

شناسایی ترکیبات فنولی عصاره برگ درخت نیم به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و ارزیابی قدرت آنتی‌اکسیدانی آنها

فاطمه رحمانی^{۱*}، محمد حسین حداد خداپرست^۲، امیر حسین الهامی راد^۳ و فرهاد خانزاده^۴

تاریخ دریافت: ۹۲/۴/۴ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۰/۹

^۱ دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار

^۲ استاد گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه فردوسی مشهد

^۳ استادیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار

^۴ دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار

* مسئول مکاتبه: E-mail: f1991.rahmani@yahoo.com

چکیده

عصاره‌گیری از برگ درخت نیم (*Azadirachta indica L.*) با منشاء کشور هندوستان، با استفاده از دو حلال متانول ۸۰٪ و آب و به سه روش دکوکشن، پرکولاسیون و ماسریشن انجام گردید. تعیین محتوی کل ترکیبات فنولی عصاره‌ها به روش فولین سیو کالتیو نشان می‌داد که استفاده از متانول ۸۰٪ به مدت ۷ روز (روش ماسریشن) بیشترین استخراج ترکیبات فنولی را سبب خواهد شد. این در حالی است که تعیین میزان روبش رادیکال آزاد عصاره‌ها به روش DPPH نشان می‌داد که عصاره بدست آمده با استفاده از متانول ۸۰٪ به مدت ۲۴ ساعت (روش پرکولاسیون) دارای بیشترین قدرت روبش رادیکال‌های آزاد بوده و به عنوان موثرترین عصاره در نظر گرفته می‌شود. تعیین هویت ترکیبات فنولی موجود در عصاره مذکور به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا بصورت کمی و کیفی نشان می‌داد که نیمبولید با ۲۸۹۶/۰۵ میلی گرم به ازاء ۱۰۰ گرم عصاره، عمده‌ترین لیمونوید تری‌ترپن و پس از آن اسیدهای فنولی و ۲ و ۳-دهیدروسالانول به ترتیب با ۶۳۵/۳۸ و ۵۳۱/۹۴ میلی گرم به ازاء ۱۰۰ گرم عصاره عمده‌ترین ترکیبات فنولی این عصاره هستند. نتایج تست گرمخانه‌گذاری (۱۳ روز، دمای ۶۰°C) به منظور بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره بدست آمده به روش پرکولاسیون نشان می‌داد که نمونه روغن سویا با غلظت ۲۰۰۰ ppm عصاره، بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را تا روز چهارم در مهار تشکیل محصولات اولیه اکسیداسیون داشته در حالی که این غلظت قادر بود تشکیل محصولات ثانویه اکسیداسیون را تا روز سیزدهم مهار نماید.

واژگان کلیدی: برگ درخت نیم، ترکیبات فنولی، فولین سیو کالتیو، فعالیت آنتی رادیکالی، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

مقدمه

امروزه در راستای حذف و یا کاهش ترکیبات شیمیایی در مواد غذایی، تحقیقات زیادی برای جایگزین کردن مواد شیمیایی با طبیعی انجام شده است. در همین زمینه تلاش‌های متعددی برای یافتن آنتی‌اکسیدانهای طبیعی از منابع گیاهی صورت گرفته است (میلان سوهاج ۲۰۰۴، آنون ۱۹۹۷، وی ژنگ و شیو ونگ ۲۰۰۱) که این عمدتاً بدلیل مشکلات و مسائل ایمنی و همچنین سمیت آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک مثل BHA و BHT می‌باشد که بطور معمول در غذاهای حاوی چربی استفاده می‌شوند (ریزارد آمارویچ و همکاران ۲۰۰۰، جولیا هوول ۱۹۸۶، ن ایگو ۱۹۸۶). تاکنون آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی بسیاری از بخش‌های مختلف گیاهان جداسازی شده اند (ناراسیمان راماراسنام و همکاران ۱۹۹۵، می یائه شون و همکاران ۲۰۰۳، ماهیندا وتاسینگ و فریدون شهیدی ۱۹۹۹). از جمله آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی که بطور گسترده‌ای در سلسله گیاهان توزیع شده اند، ترکیبات فنولی را می‌توان نام برد. تمام انواع فنولی‌ها دارای خاصیت روبش رادیکال آزاد بوده و دارای پتانسیل آنتی‌اکسیدانی هستند (دوناتا باندونین و میخائیل مورکوویچ ۲۰۰۲).

درخت نیم با نام علمی آزادیراچتا ایندیکا متعلق به خانواده ملیاسه، بومی شبه قاره هند و جنوب شرق آسیا است (پراساد ۲۰۰۶). توزیع این گونه در ایران در سواحل جنوبی می‌باشد (جعفری و همکاران ۲۰۱۲). گل‌های این درخت از ماه‌های فروردین تا خرداد شکوفا شده و میوه‌های آن در ماه‌های خرداد تا مرداد به ثمر می‌رسند (پراساد ۲۰۰۶). برگ‌های درخت نیم دارای طول ۷ و پهنای ۲/۵ سانتی متر بوده و ترکیباتی همچون کوئرتستین و نیمبواسترول به همراه تعدادی لیمونوئید (نیمبین و مشتقاتش) در آن شناسایی شده است. ترکیبات برگ نیم شامل ۷/۱٪ پروتئین، ۲۲/۹٪ کربوهیدرات و مواد معدنی مختلف می‌باشد. سه ترکیب فعال نیم شامل نیمبین، نیمبیدین و نیمبینون هستند که

این ترکیبات همگی از یک ترپن تتراسیکلیک مشتق می‌شوند. از دیگر ترکیبات نیم می‌توان به لیمونیدهای تلخ همچون آزادیراچتین، ملنونتریول و سالانین اشاره کرد (تران دانگ ژوان و همکاران ۲۰۰۴).

تاکنون تحقیقات زیادی در ارتباط با مشخص نمودن فعالیت آنتی‌اکسیدانی بخش‌های مختلف درخت نیم به انجام رسیده است که نشان دهنده اثر آنتی‌اکسیداتیو بالای این گیاه می‌باشد. سیسی ساران و همکاران اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های برگ، میوه، گل و پوست ساقه درخت *Azadirachta indica A. Juss Var. Siamensis* Valetton, *Meliaceae* را با استفاده از سه روش DPPH، فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل و ممانعت از پراکسیداسیون لیپید در محیط بیولوژیک با استفاده از TBARS تعیین نمودند (پونگتپ سیسی ساران و همکاران ۲۰۰۵). همچنین این پژوهشگر و همکارانش اثرات آنتی‌اکسیداتیو برگ گونه‌های مختلف گیاه *Azadirachta* با منشاء استان‌های مختلف کشور تایلند را از طریق تعیین محتوی کل ترکیبات فنولی و تعیین میزان حذف رادیکال آزاد عصاره‌های آبی به روش رادیکال پایدار و با استفاده از احیاء نمک فرمی تعیین نمودند (پونگتپ سیسی ساران و همکاران ۲۰۰۷). مانی کاندان و همکاران فعالیت روبش رادیکال آزاد، پتانسیل احیاء کنندگی و محتوی کل ترکیبات فنولی عصاره اتانولی، فراکسیون اتیل استات، و فراکسیون متانولی برگ گیاه نیم را تعیین نمودند. همچنین ترکیبات عمده فراکسیون‌های مختلف این برگ به روش HPLC تعیین گردید (مانیکاندان و همکاران ۲۰۰۸). سلطانا و همکاران فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های مختلف متانولی ۸۰٪، اتانولی ۸۰٪ و استونی ۸۰٪ پوست چهار گونه مختلف درخت نیم را از طریق تعیین کل محتوی فنولی و کل محتوی فلاونوئیدی و همچنین تعیین ظرفیت روبش رادیکال آزاد ارزیابی نمودند (بشرا سلطانا و همکاران ۲۰۰۷). راندمان عصاره‌گیری از برگ درخت نیم با ۶ روش دکوکشن، ماسریشن، پرکولاسیون،

روش دکوکشن

پودر برگ تهیه شده (۱۰ g) به مدت ۶ ساعت با ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر و در زیر کندانسور جوشانده، سپس بوسیله قیف بوخنر و با کاغذ واتمن شماره ۴۱ صاف شد. در ادامه ابتدا در دمای 40°C در تبخیر کننده چرخان تغلیظ (Heidolph, Germany) و سپس در آون تحت خلا (Labtech, Korea) و در همان دما تا رسیدن به وزن ثابت خشک شد (پونگتپ سیسی ساران و همکاران ۲۰۰۶، پونگتپ سیسی ساران و همکاران ۲۰۰۷). پودر بدست آمده در ظروف شیشه ای درب بسته و در دمای یخچال تا زمان انجام آزمایشات نگهداری و راندمان عصاره گیری به روش گراویمتری تعیین شد.

