Archive of SID

نشریه فرآوری و نگهداری مواد غذایی
جلد دهم، شماره اول، ۹۷
۹۸-۸۵
http://ejfpp.gau.ac.ir
DOI :10.22069/EJFPP.2018.12656.1406

اثر روش‌های مختلف استخراج بر ترکیبات فنولی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ توت سفید (*Morus alba* L.)

بهناز صداقت[۱]، لیلا نجفیان*[۲]

[۱]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران
[۲]استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۰۸ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۷/۲۴

چکیده

سابقه و هدف: اکسایش عامل اصلی فساد چربی‌ها و روغن‌ها محسوب می‌شود. اکسیداسیون روغن‌ها علاوه بر تغییر ویژگی‌های ارگانولپتیکی ماده غذایی، ارزش غذایی و عمر نگهداری روغن‌ها را کاهش می‌دهد. به همین دلیل آنتی اکسیدان‌های سنتزی مانند تری بوتیل هیدروکینون (TBHQ)، بوتیلید هیدروکسی تولوئن (BHT)، بوتیلید هیدروکسی آنیزول (BHA) واسترهای گالات برای جلوگیری از بدطعمی ناشی از اکسایش به روغن‌ها و چربی‌ها اضافه می‌شود. با توجه به اینکه آنتی اکسیدان‌های سنتزی اثرات نامطلوبی همچون اثر جهش‌زایی و سرطان در بدن انسان دارد؛ لذا تولید آنتی اکسیدان‌های طبیعی به عنوان جایگزین آنها ضروری می‌باشد. هدف از این پژوهش بررسی اثرات روش‌های مختلف استخراج بر ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ توت سفید به‌عنوان آنتی اکسیدان طبیعی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: برگ توت سفید پس از خشک شدن آسیاب گردید و عصاره‌ها با استفاده از روش‌های استخراج با حلال (حلال اتانول- آب، ۵۰:۵۰)، اولتراسوند و سیال فوق بحرانی استخراج شدند. مقدار کل ترکیبات فنولی با روش فولین-سیوکالتو و توکوفرول عصاره‌ها با استفاده از روش رنگ سنجی اندازه‌گیری شد و برای اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره در غلظت‌های ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ قسمت در میلیون از روش‌های مهار رادیکال آزاد ۱،۱- دی فنیل ۲، پیکریل هیدرازیل (DPPH)، بی‌رنگ شدن بتاکاروتن/ اسید لینولئیک استفاده شد. میزان فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها با آنتی‌اکسیدان سنتزی TBHQ در غلظت ۱۰۰ قسمت در میلیون مقایسه گردید.

یافته‌ها: مقدار ترکیبات فنولی و توکوفرول در روش استخراج با اولتراسوند بیشتر از سایر روش‌ها بود. فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH غلظت‌های مختلف عصاره نشان داد که در تمام نمونه‌های مورد بررسی با افزایش غلظت عصاره میزان مهار رادیکال آزاد از ۴۰/۹۸٪ تا ۷۷/۴۶٪ افزایش یافته است و اختلاف معنی‌دار آماری بین غلظت‌های مختلف مشاهده شد. در روش بی‌رنگ شدن بتاکاروتن / لینولئیک اسید مشاهده شد با افزایش غلظت عصاره در تمام نمونه‌های مورد بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی افزایش یافت و در تمام غلظت‌های مورد بررسی نمونه‌های اولتراسوندی بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی و عصاره‌های استخراج شده با روش غرقابی کمترین فعالیت آنتی اکسیدانی را داشتند. با افزایش غلظت عصاره از ۵۰۰ به ۲۰۰۰ قسمت در میلیون فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره افزایش یافت و غلظت ۲۰۰۰ قسمت در میلیون از عصاره برگ سفید توت از نظر فعالیت آنتی‌اکسیدانی اختلاف معنی‌دار آماری ($P> ۰/۰۵$) با ۱۰۰ قسمت در میلیون آنتی اکسیدان سنتزی TBHQ نداشت.

*مسئول مکاتبه: najafian_5828@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد استخراج با اولتراسوند در فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ توت سفید با روش رادیکال آزاد DPPH و بی‌رنگ شدن بتا کاروتن/ لینولئیک اسید مؤثرتر بود. به نظر می‌رسد فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالای عصاره به توکوفرول و محتوای فنولیک بالای آن مرتبط است. بنابراین، عصاره برگ توت سفید می‌تواند به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی جایگزین مناسبی برای آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی در صنعت غذا باشد.

