که در بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های گیاهی در شرایط آزمایشگاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد (سینگ و سینگ ۲۰۰۸). نتایج آنالیز واریانس نشان داد، نوع و غلظت عصاره‌ها و آنتی آکسیدان‌های سنتزی تاثیر معنی‌داری بر میزان مهار رادیکال‌های آزاد داشتند. هم‌چنین نتایج حاکی از آن بود که توانائی عصاره‌ها در مهار رادیکال‌های آزاد وابسته به غلظت بوده و با افزایش غلظت فعالیت ضد رادیکالی آنها افزایش می‌یابد. توانائی عصاره‌های آبی و الکلی واریته Qb در مهار رادیکال‌های آزاد DPPH در شکل ۲ نشان داده شده است. در محدوده‌ی غلظت ۵۰۰-۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بیشترین میزان مهار رادیکال‌های آزاد متعلق به BHT بود اما بقیه عصاره‌ها نسبت به آنتی اکسیدان سنتزی BHA توانائی بیشتری داشتند. در غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره‌ی آبی کمترین فعالیت مهار کنندگی را به خود اختصاص داد اما بین سایر عصاره‌ها و آنتی اکسیدان‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

در کل از بین عصاره‌های مختلف، عصاره‌ی آبی عملکرد ضعیف‌تری در ارتباط با مهار رادیکال‌های آزاد داشت. عصاره‌های متانولی و اتانولی نیز در غلظت‌های ۲۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم اختلاف معنی‌داری از این نظر با یکدیگر نداشتند. افزایش غلظت ترکیبات فنولی به طور مستقیم میزان توانائی عصاره‌های مختلف را در مهار رادیکال‌های آزاد افزایش می‌دهد. در غلظت‌های بالاتر ترکیبات فنولی به دلیل افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل موجود در محیط واکنش، احتمال اهداء هیدروژن به رادیکال‌های آزاد و به دنبال آن قدرت مهار کنندگی عصاره افزایش می‌یابد (سانچز- مورنو و همکاران ۱۹۹۹). قدرت مهار کنندگی عصاره‌های مختلف به میزان زیادی به تعداد و موقعیت گروه‌های هیدروکسیل و وزن مولکولی ترکیبات فنولی بستگی دارد. در ترکیبات فنولی با وزن مولکولی پائین‌تر گروه‌های هیدروکسیل راحت تر در دسترس قرار می‌گیرند (جونگ و همکاران ۲۰۰۶). محققین دیگری نیز توانائی عصاره‌های گیاهی مختلف را در مهار رادیکال‌های آزاد DPPH مورد بررسی قرار داده‌اند. در بررسی انجام شده توسط راکیک و همکاران (۲۰۰۷) دو گونه‌ی بلوط کوئرکوس کریس و کوئرکوس روبور از نظر میزان مهار رادیکال‌های DPPH در غلظت‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد، با افزایش غلظت عصاره متانولی از ۱۰۰- ۱۲/۵ میکرو گرم در میلی‌لیتر درصد مهار رادیکال‌های آزاد به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت. هم چنین در غلظت‌های بالا، فعالیت رادیکال‌زدائی عصاره‌ها به طور معنی دار افزایش نیافت که با نتایج به دست آمده در این بررسی مطابقت داشت.

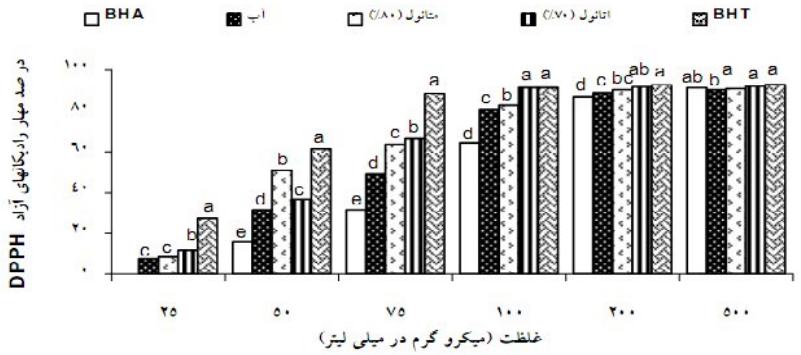
قدرت احیاء کنندگی

در این روش توانائی عصاره‌ها برای احیاء آهن سه ظرفیتی و تبدیل آن به آهن دو ظرفیتی سنجیده می‌شود. حضور عوامل احیاء کننده (آنتی اکسیدان‌ها) منجر به احیاء کمپلکس‌های فری سیانید و تبدیل آنها به فرم فروس می‌گردد که بسته به ظرفیت احیاء کنندگی عصاره‌های مورد بررسی با تغییر رنگ محلول از زرد به درجات مختلفی از رنگ‌های سبز و آبی همراه است (سوآرس و همکاران، ۲۰۰۹). نتایج آنالیز واریانس حاکی از آن بود که عصاره‌های مختلف از نظر قدرت احیاء کنندگی اختلاف