روش پرکولاسیون

پودر برگ تهیه شده (۱۰ g) به مدت ۲۴ ساعت در مجاورت متانول ۸۰٪ (۱:۲۰ W/V) قرار گرفت. مابقی مراحل مانند روش قبل انجام شد (پونگتپ سیسی ساران و همکاران ۲۰۰۶).

روش ماسریشن

پودر برگ تهیه شده (۱۰ g) به مدت ۷ روز در مجاورت متانول ۸۰٪ (۱:۲۰ W/V) قرار گرفت. مابقی مراحل مانند روش دکوکشن انجام شد (پونگتپ سیسی ساران و همکاران ۲۰۰۶).

محتوی کل ترکیبات فنولی به روش فولین سیوکالتیو
کل محتوی فنولی به صورت رنگ سنجی و با روشی که توسط سینگلتون و روسی اصلاح شده است تعیین شد (ول سینگلتون و ج ا روسی ۱۹۶۵). مختصراً؛ $500 \mu\text{L}$ محلول فنولی (عصاره با غلظت ۵۰۰ میلی گرم به ازاء کیلوگرم و یا غلظت های ۱۰-۸۰ میلی گرم اسید کافئیک در کیلوگرم متانول ۵۰٪ (نونزیا سیسکو و همکاران ۲۰۰۸)) با $2/5$ میلی لیتر واکنشگر فولین سیوکالتیو که ۱۰ برابر با آب مقطر رقیق شده است مخلوط شده، ۲ میلی لیتر محلول $7/5$ ٪ کربنات سدیم افزوده شده و در دمای 45°C به مدت ۱۵ دقیقه گرمخانه گذاری گردید. در

سوکسله، خشک کردن انجمادی و خشک کردن افشانه‌ای، ظرفیت روبش رادیکال آزاد آن را به روش DPPH و همچنین ترکیبات فنولی موجود در عصاره بدست آمده به روش دکوکشن را به روش کروماتوگرافی لایه نازک تعیین نمودند (پونگتپ سیسی ساران و همکاران ۲۰۰۶).

هدف این پژوهش، مقایسه روش های مختلف عصاره گیری از برگ درخت نیم از طریق بررسی روبش رادیکال های آزاد DPPH، تعیین محتوی کل ترکیبات فنولی آنها به روش فولین سیوکالتیو و تعیین کمی و کیفی ترکیبات فنولی به روش HPLC در موثرترین روش عصاره گیری می باشد. علاوه بر این، از طریق گرمخانه گذاری و پایش اندیس های پراکسید و تیوباربتوریک اسید در یک دوره زمانی ۱۳ روزه، روند تاثیر موثرترین عصاره در به تاخیر انداختن اکسیداسیون روغن سویای تصفیه شده و بدون آنتی اکسیدان بررسی می شود.

مواد و روش ها

مواد شیمیایی

کلیه مواد شیمیایی و حلال های مورد استفاده در این تحقیق از شرکت مرک آلمان و رادیکال آزاد DPPH از شرکت سیگما آمریکا تهیه شدند. در تمام مراحل آزمایشات از آب دوبر تقطیر استفاده شد.

تهیه عصاره

برگ های تازه درخت نیم در نیمه دوم خرداد سال ۱۳۸۸ از ایالت اوتار پرادش در شمال کشور هندوستان جمع آوری و بلافاصله به صورت لایه نازک در سایه خشک، با خرد کن کنوود (CG ۱۰۰) خرد و تا زمان انجام آزمایش در بطری های شیشه ای درب بسته نگهداری شدند.

که در این رابطه:

$OD_{control}$ جذب کنترل، OD_{Sample} جذب نمونه و RSA میزان فعالیت روبش رادیکال‌های آزاد بوده و بیانگر فعالیت آنتی‌اکسیدانی و درصد بازدارندگی ترکیب آنتی‌اکسیدان می‌باشد (پراکاش شارما و تج بات ۲۰۰۹).

گرمخانه گذاری

جهت تعیین قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره های بدست آمده در به تاخیر انداختن شروع اکسیداسیون در روغن سویا؛ غلظت های ۸۰۰، ۱۴۰۰ و ۲۰۰۰ ppm (میلی گرم عصاره به ازاء کیلوگرم) از عصاره بدست آمده به روش پرکولاسیون به عنوان موثرترین عصاره در روبش رادیکال های آزاد، به روغن سویای تصفیه، رنگ بری شده و فاقد آنتی‌اکسیدان افزوده شد و طی ۱۳ روز در دمای $60^{\circ}C$ ، اندیس پراکسید به عنوان شاخص محصولات اولیه اکسیداسیون در روزهای ۰، ۴، ۸ و ۱۲ و اندیس ۲- تیوباربیتریک اسید به عنوان شاخص محصولات ثانویه اکسیداسیون در روزهای ۰، ۵، ۹ و ۱۳ تعیین شدند. نظر به اینکه ترکیبات پلی فنولی موجود در عصاره حلالیت کمی در روغن دارند و نیز با توجه به سمیت متانول، در این تحقیق از پروپیلن گلیکول به عنوان حلال پودر حاصل از عصاره‌گیری استفاده شد. ظروف نمونه، شیشه های قهوه ای رنگ به حجم ۱۲۰ میلی‌لیتر بودند که قبل از آزمایش به منظور حذف عوامل پرواکسیدان تا حد امکان با آب مقطر و محلول ۰/۵ درصد EDTA شستشو داده شده و سپس در $180^{\circ}C$ خشک گردیدند.

اندیس پراکسید

طبق استاندارد ایران به شماره ۴۱۷۹ تعیین گردید (استاندارد ملی ایران (شماره ۴۱۷۹) (۱۳۷۷).

اندیس تیوباربیتریک اسید

ابتدا ۳ گرم چربی در ۱۰ میلی لیتر کلروفرم حل شده و سپس ۱۰ میلی لیتر محلول کار (محلول ۰/۰۷٪ اسید تیوباربیتریک در آب که با هم حجمش اسید استیک گلاسیال مخلوط شده است) به آن اضافه گردید. در

نهایت جذب در طول موج 740 nm توسط اسپکتروفتومتر UV-Vis شیمادزو مدل UV ۱۲۰-۰۲ قرائت گردید. نتایج بصورت میلی گرم اکی والان های اسید کافئیک به ازاء کیلوگرم ماده خشک بیان می‌گردد. فعالیت آنتی رادیکالی به روش روبش رادیکال آزاد DPPH.

با توجه به مطالعات قبلی (پراکاش شارما و تج بات ۲۰۰۹) مشخص شد که دامنه دقت اندازه گیری های اسپکتروفتومتری در محدوده جذب $0.768-0.221$ است که معادل عبور ۶۰-۲۰٪ است (ج ه آیرس ۱۹۴۹) و این میزان متناظر با غلظت های $70-25\ \mu M$ DPPH است. با توجه به این موارد غلظت های متفاوت DPPH ($63-13\ \mu M$) در متانول تهیه شده و ارتباط خطی بین غلظت رادیکال و جذب تعیین شد (د ویلانو و همکاران ۲۰۰۶). در نهایت غلظت $50\ \mu M$ به عنوان بهترین غلظت DPPH انتخاب شد (ه ج سلوان و س جی ویلیامس ۱۹۹۷، ج ه آیرس ۱۹۴۹).