واژه‌های کلیدی: عصاره برگ توت سفید، آنتی‌اکسیدان، غوطه‌وری، اولتراسوند، سیال فوق بحرانی

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

اکسیداسیون روغن‌ها[1] و چربی‌های خوراکی یکی از مشکلات جدی در صنعت غذا محسوب می‌گردد. به دنبال این فرآیند رنگ، طعم و بوی روغن و غذاهایی که در آن‌ها از روغن استفاده شده است نامطلوب شده و رادیکال‌های آزاد تولید می‌گردد. رادیکال‌های آزاد علت بسیاری از بیماری‌ها، پیری، سرطان و آلزایمر هستند. لذا جهت افزایش عمر ماندگاری روغن‌ها و جلوگیری از فرآیند اکسیداسیون ترکیبات غذا، استفاده از آنتی اکسیدان‌ها[2] ضروری می‌باشد. در سال‌های اخیر تولید کنندگان مواد غذایی توجه زیادی به استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی به جای استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی در محصولات خود نموده اند (۲۴). این امر از یک طرف به علت اثرات سوء شناخته شده نگهدارنده‌های شیمیایی و از طرف دیگر تمایل زیاد مصرف کنندگان به استفاده از مواد غذایی فرآوری شده بدون نگهدارنده و یا حتی المقدور با نگهدارنده‌های طبیعی می‌باشد (۳).

آنتی‌اکسیدان‌های متداول مورد استفاده در صنعت غذا همانند BHA[3]، BHT[4]، TBHQ[5] و PG[6] دارای اثرات جانبی مضر بر سلامتی انسان می‌باشند و سرطان‌زایی آن‌ها در مطالعات گوناگون به اثبات رسیده است (۲). امروزه محققین صنایع غذایی درصدد یافتن ترکیبات طبیعی با خواص آنتی‌اکسیدانی می‌باشند. گیاهان دارای ترکیبات با ارزشی هستند که علاوه بر افزایش کیفیت و ارزش تغذیه‌ای به صورت‌های دیگر از جمله نوشیدنی، رنگ، مواد آرایشی و دارویی و درمانی نیز استفاده می‌گردند. برخی از آن‌ها دارای میزان قابل توجهی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی می‌باشند (۷).

درخت توت سفید (*Morus alba*) یک درخت قدیمی و تاریخی بوده که برگ‌های آن در تغذیه کرم‌های ابریشم مورد استفاده قرار می‌گیرند. این گیاه بومی چین است و بطور سنتی در بسیاری از کشورهای آسیایی از جمله ایران یافت می‌شود و در درمان بسیاری از بیماری‌ها کاربرد دارد (۱۶). در طب سنتی از برگ‌ها و ریشه درخت توت سفید استفاده‌های متعددی شامل خلط آوری، ضد بلغم، اثر بر درمان فشار خون پایین، پیشاب آوری، باکتری کشی و ویروس کشی می‌شود. برگ‌های این درخت حاوی مقادیر قابل توجهی ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی مانند روتین و کوئرستین است (۵ و ۱۴).

ترکیبات فنولی عمده‌ترین آنتی اکسیدان‌های طبیعی هستند که تاکنون شناسایی شده‌اند. با انتخاب روش استخراج صحیح، می‌توان حداکثر غلظت ترکیبات فنولیک را با خلوص بالا از ماده مورد نظر استخراج کرد. انتخاب روش استخراج به نوع بافت گیاهی، نوع ماده مؤثره، و پایداری ماده مؤثره در برابر حرارت بستگی دارد (۲۰). روش‌های مختلفی برای استخراج عصاره‌های گیاهی وجود دارد که از این میان می‌توان به روش استخراج با حلال، اولتراسوند، سیال فوق بحرانی و آب زیر بحرانی اشاره نمود. نحوه عصاره‌گیری از گیاهان، به‌عنوان اولین مرحله کلیدی برای استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی، بسیار مهم است. اندام‌های گیاهی و سیستم‌های حلالی انتخاب شده می‌تواند بر کمیت و نوع ترکیبات جدا شده تأثیر بگذارد. از این جهت تجربیات متعددی جهت بهینه‌سازی روش‌های استخراج و مقایسه آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های یک گیاه آزمون شده است. همچنین انتخاب روش استخراج به نوع بافت گیاهی نیز بستگی دارد (۲۰). استخراج با دستگاه سوکسله و

1. Oil oxidation
2. Antioxidant
3. Butylate Hydroxy Anisole
4. Butylate Hydroxy Toluen
5. Tertiary Butyl Hydro Quinon
6. Propyl Gallat

www.SID.ir

Archive of SID

خیساندن روش‌های رایجی هستند که به کمک حلال‌هایی با قطبیت‌های مختلف انجام می‌گیرد. این امر نیاز به صرف زمانی طولانی دارد و باعث استخراج طیف وسیعی از مواد شیمیایی می‌شود (۲۲). اما استخراج با کمک مایکروویو، سیال فوق بحرانی و امواج فرا صوت (اولتراسوند) روش‌های جدیدی هستند که از نظر کوتاه شدن زمان استخراج، کاهش مقدار حلال مصرف شده و حفظ خاصیت ترکیبات آنتی اکسیدانی نسبت به روش‌های سنتی مزیت‌های زیادی دارند (۹).

این پژوهش با هدف بررسی تأثیر روش‌های مختلف استخراج با حلال، اولتراسوند و سیال فوق بحرانی بر میزان ترکیبات فنولی، توکوفرولی و ویژگی‌های آنتی اکسیدانی برگ توت سفید انجام شده است.