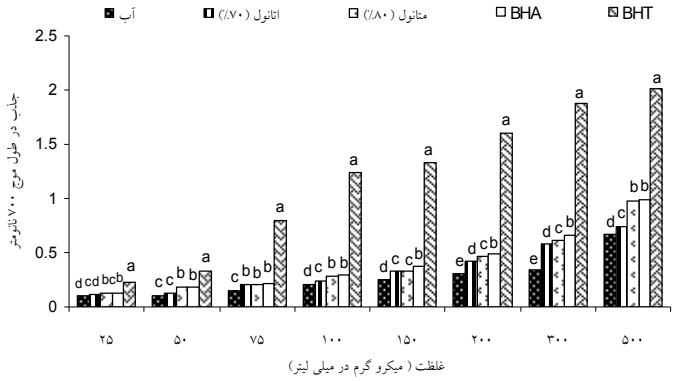
www.SID.ir

Archive of SID

معنی‌داری($P<۰/۰۵$) با یکدیگر و با آنتی اکسیدان‌های سنتزی دارند. هم‌چنین با افزایش غلظت میزان جذب محلول‌های حاوی عصاره به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت. شکل ۳ قدرت احیاء کنندگی عصاره‌های آبی و الکلی، BHA و BHT را در غلظت‌های ۵۰۰- ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر نشان می‌دهد. از بین عصاره‌های مختلف، بیشترین و کمترین خاصیت احیاء کنندگی در غلظت‌های مختلف مربوط به عصاره‌ی متانولی و آبی بود. در غلظت-های پائین (۵۰- ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) اختلاف معنی‌داری از این نظر بین عصاره‌های اتانولی و آبی مشاهده نشد. توانائی آنتی اکسیدان سنتزی BHA برای احیاء یون‌های آهن سه ظرفیتی در غلظت‌های ۱۰۰- ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر اختلاف معنی‌داری با عصاره‌ی متانولی در غلظت‌های مشابه نداشت اما با افزایش غلظت به ۳۰۰، میزان جذب نمونه‌های حاوی BHA به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت.



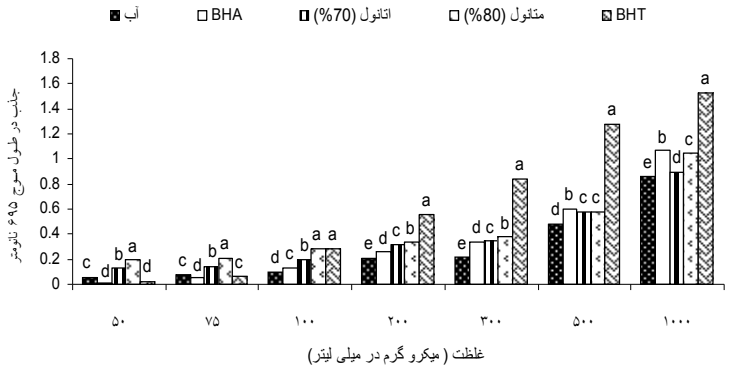
شکل ۲- مقایسه میانگین درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH غلظت‌های مختلف عصاره‌های آبی و الکلی میوه‌ی بلوط واریته‌ی کوئرکوس برانتی و آنتی اکسیدان‌های سنتزی. (حروف غیر مشابه در هر غلظت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ است.)



شکل ۳- مقایسه میانگین قدرت احیاءکنندگی غلظت‌های مختلف عصاره‌های آبی و الکلی میوه‌ی بلوط واریته‌ی کوئرکوس برانتی و آنتی اکسیدان‌های سنتزی . (حروف غیر مشابه در هر غلظت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ است.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۴- مقایسه میانگین ظرفیت آنتی اکسیدانی غلظت‌های مختلف عصاره‌های آبی و الکلی میوه‌ی بلوط واریته‌ی کوئرکوس برانتی و آنتی اکسیدان‌های سنتزی. (حروف غیر مشابه در هر غلظت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ است.)