ابتدا محلول های استاندارد BHT در متانول در غلظت های مختلف ۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۹۰ میکرومولار و یا غلظت های ۰، ۲، ۴، ۶، ۱۰، ۱۴ و ۱۸ ppm (میلی گرم عصاره به ازاء کیلوگرم) عصاره های دکوکشن و ماسریشن و غلظت های ۰، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰ و ۱۲ ppm (میلی گرم عصاره به ازاء کیلوگرم) عصاره پرکولاسیون تهیه گردید. یک میلی لیتر محلول ۲۰۰ میکرومولار DPPH در متانول به ۳ میلی لیتر محلول متانولی BHT و یا عصاره با غلظت های فوق اضافه گردید. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای $30^{\circ}C$ گرمخانه گذاری و در نهایت به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر، جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر در برابر سل حاوی متانول قرائت شد (پراکاش شارما و تج بات ۲۰۰۹). درصد فعالیت روبش رادیکال های آزاد (RSA) با استفاده از فرمول شماره ۱ محاسبه گردید.

فرمول شماره ۱:

$$:RSA = \frac{OD_{Control} - OD_{Sample}}{OD_{Control}} \times 100$$

نتایج و بحث

راندمان عصاره‌گیری

راندمان عصاره‌گیری از برگ درخت نیم در روش های دکوکشن، پرکولاسیون و ماسریشن بترتیب ۱/۱±۰/۱۱، ۱۲/۳±۰/۱ و ۱۶/۸۱±۰/۰۰۱ درصد ($\frac{W}{W}$) تعیین گردید. نتایج آنالیزهای آماری نشان می‌دهند که عصاره‌ها از لحاظ راندمان عصاره‌گیری با یکدیگر اختلاف معنی داری داشته ($P<0/05$) و بیشترین راندمان مربوط به روش ماسریشن می باشد. علت را می توان در اثر متانول و همچنین مدت زمان عصاره‌گیری بر روی استخراج مواد موثره از برگ عنوان نمود.

سیسی ساران و همکاران راندمان عصاره‌گیری از برگ نیم را در روش های دکوکشن، ماسریشن با اتانول ۸۰٪ و پرکولاسیون با اتانول ۸۰٪ بترتیب ۸/۱۵، ۱۷/۵ و ۲۱/۴۸ درصد ($\frac{W}{W}$) گزارش نمودند. مشاهده می‌شود که بیشترین راندمان متعلق به روش پرکولاسیون با اتانول ۸۰٪ است (پونگتپ سیسی ساران و همکاران ۲۰۰۶). همچنین سیسی ساران و همکاران راندمان عصاره آبی یا همان روش دکوکشن را برای برگ درخت سیامس نیم ۱۱/۲۹ درصد ($\frac{W}{W}$) و راندمان روش ماسریشن با متانول و پس از ۷ روز چربی‌گیری با هگزان را ۴/۷۱ درصد ($\frac{W}{W}$) گزارش کردند (پونگتپ سیسی ساران و همکاران ۲۰۰۵).

مقدار کل ترکیبات فنولی

با توجه به معادله رگرسیون بدست آمده در مورد اسید کافئیک (شکل ۱) و قرار دادن جذب هر یک از عصاره‌ها در این معادله، مقدار کل ترکیبات فنولی به صورت میلی‌گرم اکی‌والان‌های اسید کافئیک به ازاء کیلوگرم ماده خشک گزارش گردید. این مقدار بترتیب برای عصاره‌های حاصل از روش دکوکشن، پرکولاسیون و ماسریشن ۲۳/۶۷±۰/۴۷، ۳۴/۲۱±۰/۱۵ و ۳۷/۵۵±۰/۲۵ میلی‌گرم اکی‌والان اسید کافئیک به ازاء کیلوگرم ماده خشک بدست آمد. مشهود است که بیشترین مقدار کل ترکیبات فنولی مربوط به روش ماسریشن می‌باشد

ادامه مخلوط بدست آمده به مدت ۵ دقیقه در سانتیفریژ (سیگما ۱۸KS-۳، آلمان) با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. سپس قسمت آبی آن جدا شده و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب جوش قرار گرفته و در پایان میزان جذب در طول موج ۵۳۰ نانومتر قرائت شد (مصطفی مهران ۱۳۵۵). عدد TBA براساس رابطه زیر محاسبه گردید.

فرمول شماره ۲:

$$E_{1\text{ cm}}^{1\text{ g}} = \frac{e}{d.a}$$

که در این رابطه:

e: جذب نوری اندازه‌گیری شده، d: ضخامت سل نوری و a: وزن نمونه برحسب گرم است (سی جی سایدول و همکاران ۱۹۵۴).

جداسازی ترکیبات فنولیک به روش HPLC

دستگاه HPLC (یاگلین ۹۰۰۰ Acme) و ستون RP-۱۰۰ (LiChrosphere C₁₈ ۴/۶ mm ID × ۴ μm) در این تست مورد استفاده قرار گرفت. فاز متحرک، استونیتریل-آب (۶۰:۴۰) با شدت جریان ۰/۵ میلی لیتر در دقیقه بوده و شناسایی بوسیله دکتور فرابنفش مدل ۹۱۲۰ UV/Vis-YL در طول موج ۲۱۵ نانومتر انجام گردید (پ مانیکاندان و همکاران ۲۰۰۸). ترکیبات فنولی در عصاره بدست آمده به روش پرکولاسیون جداسازی شده و سپس از طریق مقایسه با اسید سیرینجیک به عنوان استاندارد داخلی تعیین مقدار شدند.

آنالیز آماری

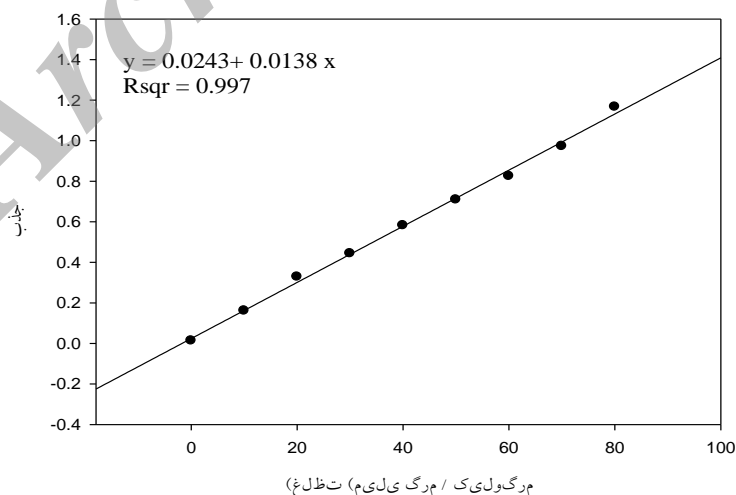
مقایسات میانگین با استفاده از نرم افزار SPSS ۲۰/۰، از طریق آزمون ANOVA و تست توکی انجام شد. $P<0/05$ از لحاظ آماری معنی دار در نظر گرفته شد. نتایج به صورت میانگین سه تکرار ± انحراف معیار بیان شدند.