مواد و روش‌ها

مواد اولیه: اتانول ۹۷ درصد، کربنات سدیم، معرف فولین سیوکالچو، اسیدگالیک، ۲-۲- بی پیریدین، کلرید آهن (III) شش آبه، تولوئن، آلفاتوکوفرول، متانول، بتاکاروتن، لینولئیک اسید، دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH)، چسب نشاسته، اسیداستیک گلاسیال، کلروفرم، یدورپتاسیم، تیوسولفات سدیم، N-هگزان، پتاس از شرکت سیگما آلدریچ و مرک با درجه آنالیتیکال خریداری شد.

آماده‌سازی برگ توت: توت از خانواده *Moraceae* و جنس *Morus* است که در ایران یک گونه آن به نام توت سفید (*Morus alba*) دیده می‌شود. در اردیبهشت‌ماه ۱۳۹۵، برگ‌های تازه توت از جنگل‌های استان مازندران جمع‌آوری شد و پس از انتقال به آزمایشگاه و جدا کردن شاخه‌ها و سایر مواد زائد، به کمک آون تحت خلاء (مدل VO400 ساخت شرکت ممرت آلمان) در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد خشک گردید. سپس با آسیاب (مدل A11 ساخت شرکت ایکا آلمان) خرد و با الک مش ۴۰ (۴۰۰ میکرون) الک شد و تا زمان استفاده در کیسه پلی اتیلنی دو لایه تیره در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۹).

استخراج عصاره به روش غوطه وری[1]: پودر برگ گیاه توت سفید به نسبت ۱ به ۵ (۲۰ گرم نمونه با ۱۰۰ میلی‌لیتر حلال) با حلال اتانول– آب ۵۰:۵۰ (حجمی/حجمی) مخلوط و دور از نور به‌مدت ۴۸ ساعت در شیکر (LABTRON Ls-100، ساخت انگلستان) با سرعت ۱۶۰ rpm قرار داده شدند. سپس سه مرحله سانتریفوژ (HERMLE Z200A، ساخت آلمان) شده (هر بار ۱۰ دقیقه و با ۳۰۰۰ rpm در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد) و در هر مرحله فاز آبی (فاز رویی) جمع‌آوری شد، تا دیگر رسوبی در ته لوله دیده نشود. سپس فازهای آبی جمع‌آوری شده، با کاغذ واتمن شماره ۱ صاف شد. در ادامه توسط روتاری اواپراتور (TAM 2times، ساخت ایران) (حداکثر دما ۵۰ درجه سانتی‌گراد) حلال تبخیر و عصاره در سه مرحله حلال ذکر شده بدست آمد. عصاره حاصل تا زمان انجام آزمایش در دمای ۱۸- نگهداری شدند (۹).

استخراج با اولتراسوند: برگ توت سفید با نسبت ۱ به ۵ با حلال‌های اتانول-آب (۵۰٪) مخلوط شده، سپس در حمام اولتراسوند (Elma, model 690/H، ساخت آلمان) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد با فرکانس ۳۴-۲۸ کیلوهرتز قرار گرفت. سپس محلول‌ها با کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف و به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. در ادامه توسط اواپراتور (حداکثر دما ۵۰ درجه سانتی‌گراد) حلال تبخیر و عصاره گیاه بدست آمد. عصاره حاصل

1. Maceration

www.SID.ir

Archive of SID

تا زمان انجام آزمایش در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱).

استخراج با سیال فوق بحرانی: برای استخراج عصاره برگ سفید توت با سیال فوق بحرانی از روش دلفانیان و همکاران (۲۰۱۵) استفاده شد (۶). بدین منظور ۱۰ گرم از نمونه پودر شده توت سفید به نسبت ۱ به ۵ با حلال اتانول به عنوان اصلاحگر[1] مخلوط شد. عصاره‌گیری توسط دستگاه دی اکسید کربن فوق بحرانی (Suprex MPS/225، ساخت آمریکا) در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، فشار ۱۰۰ بار به‌مدت ۳۰ دقیقه صورت گرفت. عصاره استخراجی صاف و پس از جداسازی حلال در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

اندازه‌گیری ترکیبات فنولی عصاره برگ توت: ترکیبات فنولی با روش مک‌دونالد و همکاران (۲۰۰۱) و بر اساس روش رنگ‌سنجی با معرف فولین-سیوکالتو انجام شد (۸). ۰/۵ میلی‌لیتر از هر عصاره ۰/۱٪ (محلول ۰/۱ گرم از عصاره با ۱۰۰ میلی‌لیتر حلال) با ۲/۵ میلی‌لیتر از معرف فولین-سیوکالتو رقیق شده با آب با نسبت (۱۰:۱) ترکیب و ۲ میلی‌لیتر از کربنات سدیم ۷/۵ درصد مخلوط و به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. سپس جذب آن‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفتومتر (نام شرکت سازنده, مدل، شهر، کشور) خوانده شد و مقدار ترکیبات فنولی عصاره بر اساس میلی‌اکی والان اسید گالیک بر گرم عصاره از طریق رابطه ۱ بیان شد.