میزان جذب محلول‌های حاوی عصاره‌های اتانولی در غلظت‌های ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و بالاتر از آن به طور قابل ملاحظه‌ای کمتر از عصاره متانولی بود. در غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تنها عصاره‌ی متانولی این واریته توانست با BHA رقابت نماید. میزان فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیبات فنولی مختلف با توجه به ساختار شیمیائی آنها متفاوت است. علاوه بر این در طی فرآیند استخراج ترکیبات دیگری که حلالیت بالائی در آب و محلول‌های الکلی دارند، همراه با ترکیبات فنولی وارد عصاره می‌شوند. از آنجائی‌که برخی از این ترکیبات نظیر اسید اسکوربیک، اسیدهای آمینه، پروتئین‌ها و قندها خود اهداء کننده‌ی الکترون می‌باشند بنابراین در صد بیشتری از یون‌های آهن سه ظرفیتی با جذب الکترون احیا شده و بنابراین شدت جذب محلول افزایش می‌یابد (عرب شاهی ۲۰۰۶).

فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های متانولی، اتانولی و استونی دانه‌های جو نیز با ۲ روش مهار رادیکال‌های آزاد و قدرت احیاء کنندگی مورد بررسی قرار گرفت و با اسید آسکوربیک و BHT مقایسه شد. نتایج حاکی از آن بود که در هر دو روش به ترتیب اسید اسکوربیک، BHT و عصاره استونی بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی را داشته و اختلافی بین عصاره‌های اتانولی و متانولی مشاهده نگردید. هم‌چنین مقایسه میزان ترکیبات فنولی عصاره‌ها نشان داد، عصاره استونی، اتانولی و متانولی به ترتیب حاوی بیشترین مقدار ترکیبات فنولی و پروآنتوسیانیدین می‌باشند (لیو و یائو ۲۰۰۷).

ظرفیت آنتی اکسیدانی کل

اساس کار در این روش احیاء مولیبدن ۶ ظرفیتی به مولیبدن ۵ ظرفیتی در محیط اسیدی و دمای بالا است. این واکنش با تشکیل کمپلکس‌های سبز رنگ فسفو مولیبدن همراه بوده که در طول موج ۶۹۵ نانومتر دارای حداکثر میزان جذب می‌باشند. این کمپلکس‌ها بسیار پایدار بوده و با حلال مورد استفاده جهت استخراج ترکیبات فنولی تحت تاثیر قرار نمی‌گیرد. عصاره‌هائی که شدت جذب بالاتری در این طول موج دارند، ظرفیت آنتی اکسیدانی بیشتری از خود نشان می‌دهند (پریتو و همکاران ۱۹۹۹). نتایج آنالیز واریانس نشان داد، اختلاف معنی‌داری بین ظرفیت آنتی اکسیدانی کل عصاره‌های مختلف در سطح احتمال ۵٪ وجود دارد. شکل ۴ ظرفیت آنتی اکسیدانی کل عصاره‌های آبی و الکلی، BHA و BHT را در غلظت‌های ۱۰۰۰- ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر نشان می‌دهد. با توجه به شکل، در غلظت‌های پائین شدت جذب عصاره‌های متانولی و اتانولی به طور معنی‌داری بیشتر از عصاره آبی، BHA و BHT بود. اما در غلظت‌های بالاتر از ۱۰۰ میکروگرم در