بترتیب $۷۸/۸ \pm ۹/۴۳$ و $۱۹/۶۲ \pm ۰/۲۳$ ، $۲۸/۹۴ \pm ۰/۰۰$ میکروگرم بر میلی لیتر بدست آمد. نتایج آزمون توکی نشان می‌داد که علیرغم عدم وجود اختلاف معنی دار بین مقادیر IC_{50} عصاره‌های دکوکشن، پرکولاسیون و آنتی اکسیدان BHT ($P > ۰/۰۵$) اما مقادیر IC_{50} این سه با عصاره ماسریشن اختلاف معنی داری دارند ($P < ۰/۰۵$). بنابراین با وجود بالاتر بودن میزان کل ترکیبات فنولی عصاره ماسریشن و همچنین راندمان استخراج آن، اما عصاره بدست آمده به روش پرکولاسیون به عنوان موثرترین عصاره در روبش رادیکال‌های آزاد معرفی گردید (شکل ۴). در توضیح این پدیده باید گفت با توجه به مکانیسم تغییر رنگ واکنشگر فولین، که اکسیداسیون محلول قلیایی فنول‌ها بوسیله واکنشگر می‌باشد (نوزیا سیسکو و همکاران ۲۰۰۸) و اینکه در هنگام عصاره‌گیری علاوه بر ترکیبات فنولی، ترکیبات دیگری که این واکنشگر قادر است تا آنها را نیز اکسید کند نیز استخراج می‌گردند، یکی از اشکالات اصلی روش فولین سیوکاتیو پایین بودن درجه اختصاصی آن جهت اندازه‌گیری ترکیبات فنولی است (فریدون شهیدی و نازک ۲۰۰۳).

(شکل ۲). مقایسه میانگین انجام شده به روش توکی نشان می‌داد که اختلاف معنی داری بین میزان کل ترکیبات فنولی هر سه عصاره وجود دارد ($P < ۰/۰۵$). قبلاً مقدار کل پلی فنول در عصاره اتانولی، فراکسیون اتیل استاتی و فراکسیون متانولی برگ نیم به ترتیب $۳۹/۳۱ \pm ۴/۸۵$ ، $۷۳/۱ \pm ۳/۱۹$ و $۱۳/۴۵ \pm ۱/۲۱$ (Wt/.) گزارش شده است (پ مانیکاندان و همکاران ۲۰۰۸). عصاره برگ گیاه آزادیراجتا دارای محتوی ترکیبات فنولیک ۷۹-۱۲ میلی گرم بر گرم اکسی والان کوئرستین است و میانگین کل فنولی‌ها را در درختان سیامس نیم، مارانگو و نیم بترتیب برابر با $۳۲/۶ \pm ۱۶/۱$ ، $۵۳ \pm ۲۴/۸$ و $۴۰/۹ \pm ۵/۵$ میلی گرم کوئرستین به ازاء هر گرم عصاره گزارش کردند (پونگتپ سیسی ساران و همکاران ۲۰۰۷).

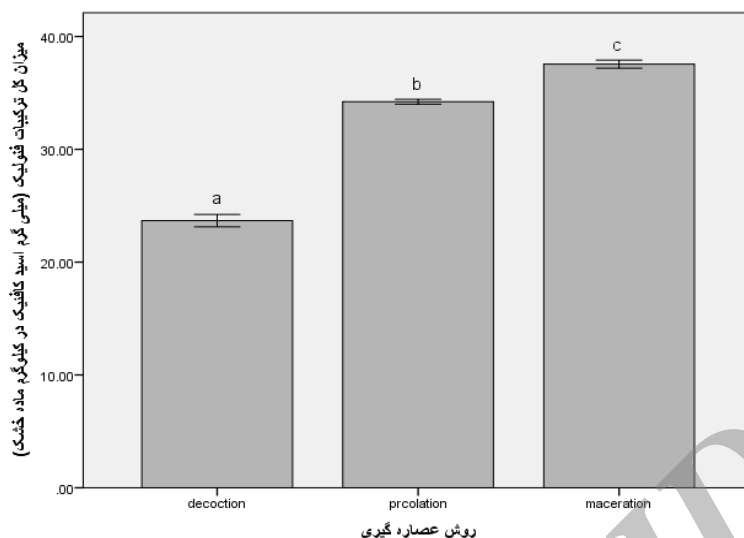
فعالیت آنتی رادیکالی

در این پژوهش با توجه به معادله رگرسیون غیر خطی بدست آمده، مقدار IC_{50} BHT در متانول $۵۸/۹$ میکرو مول معادل $۱۲/۹۸ \pm ۰/۰۵$ میکروگرم بر میلی لیتر محاسبه شد (شکل ۳). همچنین مقادیر IC_{50} برای عصاره‌های دکوکشن، پرکولاسیون و ماسریشن



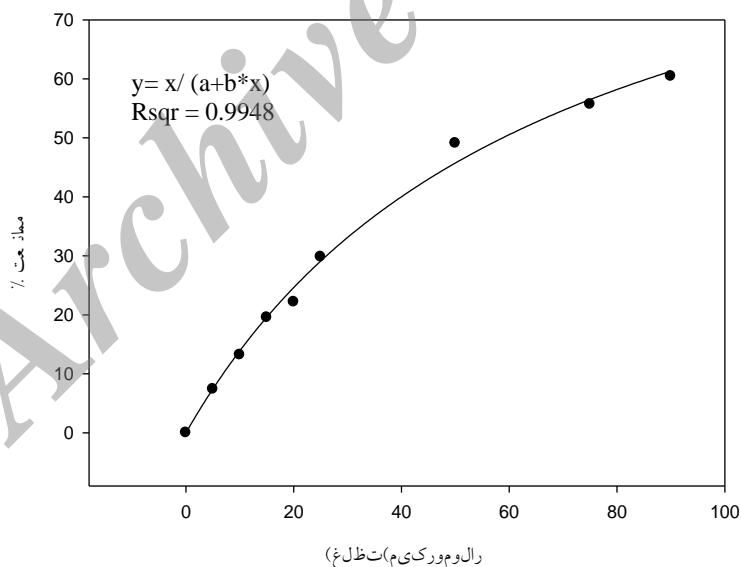
شکل ۱- منحنی کالیبراسیون ترکیبات فنولی بر حسب اسید کافئیک

غلظت‌های ۱۰-۸۰ میلی گرم اسید کافئیک در کیلوگرم متانول ۵۰٪ با واکنشگر فولین سیوکاتیو مخلوط و سپس محلول ۷/۵٪ کربنات سدیم افزوده شده و پس از گرمخانه‌گذاری در ۴۵°C به مدت ۱۵ دقیقه، جذب در طول موج ۷۴۰ nm قرائت شد.



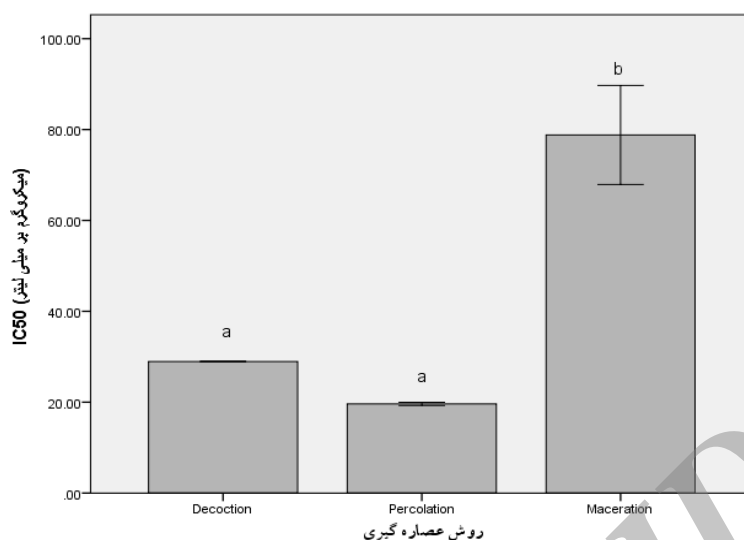
شکل ۲- میزان کل ترکیبات فنولی در سه عصاره مختلف

هر عصاره با غلظت ۵۰۰ میلی گرم در کیلوگرم متانول ۵۰٪ با واکنشگر فولین سیوکالتیو مخلوط و سپس محلول ۷/۵٪ کربنات سدیم افزوده شده و پس از گرمخانه گذاری در ۴۵°C به مدت ۱۵ دقیقه، جذب در طول موج ۷۴۰ nm قرائت شد. نتایج بصورت میلی گرم اکی والان های اسید کافئیک به ازاء کیلوگرم ماده خشک بیان گردید. حروف متفاوت بر روی هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف آماری معنی دار ($P < 0.05$) می باشد.