محتوای فنولی $= 1.262x + 0.063$ (رابطه ۱)

اندازه‌گیری مقدار توکوفرول: مقدار کل توکوفرول‌های برگ توت با استفاده از روش رنگ سنجی مورد بررسی قرار گرفت. در این روش توکوفرول‌ها با احیاء یون‌های فریک Fe^{+3} به یون‌های فرو Fe^{+2} یک کمپلکس رنگی ایجاد می‌کنند (۲۶). برای این منظور محلول‌های ۲-۲- بی پریدین ۰/۰۷درصد و کلرید آهن (III) شش آبه ۰/۲ درصد تهیه شدند. به ترتیب مقدار ۰/۰۷ گرم ۲-۲-بی پریدین و ۰/۲ گرم کلرید آهن III توزین و در ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول حل شد. سپس ۰/۲ گرم از عصاره با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر توزین، ۵ میلی‌لیتر تولوئن به آن افزوده و بخوبی بهم زده شد. ۰/۵ میلی‌لیتر محلول کلرید آهن III و ۳/۵ میلی‌لیتر محلول ۲-۲-بی پریدین به آن افزوده و در نهایت با اتانول به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. بعد از یک دقیقه با استفاده از دستگاه طیف سنج نوری (نام شرکت سازنده، مدل، شهر، کشور) جذب نمونه در طول موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد. مقدار توکوفرول بر حسب میلی‌گرم آلفا توکوفرول بر ۱۰۰ گرم عصاره از رابطه ۲ بدست آمد (۲۶).

میزان توکوفرول $= 1.262x + 0.063$ (رابطه ۲)

مهار رادیکال آزاد DPPH: آزمایش مهار رادیکال آزاد با روش اسماعیل زاده کناری و همکاران (۲۰۱۴) انجام شد (۹). توانایی دادن اتم هیدروژن یا الکترون توسط ترکیبات عصاره‌های مختلف در تست با میزان بی‌رنگ کردن محلول بنفش ۲ و ۲ دی فنیل ۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) در اتانول مورد سنجش قرار گرفت. بدین منظور ۰/۳ میلی‌لیتر از عصاره با غلظت‌های مختلف (۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ قسمت در میلیون (ppm)) با ۲/۷ میلی‌لیتر محلول متانولی (۶×۱۰^{-۵} مولار) DPPH مخلوط و به‌مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق در مکان تاریک نگهداری شد. جذب در ۵۱۷ نانومتر خوانده شد و از طریق رابطه ۳ بدست آمد (۹).

$$\text{درصد مهار رادیکال آزاد } DPPH = \frac{\text{جذب } DPPH - \text{جذب نمونه}}{\text{جذب } DPPH}$$

(رابطه ۳)

1. Modifier

www.SID.ir

Archive of SID

فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH عصاره‌ها با آنتی اکسیدان TBHQ در غلظت ۱۰۰ قسمت در میلیون مقایسه گردید.

آزمون بتاکاروتن/ لینولئیک اسید: آزمایش بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره بر اساس روش آمارویز و همکاران (۲۰۰۴) با اندکی تغییر انجام گرفت (۲). برای انجام آزمایش ابتدا یک محلول پایه از بتاکاروتن- لینولئیک اسید به صورت زیر تهیه گردید: ۵ میلی‌گرم از بتاکاروتن در ۱۰ میلی‌لیتر کلروفرم حل شد، ۶۰۰ میکرولیتر از محلول تهیه شده به مخلوط ۴۰ میلی‌گرم لینولئیک اسید و ۴۰۰ میلی‌گرم توئین ۴۰ اضافه شد. سپس با روش تبخیر در خلاء (TAM 2times، ساخت ایران) کلروفرم جدا گردید و ۱۰۰ میلی‌لیتر آب اکسیژنه به آن اضافه و شدیداً هم‌زده شد. ۵ میلی‌لیتر از امولسیون تهیه شده فوق به لوله آزمایش منتقل و ۲۰۰ میکرولیتر از هر عصاره (با غلظت ۰/۰۵ میلی‌گرم در میلی لیتر) به لوله آزمایش اضافه گردید. تمامی این مراحل در مورد TBHQ به‌عنوان آنتی‌اکسیدان استاندارد و شاهد (محلول بتاکاروتن تهیه شده به علاوه ی حلال‌های مربوطه) انجام شد. جذب نوری نمونه‌ها با اسپکتروفتومتر در ۴۷۰ نانومتر در زمان صفر و همچنین بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای اتاق قرائت شد. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره به عنوان درصد بازداری بیان شد (رابطه ۴).

$$\text{(درصد بازدارندگی)} = \frac{\text{جذب نمونه} - \text{جذب شاهد}}{\text{جذب شاهد}} \times ۱۰۰$$

(رابطه ۴)

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها، با توجه به نرمال بودن داده‌ها و همگنی واریانس، با استفاده از روش آنالیز واریانس دو طرفه (*Two-way ANOVA*) استفاده شد. برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد استفاده شد. ارزیابی‌ها در ۳ تکرار صورت پذیرفت. از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸ برای آنالیز داده‌ها و اکسل نسخه ۲۰۰۷ برای رسم نمودارها استفاده گردید.