www.SID.ir

Archive of SID

میلی لیتر آنتی اکسیدان سنتزی BHT ظرفیت آنتی اکسیدانی بیشتری نسبت به BHA و عصاره‌ها نشان داد. عصاره‌ی متانولی در اغلب غلظت‌های مورد بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی بیشتری نسبت به عصاره اتانولی نشان داد (شکل ۴). عرب شاهی و اروج (۲۰۰۷) مقدار ترکیبات فنولی و ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های مختلف برگ شاه توت را مورد بررسی قرار دادند. ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های متانولی، استونی، آبی و BHT به ترتیب ۱/۳۹۳، ۱/۳۸۶، ۰/۶۶ و ۳/۹۲۱ معادل میکرومول آلفا توکوفرول در گرم عصاره بود. هم‌چنین مقدار ترکیبات فنولی به ترتیب درعصاره‌ی متانولی> استونی> آبی بود. نتایج به دست آمده در این تحقیق از نظر وجود ارتباط بین مقدار ترکیبات فنولی عصاره‌ها با ظرفیت آنتی اکسیدانی آنها با نتایج به دست آمده توسط محققین دیگر مطابقت داشت. پراساد و همکاران (۲۰۰۹) با بررسی ظرفیت آنتی اکسیدانی کل ۵ گونه‌ی مختلف دارچین گزارش کردند عصاره‌های اتانولی تمامی گونه‌ها در غلظت‌های مختلف ظرفیت آنتی اکسیدانی بالائی داشتند. همچنین نتایج نشان داد، وجود مقادیر بیشتری از ترکیبات فنولی در عصاره واریته‌ی زیلانیکا با ظرفیت آنتی اکسیدانی بالای آن مرتبط است.

مقادیر EC_{50} در روش های مختلف بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی

جدول۱ مقادیر EC_{50} (میکرو گرم عصاره در میلی لیتر) عصاره‌ها و آنتی اکسیدان‌های سنتزی را در روش-های مختلف ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی نشان می دهد. منظور از EC_{50} در روش مهار رادیکال‌های آزاد DPPH، غلظتی از عصاره یا آنتی اکسیدان های سنتزی است که در آن غلظت نیمی از رادیکال های آزاد موجود در محیط واکنش مهار شوند. در روش قدرت احیاء کنندگی و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل نیز منظور از EC_{50} غلظتی از عصاره یا آنتی اکسیدان های سنتزی است که به ترتیب در طول موج‌های ۷۰۰ و ۶۹۵ نانومتر جذبی معادل ۰/۵ را دارا باشند. همانطور که در جدول دیده می‌شود، کمترین میزان EC_{50} متعلق به آنتی اکسیدان سنتزی BHT بود. عصاره های متانولی، اتانولی و آبی هر سه نسبت به آنتی اکسیدان‌های سنتزی BHA قوی‌تر بودند. بیشترین میزان EC_{50} به ترتیب متعلق به آنتی اکسیدان سنتزی BHA و عصاره‌ی آبی بود که اختلاف معنی‌داری ($P<0/05$) از این نظر بین آنها مشاهده گردید.

جدول ۱- مقادیر EC_{50} عصاره‌ها و آنتی اکسیدان‌های سنتزی در روش‌های مختلف ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی.

عصاره/آنتی اکسیدان سنتزی	EC_{50} (میکروگرم در میلی لیتر)		
	مهارراديكال-های آزاد	قدرت‌احیاء کنندگی	ظرفیت‌آنتی اکسیدانی کل
متانولی	۴۹/۶۵ ^{d}	۲۳۰/۹ ^{c}	۴۲۴/۸۱ ^{b}
اتانولی	۶۱/۹۹ ^{c}	۲۴۲/۴۴ ^{b}	۴۳۶/۲۱ ^{b}
آبی	۷۵/۹۶ ^{b}	۳۹۸/۳۸ ^{a}	۵۱۶/۶۷ ^{a}
BHA	۸۹/۴۶ ^{a}	۲۰۳/۵۵ ^{d}	۴۲۲/۶۹ ^{b}
BHT	۴۱/۷۳ ^{e}	۵۹/۱۵ ^{e}	۱۷۷/۴۷ ^{c}

حروف غیر مشابه در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ می‌باشد.

تفاوت‌های مشاهده شده بین EC_{50} عصاره‌های مختلف در این تحقیق را می‌توان به تفاوت در مقادیر ترکیبات فنولی آنها نسبت داد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت، میزان ترکیبات فنولی عصاره‌های آبی و الکلی، به طور واضحی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها را تحت تاثیر قرار می-دهد. ضریب هم‌بستگی معکوسی بین مقدار ترکیبات فنولی عصاره‌ها با EC_{50} آنها در آزمون مهار رادیکال های آزاد به دست آمد ($r = -0/99$ ،$P=0/02$) (جدول ۲) که خود موید این است که عصاره‌هائی که حاوی مقادیر بیشتری از ترکیبات فنولی می‌باشند، در غلظت‌های پائین توانائی بیشتری در مهار رادیکال‌های آزاد از خود نشان می‌دهند. نتایج مقایسه‌ی میانگین نشان داد، اختلاف معنی‌داری بین مقادیر EC_{50} عصاره‌های مختلف در سطح احتمال ۵٪ وجود دارد (جدول ۱) با توجه به جدول، بیشترین میزان EC_{50} در این روش به ترتیب متعلق به عصاره آبی، اتانولی

www.SID.ir

Archive of SID

و متانولی واریته Qb ، BHA و در نهایت BHT بودند. آنالیز همبستگی بین میزان ترکیبات فنولی و مقادیر EC_{50} عصاره‌های مختلف، همبستگی بالائی بین دو ویژگی مورد بررسی نشان نداد (جدول ۲).