شکل ۳- منحنی کالیبراسیون BHT

یک میلی لیتر محلول ۲۰۰ میکرومولار DPPH در متانول به ۳ میلی لیتر محلول استاندارد BHT در متانول (غلظت های ۰-۹۰ میکرومولار) افزوده شده و پس از ۳۰ دقیقه گرمخانه گذاری در دمای ۳۰°C، جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر در برابر سل حاوی متانول قرائت شد.



شکل ۴- مقدار IC_{50} در سه عصاره مختلف

یک میلی لیتر محلول ۲۰۰ میکرومولار DPPH در متانول به ۳ میلی لیتر محلول عصاره در متانول (غلظت های ۰-۱۸ ppm عصاره های دکوکشن و ماسریشن و یا غلظت های ۰-۱۲ ppm عصاره پرکولاسیون) افزوده شده و پس از ۳۰ دقیقه گرمخانه گذاری در دمای ۳۰°C، جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر در برابر سل حاوی متانول قرائت شد. حروف متفاوت بر روی هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف آماری معنی دار ($P < 0.05$) می باشد.

نمودند (پونگتپ سیسی ساران و همکاران ۲۰۰۵). همچنین این پژوهشگر و همکارانش مقدار IC_{50} را برای عصاره آبی به روش دکوکشن ۳۱/۴۱ میکروگرم به ازاء هر میلی لیتر گزارش نمودند (پونگتپ سیسی ساران و همکاران ۲۰۰۶)، که به عدد بدست آمده در این تحقیق بسیار نزدیک است.

مانی کاندان و همکاران مقدار IC_{50} عصاره متانولی برگ نیم را ۵۹/۳۹ میکروگرم به ازاء هر میلی لیتر گزارش نمودند (پ مانیکاندان و همکاران ۲۰۰۸). سیسی ساران و همکاران مقدار IC_{50} را برای عصاره آبی و متانولی برگ گیاه نیم بترتیب ۲۶/۴۸±۳/۶۳ و ۱۱۵/۵۶±۲۱/۹۵ میکروگرم به ازاء هر میلی لیتر گزارش

جدول ۱- فعالیت آنتی رادیکالی و مقدار کل ترکیبات فنولی عصاره های برگ نیم*

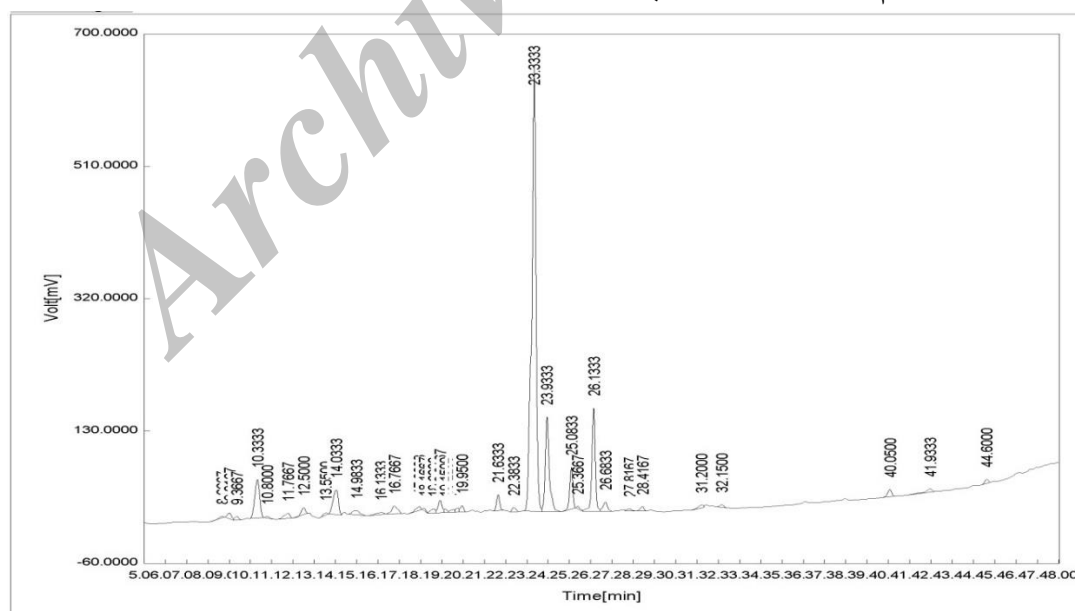
مقدار کل فنول ها (کیلو گرم عصاره خشک / میلی گرم اکی والان های کافئیک اسید)	IC_{50} , ($\mu g / ml$)	روش عصاره گیری
۲۳/۶۷±۰/۴۷a	۲۸/۹۴±۰/۰۰a	دکوکشن
۳۴/۲۱±۰/۱۵b	۱۹/۶۲±۰/۲۲a	پرکولاسیون
۳۷/۵۵±۰/۲۵c	۷۸/۸±۹/۴۳b	ماسریشن
-	۱۲/۹۸±۰/۰۵a	BHT

* اعداد میانگین سه تکرار ± انحراف معیار و حروف متفاوت در هر ستون نشان وجود اختلاف آماری معنی دار ($P < 0.05$) می باشد.

جداسازی ترکیبات فنولی به روش HPLC

با توجه به نتایج بدست آمده از آزمون تعیین میزان کل ترکیبات فنولی و همچنین بررسی روبش رادیکال های آزاد DPPH (جدول ۱)، عصاره بدست آمده به روش پرکولاسیون به عنوان موثرترین عصاره در روبش رادیکال های آزاد انتخاب و جداسازی ترکیبات فنولی به روش HPLC با استفاده از این عصاره انجام شد. شکل ۵، کروماتوگرام HPLC ترکیبات فنولی عصاره را نشان می دهد. در جدول ۲، مقدار ترکیبات فنولی با ذکر مقدار هر یک عنوان شده است. با توجه به این جدول می توان دریافت که نیمبولید با مقدار ۲۸۹۶/۰۵ میلی گرم به ازاء ۱۰۰ گرم عصاره عمده ترین لیمونوید تری ترین این عصاره و پس از آن اسیدهای فنولی و ۲ و ۳-دهیدروسالانول به ترتیب با مقادیر ۶۳۵/۳۸ و ۵۳۱/۹۴ میلی گرم به ازاء ۱۰۰ گرم عصاره سایر ترکیبات فنولی عمده این عصاره هستند. مقدار کل ترکیبات فنولی عصاره بدست آمده به روش پرکولاسیون ۵۹۰۷/۷۶ میلی گرم به ازاء ۱۰۰ گرم عصاره است. همچنین

گزارش شده است که نیمبولید ترکیب عمده در روغن بذر نیم نیز می باشد (کائوشیک بیسوز و همکاران ۲۰۰۲). تاکنون فقط تعداد محدودی تحقیق و بررسی در مورد جداسازی و تفکیک ترکیبات فنولی عصاره های استخراجی از برگ درخت نیم به انجام رسیده است. از آن جمله، مانیکاندان و همکاران در سال ۲۰۰۸ مشخص کردند که عصاره اتانولی برگ نیم، حاوی نیمبولید، کوئرستین و ۲ و ۳-دهیدروسالانول بترتیب با مقادیر ۰/۰۵۲، ۰/۱۶ و ۰/۰۱ درصد و زمان بازداری ۱۸/۷۱، ۷/۲۸ و ۱۹/۱۰ دقیقه است. در حالیکه فراکسیون اتیل استاتی دارای غلظت بالایی از نیمبیین و ۲ و ۳-دهیدروسالانول، بترتیب با مقادیر ۰/۰۰۵ و ۰/۰۸۳ درصد و زمان بازداری ۲۲/۲۱ دقیقه و ۱۹/۰۱ دقیقه و فراکسیون متانولی غنی از نیمبولید و کوئرستین با مقادیر ۰/۰۵ و ۰/۰۷ درصد و زمان بازداری بترتیب ۱۸/۸۱ و ۷/۲۰ دقیقه بودند (مانیکاندان و همکاران ۲۰۰۸).