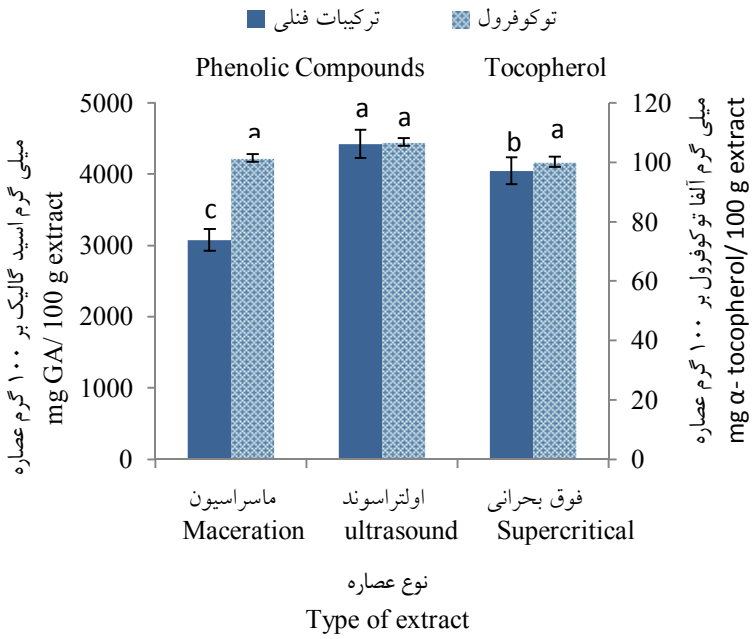
نتایج و بحث

میزان ترکیبات فنولی و توکوفرولی عصاره برگ توت: ترکیبات فنولی متابولیت‌های ثانویه گیاهی می‌باشند که به‌طور گسترده در سراسر گیاه پخش شده‌اند.ترکیبات فنولی خواص آنتی‌اکسیدانی خوبی داشته و غالباً در میوه‌ها و سبزیجات یافت می‌شوند. مهمترین عملکرد این ترکیبات در ارتباط با اکسیداسیون، غیر فعال کردن رادیکال‌های آزاد و تشکیل کمپلکس با یون‌های فلزی می‌باشد. این ترکیبات شامل موادی از قبیل فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها، آنتراکینون، استیل بنوئید (ترکیب فنول طبیعی) و مشتقات آن‌ها هستند. برخی از فعالیت‌های بیولوژیکی مانند خصوصیات آنتی‌اکسیدانی اساساً مربوط به مشتقات گیاهی مانند عصاره‌ها، اسانس‌ها، اولئورزین‌ها و برخی دیگر از مولکول‌های آن‌ها می‌شود (۲۳). توکوفرول‌ها به طور مؤثر و به شکل یک فرآورده نسبتاً پایدار به تخریب رادیکال‌های پروکسی و قطع مرحله انتشار از واکنش‌های زنجیره‌ای اکسیداتیو می‌پردازد. همچنین در افزایش پایداری اکسیداتیو و در کاهش میزان نسبی اکسیداسیون در هنگام افزایش دما مؤثر است (۱۰). لذا تعیین مقدار توکوفرول در عصاره‌های گیاهی به‌دلیل ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و نیز آثار مثبت بیولوژیک و تغذیه‌ای آن‌ها بر واکنش‌های سوخت و ساز بدن انسان بسیار حائز اهمیت است. نتایج مربوط به میزان ترکیبات فنولی (میلی‌گرم اسید گالیک بر ۱۰۰ گرم عصاره) و توکوفرولی (میلی‌گرم آلفا توکوفرول در ۱۰۰ گرم

www.SID.ir

Archive of SID

عصاره) عصاره برگ تـوت (*Morus alba* L.) کـه بـا روش‌های مختلف استخراجی در شـکل ۱ نشـان داده شده است.