در کل ویژگی‌های احیاء کنندگی با حضور ترکیبات اهداء کننده‌ی الکترون همراه است. به عبارتی با افزایش میزان ترکیبات فنولی موجود در عصاره، قدرت احیاء کنندگی آن افزایش می‌یابد در نتیجه عصاره قادر خواهد بود با اهداء الکترون یا اتم‌های هیدروژن واکنش‌های زنجیری تشکیل رادیکال‌های آزاد را شکسته و اکسیداسیون چربی را به تاخیر بیاندازد. واکنش ترکیبات احیاء کننده با پیش-سازهای پراکسید نیز یکی دیگر از مکانیسم‌هائی که ترکیبات آنتی اکسیدانی و احیاء کننده از تشکیل پراکسید در روغن‌ها و چربی‌ها جلوگیری می‌کنند (کوماران و کاروناکاران ۲۰۰۷).

جدول ۲- نتایج آنالیز هم بستگی بین روش‌های مختلف ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی.

	ترکیبات فنولی کل	EC_{50} (DPPH)	EC_{50} (RP)	EC_{50} (TAOC)
ترکیبات فنولی کل	۱	-./۹۹*	-۰/۸۷^{ns}	- ۰/۹۴^{ns}
EC_{50} (DPPH)		۱	۰/۸۵ ^{ns}	۰/۹۳ ^{ns}
EC_{50} (RP)			۱	۰/۹۸^{ns}
EC_{50} (TAOC)				۱

r : ضریب هبستگی

Ns: عدم معنی دار بودن همبستگی * : معنی دار بودن هبستگی در سطح احتمال ۵٪

طبق نتایج به دست آمده، در روش ظرفیت آنتی اکسیدانی کل نیز آنتی اکسیدان سنتزی BHT کمترین میزان EC_{50} و در نتیجه بیشترین ظرفیت آنتی اکسیدانی را داشت و پس از آن عصاره متانولی و اتانولی و BHA قرار داشتند که از این نظر اختلاف معنی داری با یکدیگر نداشتند (۰/۰۵ >P). در این آزمون، همبستگی بین مقدار ترکیبات فنولی و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل دیده نشد. در یک تحقیق، فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های رزماری حاوی مقادیر متفاوتی از کارنوزیک اسید را با روش‌های قدرت احیاء کنندگی و میزان مهار رادیکال‌های آزاد مورد بررسی قرار دادند. عصاره‌های CA۲۵، CA۶۰ و CA۹۸ به ترتیب حاوی ۲۴/۹، ۶۰/۵ و ۹۸/۳٪ کارنوزیک اسید بودند. طبق نتایج به دست آمده مشخص شد قدرت احیاء کنندگی اسید آسکوربیک > CA۹۸ > TBHQ > BHA > CA۶۰ > BHT > CA ۲۵ و مقادیر EC50 مربوط به آزمون مهار رادیکال های آزاد BHT > CA۲۵ > CA ۶۰ > BHA > TBHQ > CA98 بود (ژانگ و همکاران ۲۰۱۰). نتایج به دست آمده در این بررسی نتایج حاصل در این تحقیق را مبنی بر وجود رابطه بین مقدار ترکیبات فنولی با فعالیت انتی اکسیدانی را تائید می نماید.

نتایج به دست آمده در این بررسی نشان داد، میوه‌ی بلوط به واسطه‌ی داشتن مقادیر زیادی از ترکیبات فنولی دارای پتانسیل آنتی اکسیدانی بالائی است. افزودن عصاره‌ی فنولی این میوه به روغن‌های خوراکی سبب افزایش پایداری آنها در شرایط مساعد برای اکسیداسیون می گردد. با توجه به اثرات نامطلوب آنتی اکسیدان‌های سنتزی بر سلامت انسان، کاربرد عصاره‌ی بلوط به عنوان جایگزین این ترکیبات در مواد غذائی حاوی چربی پیشنهاد می‌گردد.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع مورد استفاده

ابوتراب ن، ۱۳۸۷. بررسی خواص و ترکیب آرد بلوط و امکان بهبود کیفیت نان حاصل از آن. پایان نامه کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان.