شکل ۵- کروماتوگرام ترکیبات فنولی عصاره پرکولاسیون برگ نیم

نیمبولید (زمان بازداری ۲۳/۳۳) با مقدار ۲۸۹۶/۰۵ میلی گرم به ازاء ۱۰۰ گرم عصاره عمده ترین لیمونوید تری ترین و پس از آن اسیدهای فنولی و ۲ و ۳-دهیدروسالانول به ترتیب با مقادیر ۶۳۵/۳۸ (زمان بازداری از ۱۴/۰۳ تا ۱۹/۷۵) و ۵۳۱/۹۴ (زمان بازداری ۲۶/۱۳) میلی گرم به ازاء ۱۰۰ گرم عصاره سایر ترکیبات فنولی عمده این عصاره هستند. مقدار کل ترکیبات فنولی عصاره بدست آمده ۵۹۰۷/۷۶ میلی گرم به ازاء ۱۰۰ گرم عصاره است.

جدول ۲- ترکیبات فنولی عصاره پرکولاسیون برگ نیم

ردیف	ترکیب	زمان بازداری (دقیقه)	مقدار (%)	مقدار (عصاره mg/۱۰۰g)
۱	فلانونوئیدهای شناخته نشده	۹/۳۶	۰/۳۴۲	۲۰/۱۹
۲	کوئرستین	۱۰/۳۳	۵/۰۵	۲۹۸/۵۷
۳	اسیدهای فنولی	از ۱۴/۰۳ تا ۱۹/۷۵	۱۰/۷۵	۶۳۵/۳۸
۴	سیرینجیک اسید(استاندارد داخلی)	۱۹/۹۵	-	-
۵	نیمبولید	۲۳/۳۳	۴۹/۰۲	۲۸۹۶/۰۵
۶	۲و۳-دهیدروسالانول	۲۶/۱۳	۹/۰۱	۵۳۱/۹۴
۷	فلانونوئیدهای شناخته نشده	۲۷/۸۱	۰/۲۷	۱۶/۳۴

تست گرمخانه گذاری

عدد پراکسید (برحسب میلی اکی والان گرم در کیلوگرم روغن) برای تیمارهای مختلف در روزهای ۰، ۴، ۸ و ۱۲ و عدد TBA (مقدار مالون دی آلدهید موجود در یک کیلوگرم روغن) برای تیمارهای مختلف در روزهای ۰، ۵، ۹ و ۱۳ بهمراه میزان فعالیت آنتی اکسیدانی متناظر به ترتیب در جداول ۳ و ۴ نشان داده شده است.

به منظور مقایسه بهتر بین تیمارهای مختلف از شاخص فعالیت آنتی اکسیدانی در مورد اندیس پراکسید و تیوباربیتوریک اسید استفاده شد. شاخص مذکور در مورد اندیس پراکسید با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید. در مورد اندیس تیوباربیتوریک نیز شاخص فعالیت آنتی اکسیدانی بطور مشابه محاسبه می‌گردد.

$$\text{فرمول شماره ۳} = \frac{\text{اندیس پراکسید (نمونه)} - \text{اندیس پراکسید (شاهد)}}{\text{اندیس پراکسید (شاهد)}} \times 100 = \text{فعالیت آنتی اکسیدانی}$$

جدول ۳- اندیس پراکسید تیمارها و مقادیر متناظر فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره پرکولاسیون در روزهای مختلف*

روز	۱۲	۸	۴	۰	غلظت (ppm) عصاره	پارامتر
	۱۷۲/۳۷±۰/۳	۹۰/۱±۰/۳۵	۴۵/۸۵±۰/۵۶	۰/۲۵±۰/۰۰	۰	اندیس پراکسید (میلی اکی والان گرم در کیلوگرم روغن)
	۱۰۲/۹۳±۰/۰۰	۴۹/۲۷±۰/۰۸	۲۰/۸۶±۰/۴۷	۰/۲۵±۰/۰۰	۸۰۰	
	۹۷/۶±۰/۰۱	۴۷/۲۶±۰/۰۹	۱۸/۶۵±۰/۱۲	۰/۲۵±۰/۰۰	۱۴۰۰	
	۵۱/۸۷±۰/۰۳	۳۴/۱۲±۰/۰۴	۸/۶۶±۰/۰۶	۰/۲۵±۰/۰۰	۲۰۰۰	
	۴۰/۲۸±۰/۱۰g	۴۵/۳۱±۰/۱۸d	۵۴/۵۰±۰/۴۷b	۰/۰۰a	۸۰۰	فعالیت آنتی اکسیدانی
	۴۳/۳۷±۰/۱۰h	۴۷/۵۴±۰/۱۷e	۵۹/۳۱±۰/۶۷c	۰/۰۰a	۱۴۰۰	
	۶۹/۹±۰/۰۴i	۶۲/۱۳±۰/۱۳f	۸۱/۱۱±۰/۲d	۰/۰۰a	۲۰۰۰	

*اعداد میانگین سه تکرار ± انحراف معیار و حروف متفاوت در هر ستون نشان وجود اختلاف آماری معنی دار (P<۰/۰۵) می‌باشد.

جدول ۴- اندیس TBA تیمارها مقادیر متناظر فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره پرکولاسیون در روزهای مختلف*

پارامتر	غلظت (ppm) عصاره	روز			
		۰	۵	۹	۱۳
اندیس TBA (مالون دی	۰	۰/۰۱±۰/۰۰	۰/۰۵۶±۰/۰۰	۰/۰۱۴۸±۰/۰۰	۰/۰۵۶۲±۰/۰۲
آلدهید در یک کیلوگرم	۸۰۰	۰/۰۱±۰/۰۰	۰/۰۴۲±۰/۰۰	۰/۰۹±۰/۰۰	۰/۲۷±۰/۰۰
(روغن)	۱۴۰۰	۰/۰۱±۰/۰۰	۰/۰۳۳±۰/۰۰	۰/۰۷۱±۰/۰۰	۰/۰۲۲۵±۰/۰۰
	۲۰۰۰	۰/۰۱±۰/۰۰	۰/۰۳۲±۰/۰۰	۰/۰۷±۰/۰۰	۰/۱۹۱±۰/۰۰
فعالیت آنتی اکسیدانی	۸۰۰	۰/۰۰a	۲۴/۹۹±۰/۵۳b	۳۹/۱۸±۰/۳۴e	۵۱/۹±۱/۷۶f
	۱۴۰۰	۰/۰۰a	۴۱/۰۵±۱/۰۸c	۵۲/۰۲±۰/۰۸f	۵۹/۹۲±۱/۳۵g
	۲۰۰۰	۰/۰۰a	۴۲/۸۴±۰/۸۶d	۵۲/۷±۰/۰۸f	۶۵/۹۷±۱/۲۵h

*اعداد میانگین سه تکرار ± انحراف معیار و حروف متفاوت در هر ستون نشان وجود اختلاف آماری معنی دار ($P < 0.05$) می باشد.