شکل ۱: ترکیبات فنولی و توکوفرولی عصاره‌ها

Figure 1. Phenolic compounds and tocopherol extracts

همان‌طور که مشاهده می‌شود روش استخراج تأثیر معنی‌داری بر میزان ترکیبات فنولی عصاره برگ تـوت داشته است (P<۰/۰۵). بالاترین میزان ترکیبات فنولی در عصاره اسـتخراج شـده بـا اولتراسـوند (۴۴۲۶/۰۸ میلی‌گرم اسید گالیک بر ۱۰۰ گـرم عصـاره) مشـاهده شد و عصاره غوطه وریی (۳۰۷۶/۲۱ میلی‌گـرم اسـید گالیک بر ۱۰۰ گرم عصاره) کمترین ترکیبات فنولی را داشت.. روش اولتراسوند با تخریب دیواره سلول‌های زیستی شده سـبب خـروج بیشـتر ترکیبـات فنـولی و زیست فعال نسبت به سایر روش‌ها مـی‌شـود (۹). در این روش امواج فراصـوت بـا فرکـانس بـالاتر از ۲۱ کیلوهرتز، به داخـل مـاده نفـوذ کـرده موجـب ایجـاد کشیدگی و جمع‌شدن‌های پی در پی شده که در نتیجه آن حفراتی در دیواره سلول گیاهی ایجـاد مـی‌شـوند. این حفرات بـه صـورت نامتقـارن بـه هـم پیوسـته و موجب خروج سریع مواد از داخل سلول‌ها به خـارج از آن می‌شوند (۹).

ایـن نتـایج بـا نتـایج اسـماعیل زاده و همکـاران (۲۰۱۴) هم خوانی داشت، آنها اعلام نمودند که روش اولتراسوند توانست تـأثیر مثبتـی بـر روی روش‌هـای اتانولی، آبی– اتانولی و آبی عصاره کنجد داشته باشـد و ترکیبات فنولی بیشتری را در این روش‌هـا بدسـت آمد (۹). همچنین آنها اعـلام نمودنـد کمتـرین میـزان ترکیبات فنولی در روش اسـتخراج آبـی بـوده اسـت. علاوه بر این منصـول مـلا شـاهی و وارسـته (۲۰۱۴) عصاره اتانولی (۷۰ درصد) گیـاه کنگـر فرنگـی را بـا استفاده از روش‌های مختلف خیسـاندن و اولتراسـوند استخراج کردند که نتـایج نشـان داد بیشـترین مقـدار فنول کل متعلق به عصاره اولتراسوند بود (۱۸).

www.SID.ir

Archive of SID

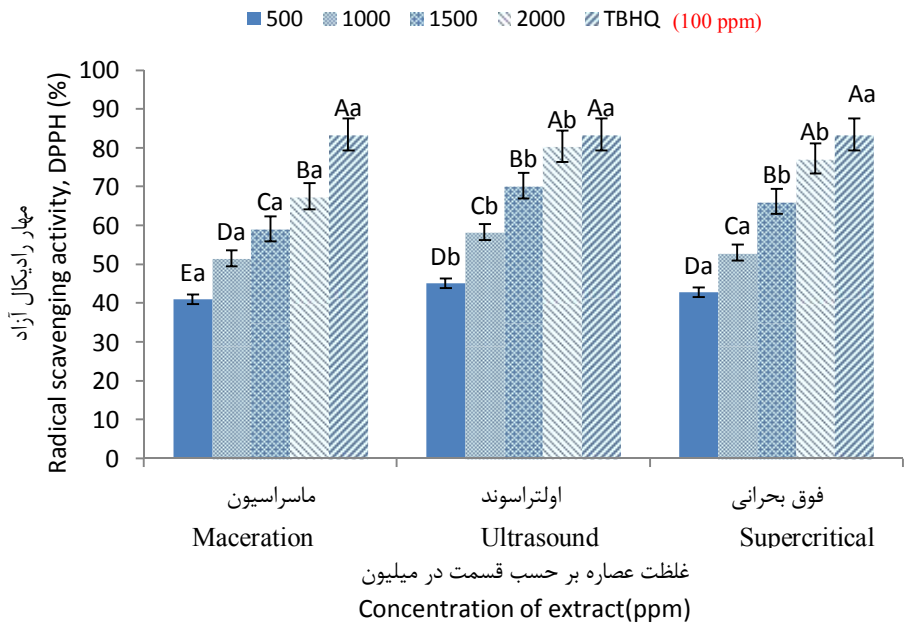
از نظر توکوفرول، بالاترین و کمترین میزان توکوفرول در عصاره‌های استخراج شده با اولتراسوند (۱۰۶/۸۴ میلی‌گرم آلفا توکوفرول در ۱۰۰ گرم عصاره) و غوطه وری (۱۰۱/۵۲ میلی‌گرم آلفا توکوفرول در ۱۰۰ گرم عصاره) (شکل ۱) حاصل شد. ضمن اینکه اختلاف معنی‌داری در روش‌های مختلف استخراج مشاهده نشد ($P<0/05$).