Ahmadi F, Kadivar M and Shahedi M, 2007. Antioxidant activity of Kelussia odoratissima Mozaff in model and food systems. Food Chemistry 105: 57-64.

Arabshahi DS and Urooj A, 2006. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica L*.) leaves. Food Chemistry 102: 1233-1240.

Arabshahi DS, 2006. Studies on selected plant extracts with reference to their nutritional and pharmacological characteristics, PhD Thesis. University of Mysore, Department of Studies in Food Science and Nutrition.

Chirinos R, Rogez H, Campos D, Pedreschi R and Larondelle Y, 2007. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz and Pavon)**.** Separation and Purification Technology 55: 217-225.

Jung CH, Seog HM, Choi IW, Park MW and Cho HY, 2006. Antioxidant properties of various solvent extracts from wild ginseng leaves. LWT 39: 266-274.

Kowalski R, 2009. *Silphium L*. extracts composition and protective effect on fatty acids content in sunflower oil subjected to heating and storage. Food Chemistry 112: 820-830.

Kumaran A and Karunakaran RJ, 2007. In vitro antioxidant ctivities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. LWT 40: 344-352.

Liu Q and Yao H, 2007. Antioxidant activities of barley seeds extracts. Food Chemistry 102: 732-737.

Pokorny J, 2007. Are natural antioxidants better and safer than synthetic antioxidant?. European Journal of Lipid Science and thechnology 109: 629-642.

Prasad KN, Yang B, Dong X, Jiang G, Zhang H, Xie H and Jiang Y, 2009. Flavonoid contents and antioxidant activities from *Cinnamomum* species. Innovative Food Science and Emerging Technologies 10: 627-632.

Prieto P, Pineda M and Aguilar M, 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. Analytical Biochemistry 269: 337-341.

Rakic S, Petrovic S, Kukic J, Jadranin M, Tesevic V, Povrenovic D and Siler-Marinkovic S, 2007. Influence of thermal treatment on phenolic compouds and antioxidant properties of oak acorns from Serbia. Food Chemistry 104: 830-834.

Rumbaoa RGO, Cornago DF and Geronimo IM, 2009. Phenolic content and antioxidant capacity of Philippine potato (*Solanum tuberosum*) tubers. Journal of Food Composition and Analysis 22: 546-550.

Sanchez-Moreno C, Larrauri JA and Saura-Calixto F, 1999. Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. Food Research International 32:407–412.

Shahidi F and Wanasundara PKJPD, 1992. Phenolic antioxidant. Critical Reviews in Food Science and Nutritions32:67-103.

Shahidi F, Wanasundara UN and Amarowicz R, 1994. Natural antioxidant from low pungency mustard flour. Food Research International 27: 489-493.

www.SID.ir

Archive of SID

Shimada K, Fujikawa K, Yahara K and Nakamura T, 1992. Antioxidative properties of xanthin on autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. Journal of Agricultural and Food Chemistry 40: 945-948.

Singh S and Singh RP,2008. In Vitro Methods of Assay of Antioxidants: An Overview. Food Reviews International 24: 392-415.

Slinkard K and Singleton VL, 1977. Total phenol analysis; automation and comparison with manual methods. American Journal of Enology and Viticulture 28: 49-55.

Soares AA, Souza CGM, Daniel FM, Ferrari GP, Costa SMG and Peralta RM, 2009. Antioxidant activity and total phenolic content of Agaricus brasiliensis (*Agaricus blazei Murril*) in two stages of maturity. Food Chemistry 112: 775-781.

Suzuki M, Watanabe T, Miura A, Harashima E, Nakagawa Y and Tsuji K, 2002. An extraction solvent optimum for analyzing polyphenol contents by Folin-Denis assay. Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi 49: 507-511.

Yildirim A, Mavi A and Kara AA, 2001. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of Rumex crispus L. extracts. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49: 4083-4089.

Zhang Y, Yang L, Zu Y, Che X, Wang F and Liu F, 2010. Oxidative stability of sunflower oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during accelerated storage. Food Chemistry 118: 656-662.

www.SID.ir