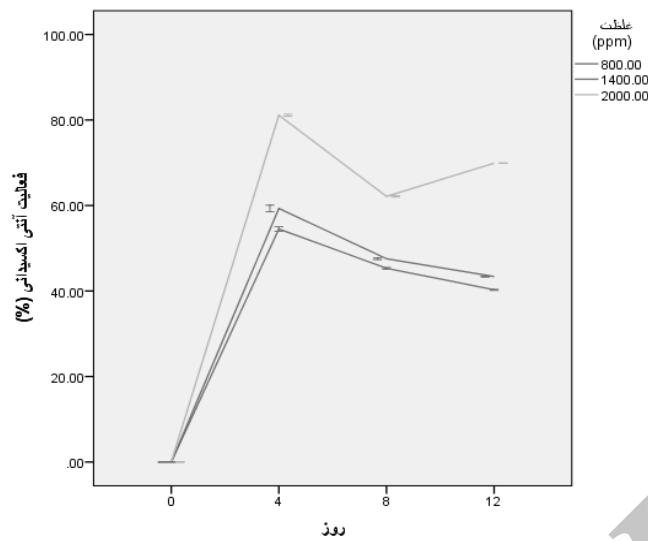
بررسی اثر سطح عصاره در به تاخیر انداختن پراکسیداسیون روغن سویا

نتایج بررسی اثر آنتی اکسیدانی حاصل از عدد پراکسید حاکی از آن است که اثر روز، سطح عصاره افزوده شده و اثر متقابل این دو، در مجموع هر سه غلظت معنی دار است ($P < 0.05$). این مسئله بیانگر این مطلب است که عصاره بدست آمده به روش پرکولاسیون در هر سه سطح (۸۰۰، ۱۴۰۰ و ۲۰۰۰ ppm) در به تاخیر انداختن پراکسیداسیون روغن سویا موثر است. همچنین می توان دریافت که با افزایش غلظت عصاره، فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره مذکور، در به تاخیر انداختن پراکسیداسیون روغن سویا به طور معنی داری افزایش می یابد. همچنین از نظر آماری، تغییر بین زمان های اندازه گیری (۰، ۴، ۸ و ۱۲) در فعالیت آنتی اکسیدانی اثر معنی داری داشته ($P < 0.05$)، به طوری که تا روز ۴ روند فعالیت آنتی اکسیدانی، افزایشی و از روز ۴ تا روز ۱۲ این روند رو به کاهش بوده و بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی در روز ۴ و در غلظت ۲۰۰۰ ppm عصاره مشاهده شده است (شکل ۶).

بررسی اثر سطح عصاره در به تاخیر انداختن تولید

محصولات ثانویه روغن سویا

نتایج بررسی اثر آنتی اکسیدانی حاصل از عدد تیوباربیتوریک اسید حاکی از آن است که اثر روز، سطح عصاره افزوده شده و اثر متقابل این دو، در مجموع هر سه غلظت معنی دار است ($P < 0.05$). این مسئله بیانگر این مطلب است که عصاره بدست آمده به روش پرکولاسیون، در هر سه سطح (۸۰۰، ۱۴۰۰ و ۲۰۰۰ ppm) در به تاخیر انداختن تولید محصولات ثانویه روغن سویا موثر است. همچنین می توان دریافت که با افزایش سطح عصاره، فعالیت آنتی اکسیدانی آن در به تاخیر انداختن تولید محصولات ثانویه روغن سویا به طور معنی داری افزایش می یابد. علاوه بر این و از نظر آماری، تغییر بین زمان های اندازه گیری (۰، ۵، ۹ و ۱۳) در فعالیت آنتی اکسیدانی اثر معنی داری داشته ($P < 0.05$) به طوری که روند فعالیت آنتی اکسیدانی تا روز ۱۳، افزایشی بوده و بیشترین میزان آن در غلظت ۲۰۰۰ ppm مشاهده شده است (شکل ۷).

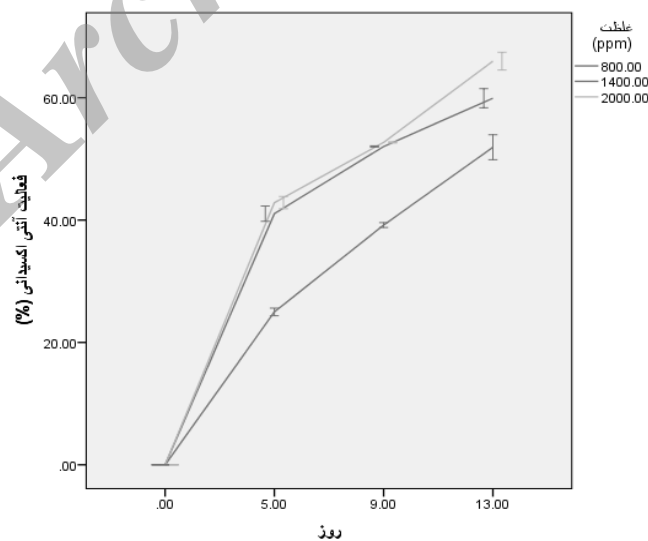


شکل ۶- رونده پیشرفت فعالیت آنتی‌اکسیدانی با توجه به عدد پراکسید

از نظر آماری، تغییر بین زمان‌های اندازه‌گیری (۰، ۴، ۸ و ۱۲ روز) در فعالیت آنتی‌اکسیدانی اثر معنی داری داشته ($P < 0.05$)، به طوری که تا روز چهارم روند فعالیت آنتی‌اکسیدانی، افزایشی و از روز ۴ تا روز ۱۲ این روند رو به کاهش بوده و بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره در روز چهارم در غلظت ۲۰۰۰ ppm مشاهده شد.

نمی‌باشد ($P > 0.05$). همچنین بین سطح ۸۰۰ ppm در روز ۱۳ با سطوح ۱۴۰۰ و ۲۰۰۰ ppm در روز ۹ نیز اختلاف معنی داری وجود نداشت ($P > 0.05$).

نتایج آنالیزهای آماری نشان می‌دهد که بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی سطوح مختلف عصاره افزوده شده در روزهای ۵ و ۱۳ اختلاف معنی داری وجود دارد ($P < 0.05$) اما در روز ۹ و بین دو غلظت ۱۴۰۰ و ۲۰۰۰ ppm اختلاف فعالیت آنتی‌اکسیدانی معنی دار



شکل ۷- پیشرفت فعالیت آنتی‌اکسیدانی با توجه به عدد تیوباریتوریک اسید

از نظر آماری، تغییر بین زمان‌های اندازه‌گیری (۰، ۵، ۹ و ۱۳ روز) در فعالیت آنتی‌اکسیدانی اثر معنی داری داشته ($P < 0.05$)، به طوری که بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در روز سیزدهم و در غلظت ۲۰۰۰ ppm مشاهده شد.

نتیجه گیری کلی

در بین سه روش دکوکشن، پرکولاسیون و ماسریشن، بیشترین راندمان عصاره گیری با $16/81 \pm 0/001$ درصد ($\frac{W}{W}$) مربوط به روش ماسریشن بود. مقدار کل ترکیبات فنولی در روش فولین سیوکالتیو برای سه عصاره فوق به ترتیب $23/67 \pm 0/47$ ، $34/21 \pm 0/15$ و $37/55 \pm 0/25$ میلی گرم اکی والان اسید کافئیک به ازاء کیلوگرم ماده خشک بدست آمد که بیشترین مقدار مربوط به عصاره ماسریشن می باشد. در آزمون DPPH مقدار IC_{50} BHT در متانول $58/9$ میکرو مول معادل $12/98 \pm 0/05$ میکروگرم بر میلی لیتر محاسبه شد. این درحالی است که مقادیر IC_{50} عصاره های دکوکشن، پرکولاسیون و ماسریشن بترتیب $28/94 \pm 0/00$ ، $19/62 \pm 0/23$ و $78/8 \pm 9/43$ میکروگرم بر میلی لیتر بدست آمد؛ بنابراین عصاره بدست آمده به روش پرکولاسیون علی رغم پایین تر بودن میزان کل

ترکیبات فنولی نسبت به روش ماسریشن، به عنوان موثرترین عصاره در روبش رادیکال های آزاد مشخص شد. تعیین هویت ترکیبات فنولی عصاره بدست آمده به روش پرکولاسیون نشان می داد که نیمبولید عمده ترین لیمونوید تری ترپن و پس از آن اسیدهای فنولی و 3 و 2 -دهیدروسالانول سایر ترکیبات فنولی این عصاره هستند. مقدار کل ترکیبات فنولی در این روش $5907/76$ میلی گرم به ازاء 100 گرم عصاره بدست آمد. نتایج تست گرمخانه گذاری (13 روز، دمای $60^\circ C$) به منظور بررسی اثر آنتی اکسیدانی عصاره بدست آمده به روش پرکولاسیون نشان می داد که نمونه روغن سویا با غلظت 2000 ppm عصاره، بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی را تا روز چهارم در مهار تشکیل محصولات اولیه اکسیداسیون داشته در حالی که این غلظت قادر بود تشکیل محصولات ثانویه اکسیداسیون را تا روز سیزدهم مهار نماید.