این نتایج با نتایج لوکاس و همکاران (۲۰۰۲) مطابقت دارد (۱۶)؛ آن‌ها اعلام نمودند توکوفرول‌های موجود در عصاره برگ زیتون در روش‌های معمولی استخراج از بین می‌رود زیرا توکوفرول حساس به حرارت و اکسیداسیون است. اولتراسوند با اعمال تغییرات مکانیکی در دیواره سلول‌های گیاهی نفوذ حلال به داخل سلول گیاهی را تسهیل و منجر به آزادسازی ترکیبات موجود در گیاه می‌شود؛ لذا اولتراسوند به دلیل تخریب سلولی و انتقال جرم کارآمد نقش به سزایی در افزایش ترکیبات فنولی و توکوفرولی عصاره دارد. نتایج هدایت زاده ابهری و اسماعیل زاده کناری (۲۰۱۴) در استخراج عصاره برگ شاه توت با استفاده از سه حلال اتانول ۷۰٪، اتانول/آب ۵۰٪ و آب به صورت مجزا و به کمک اولتراسوند و مایکروویو نشان داد بیشترین مقدار توکوفرول در عصاره اولتراسوند به کمک اتانول/آب بدست می‌آید (۱۲). یانگ و همکاران (۲۰۱۳) زمان کمتر استخراج و کاهش مصرف حلال را از عوامل مهم کارامدی روش اولتراسوند برای استخراج عصاره دانستند (۲۸).

خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها- مهار رادیکال آزاد DPPH: مدل به دام‌اندازی رادیکال آزاد DPPH به‌طور گسترده برای ارزیابی توانایی به دام اندازی رادیکال آزاد در نمونه‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۷). عصاره‌های گیاهی به علت دارا بودن ترکیبات فنولی دارای فعالیت آنتی اکسیدانی و ظرفیت بالایی برای اهدای اتم هیدروژن یا الکترون و الکترون آزاد می‌باشد. بر اساس نتایج مربوط به مهار رادیکال آزاد DPPH غلظت‌های مختلف عصاره (شکل ۲)، صرفنظر از نوع روش استخراج، افزایش غلظت عصاره میزان مهار رادیکال آزاد DPPH در محدوده ۴۰/۹۸ درصد تا ۷۷/۴۶ درصد بطور معنی‌داری ($P<0/05$) افزایش یافته است. بیشترین میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH در عصاره‌هایی که با روش اولتراسوند استخراج شدند مشاهده شد. در غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ قسمت در میلیون، بین عصاره‌های فوق بحرانی و غوطه وریی اختلاف معنی‌دار آماری وجود نداشت و در غلظت‌های ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ قسمت در میلیون، بین عصاره فوق بحرانی و اولتراسوندی اختلاف معنی دار آماری مشاهده نشد. در مقایسه آنتی اکسیدان سنتزی TBHQ با عصاره‌ها مشاهده شد که غلظت ۲۰۰۰ قسمت در میلیون از عصاره‌های اولتراسوندی و فوق بحرانی با ۱۰۰ قسمت در میلیون از آنتی اکسیدان سنتزی TBHQ اختلاف معنی‌دار آماری وجود نداشت، هر چند آنتی اکسیدان TBHQ میزان مهار رادیکال آزاد بالاتری را نشان داد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲: فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

Figure 2. DPPH radical scavenging activity

حروف بزرگ غیر مشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری بین غلظت‌های مختلف در سطح ۵ درصد است

Different capital letters indicate significant difference between different concentrations at the 5% level

حروف کوچک غیر مشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری بین عصاره‌های مختلف در سطح ۵ درصد است

Different small letters indicate significant difference between different extracts at the 5% level

علت بالا بودن میزان مهار رادیکال آزاد DPPH را در این تیمارها را می‌توان به علت بالا بودن ترکیبات فنولی در آن‌ها دانست. افزایش غلظت ترکیبات فنلی به‌طور مستقیم توانایی 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 رادیکال آزاد و به دنبال آن قدرت مهار کنندگی عصاره افزایش می‌یابد. توانایی و مهارکنندگی فنول‌ها به‌دلیل گروه‌های هیدروکسیل (-OH) گروه‌های قابل تعویض متوکسی (-OCH 3) در مولکول‌ها است (۱۸). خصوصیات آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولی وابسته به توانایی آن‌ها در دادن الکترون برای به دام انداختن رادیکال‌های آزاد بوسیله تشکیل ترکیبات پایدار فنوکسیل می‌باشد. خواص آنتی‌اکسیدانی فلاونوئیدها به خاطر وجود گروه‌های هیدروکسیل فنولی در ساختمان آن‌ها است. به دام انداختن و حذف رادیکال‌های آزاد از نقش‌های مهم فعالیت آنتی اکسیدانی این ترکیبات می‌باشد (۱۹). قاسم زاده و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که بیشترین فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH مربوط به عصاره برگ‌های درخت کاری *Murraya koenigii* L. می‌باشد که توسط کمک فرآیند اولتراسوند به همراه ۸۰٪ متانول استخراج گردید که این نتایج با یافته‌های این تحقیق مشابه بود (۱۱). همچنین شکوه صارمی و همکاران (۲۰۱۷) عصاره گیاه اناریجه را با استفاده از روش‌های غوطه وری، اولتراسوند و سیال فوق بحرانی استخراج و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با استفاده از آزمون مهار رادیکال آزاد DPPH بررسی کردند (۲۵). عصاره حاصل از اولتراسوند بالاترین

www.SID.ir

Archive of SID

فعالیت آنتی‌اکسیدانی را در روش مهار رادیکال آزاد DPPH داشت که به‌دلیل وجود ترکیبات فنولی بالاتر در این عصاره، دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ظرفیت بالاتر در اهدای اتم هیدروژن یا الکترون و الکترون آزاد می‌باشد.