منابع مورد استفاده

- استاندارد ملی ایران، ۱۳۷۷. اندازه گیری عدد پراکسید در روغن ها و چربی های خوراکی به شماره ۱۷۹، چاپ اول، موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران.
- مهران م، ۱۳۵۵. آزمایش روغن (تالیف واکس)، چاپ اول، انتشارات دانشگاه تهران، ۲۶۳ ص.
- Amarowicz R, Naczki M and Shahidi F, 2000. Antioxidant activity of various fractions of non-tannin phenolics of canola hulls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 2755-2759.
- Anon, 1997. Spice constituents scavenging free radicals and inhibiting pentosidine formation in a model system. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry (Japan)* 61: 263-266.
- Ayres G H, 1949. Evaluation of accuracy in photometric analysis. *Analytical Chemistry* 21: 652-657.
- Bandoniene D and Murkovic M, 2002. On line HPLC-DPPH screening method for evaluation of radical scavenging phenols extracted from apples (*Malus domestica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 2482-2487.
- Biswas K, Chattopadhyay I, Ranajit K, Banerjee and Uday Bandyopadhyay, 2002. Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). *Current Science* Vol. 82, No. 11.
- Cicco N, T Lanorte M, Paraggio M, Viggiano M and Lattanzio V, 2008. A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical Journal* 91: 107-110.
- Howell J C, 1986. Food antioxidants: international perspectives-welcome and introductory remarks. *Food and Chemical Toxicology* 24: 997.
- Ito N, Hirose M, Fukushima S, Tsuda H, Shirai T and Tatematsu M, 1986. Studies on antioxidants: their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenesis. *Food and Chemical Toxicology* 24: 1071-1082.

- Jafari S, Shams Ardekani M, Khanavi M and Saeidnia S, 2012. Differentiation of *Azadirachta indica* A. Juss and *Melia azedarach* L. by using pharmacognostical and preliminary phytochemical methods. *Research in Pharmaceutical Sciences* 7: 127-133
- Manikandan P, Letchoumy P V, Gopalakrishnan M and Nagini S, 2008. Evaluation of *Azadirachta indica* leaf fractions for in vitro antioxidant potential and in vivo modulation of biomarkers of chemoprevention in the hamster buccal pouch carcinogenesis model, *Food and Chemical Toxicology* 46: 2332–2343.
- Ramarathnam N, Osawa T, Ochi H and Kawakishi S, 1995. The contribution of plant food antioxidants to human health. *Trends in Food Science and Technology* 6: 75-82.
- Prasad R B N, 2006. Neem seed oil. *ProQuest Science Journals* 17: 785-787.
- Shahidi F, Naczki M, 2003. Phenolics in Food and Nutraceuticals. 2th ed., CRC Press, 576 p.
- Sharma O P and Bhat T K, 2009. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry* 113: 1202-1205.
- Shon M Y, Kim T H and Sung N J, 2003. Antioxidants and free radical scavenging activity of phellinus baumii (phellinus of Hymenochaetaceae) extracts. *Food chemistry* 82: 593-597.
- Sidewell C G, Salwin H, Benca M and Mitchel J A, 1954. The use of thiobarbituric acid as a measure of fat oxidation. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 31: 603-606.
- Singleton V L and Rossi J A, 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic–phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16: 144–158.
- Sithisarn P, Supabphol R and Gritsanapan W, 2005. Antioxidant activity of Siamese neem tree (VP1209). *Journal of Ethnopharmacology* 99:109–112.
- Sithisarn P, Supabphol R and Gritsanapan W, 2006. Comparison of Free Radical Scavenging Activity of Siamese Neem Tree (*Azadirachta indica* A. Juss var. *siamensis* Valetton) Leaf Extracts Prepared by Different Methods of Extraction. *Medical Principles and Practice* 15: 219–222.
- Sithisarn P, Carlsen Ch U, Andersen M L, Gritsanapan W and Skibsted L H, 2007. Antioxidative effects of leaves from *Azadirachta* species of different provenience. *Food Chemistry* 104: 1539–1549.
- Sloane H J and William S G, 1977. Spectrophotometric accuracy, linearity and adherence to Beer's law. *Applied Spectroscopy* 31: 25–30.
- Sultana B, Anwar F and Przybylski R 2007. Antioxidant activity of phenolic components present in barks of *Azadirachta indica*, *Terminalia arjuna*, *Acacia nilotica*, and *Eugenia jambolana* Lam. *Trees. Food Chemistry* 104: 1106–1114.
- Suhaj M, 2004. Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. *Journal of Food Composition and Analysis* 19(6-7):531-537.
- Wettasinghe M and Shahidi F, 1999. Antioxidant and free radical-scavenging properties of ethanolic extracts of defatted borage (*Borago officinallis* L.) seeds. *Food chemistry* 67:399-414.
- Zheng W and Wang S Y, 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 5165–5170.
- Xuan T D, Eiji T, Hiroyuki T, Mitsuhiro M, Khanh T D and Chung I-M, 2004. Evaluation on phytotoxicity of neem (*Azadirachta indica*. A. Juss) to crops and weeds. *Crop Protection* 23:335–345.

Characterization of phenolic compounds present in Neem leaf extracts using HPLC and determination of their antioxidant activity

F Rahmani^{1*}, M H Haddad khodaparast², A H Elhami Raad³ and F Khanzadeh⁴

Received: June 25, 2013 Accepted: December 30, 2013

¹MSc graduated student, Department of food science and technology, Islamic Azad University, Sabzevar Branch, Sabzevar, Iran

²Professor, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

³Assistant professor, Department of food science and technology, Islamic Azad University, Sabzevar Branch, Sabzevar, Iran

⁴MSc graduated student, Department of food science and technology, Islamic Azad University, Sabzevar Branch, Sabzevar, Iran

*Corresponding author: E-mail: f1991.rahmani@yahoo.com

Abstract

Indian Neem (*Azadirachta indica L.*) leaf was extracted by three different extraction methods (Decoction, Percolation and Maceration) using two different solvents; methanol 80% (v/v) and water. Determination of total phenolic content by Folin-Ciocalteu method revealed that methanol 80% (v/v) for 7 days (maceration method) cause the highest quantity of extracted phenolic compounds. Meanwhile, determination of radical scavenging activity of three different extracts by DPPH method indicated that methanol 80% (v/v) for 24 h (percolation method) cause the highest RSA and was considered as the most effective extract. Furthermore, qualitative and quantitative characterization of phenolic compounds of percolation extract as the effective extract using HPLC revealed that Nimbolide (2896.05 mg/100 g extract) is the main limonoid triterpen followed by phenolic acids and 2', 3'-dehydrosalannol which are 635.38 and 531/94 mg/100g extract, respectively. Determination of antioxidative effects of percolation extract in refined soybean oil (without antioxidant) using accelerated oven test (13 days, 60°C) declared that soybean oil containing 2000 ppm of the percolation extract was more stable than other concentrations until 4th day in terms of hydroperoxide when the aforementioned concentration was able to make the oil more stable until 13th day in terms of aldehydes and ketones.

Keywords: Neem leaf, Phenolic compounds, Folin-Ciocalteu, Antiradical activity, HPLC