بی‌رنگ شدن بتاکاروتن/ لینولئیک اسید: رادیکال‌های سنتزی DPPH از روش‌های مهم برای نشان دادن قدرت و خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. اما نمی‌توانند با سوبسترای اکسیژن بیولوژیکی ترکیب شوند. بنابراین اطلاعات دقیق و مشخصی از فعالیت مهار رادیکال‌ها در عصاره نمی‌دهند. به این علت است که برای تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره از روش بتا کاروتن/ امولسیون اسید لینوئیک استفاده می‌شود (۹). با آزمون بی‌رنگ شدن بتاکاروتن می‌توان‌به قدرت خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها پی برد. به این صورت که مواد ناشی از اکسیداسیون اسید لینولئیک با بتاکاروتن بر هم‌کنش داده، سبب تجزیه هیدرو پراکسیدهای تولیدی و سبب کاهش رنگ شده و در نتیجه میزان جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر کاهش می‌یابد (۴).

نتایج مربوط به بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره با استفاده از روش بی‌رنگ شدن بتاکاروتن/ لینولئیک اسید در جدول ۱ نشان داده شده است. مشاهده می‌شود که با افزایش غلظت عصاره در تمام نمونه‌های مورد بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش یافته است و اختلاف معنی‌دار آماری ایجاد شده است. در تمام غلظت‌های مورد بررسی نمونه‌های اولتراسوندی بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و عصاره‌های استخراج شده با روش غوطه وری کمترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را داشتند. از نظر اختلاف بین نمونه‌ها نیز مشاهده می‌شود که در تمام غلظت‌های مورد بررسی بجز ۲۰۰۰ قسمت در میلیون، بین عصاره‌های استخراج شده با حلال و فوق بحرانی اختلاف معنی‌دار آماری وجود نداشت و در غلظت ۲۰۰۰ قسمت در میلیون هر سه نمونه با هم اختلاف معنی‌دار آماری داشتند. از نظر اختلاف بین آنتی اکسیدان سنتزی TBHQ و عصاره نیز مشاهده می‌شود که عصاره استخراج شده با اولتراسوند در غلظت ۲۰۰۰ قسمت در میلیون با نمونه TBHQ اختلاف معنی دار آماری نداشت.

جدول ۱: بی‌رنگ شدن بتاکاروتن/لینولئیک اسید عصاره‌ها (بر حسب درصد)

Table 1. β – carotene/ linoleic acid bleaching of extracts (%)

نوع عصاره Type of extract	غلظت (ppm) Concentration				
	500	1000	1500	2000	TBHQ
غوطه‌وری Maceration	36.25 ± 3.9^{Eb}	46.02 ± 3.61^{Db}	54.72 ± 6.22^{Cb}	6288 ± 4.3^{Bc}.	77.24 ± 2.8^{Aa}
اولتراسوند Ultrasound	42.32 ± 5.2^{Da}	54.17 ± 2.57^{Ca}	64.53 ± 4.08^{Ba}	75.29 ± 5.18^{Aa}	77.24 ± 2.8^{Aa}
فوق بحرانی Supercritical	38.78 ± 2.7^{Eb}	49.13 ± 1.93^{Db}	58.42 ± 2.41^{Cb}	67.34 ± 3.64^{Bb}	77.24 ± 2.8^{Aa}

حروف کوچک غیر مشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۵ درصد است.

حروف بزرگ غیر مشابه در هر سطر نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۵ درصد است.

[a-c] Mean of % in the same column without a common superscript letter differ significantly ($p<0.05$).

[A-C] Mean of % in the same row without a common superscript letter differ significantly ($p<0.05$).

www.SID.ir

Archive of SID

ایـن نتـایج بـا نتـایج تاتیـا و همکـاران (۲۰۱۱) مطابقت دارد (۲۶). کارابوویـک و همکـاران (۲۰۱۴) نیز اعلام نمودند با افـزایش ترکیبـات فنـولی فعالیـت آنتی اکسیدانی عصاره افـزایش مـی‌یابـد (۱۳).نمونـه حلالی کمتـرین خاصـیت بازدارنـدگی و نمونـه‌هـای اولتراسـوندی بیشـترین خاصـیت آنتـی‌اکسـیدانی را داشتند. ژوو و همکاران (۲۰۱۱) ضمن بررسی اثـرات عصاره جوانه گندم اعـلام نمودنـد کـه نـوع حـلال و روش استخراج تأثیر مهمـی بـر میـزان فعالیـت انتـی اکسیدانی عصاره دارد (۲۹). عصاره‌گیری از برگ شاه توت با استفاده از سه حلال اتـانول ۷۰٪، اتـانول/آب ۵۰٪ و آب به صورت مجزا و به کمک اولتراسـوند و مایکروویو توسط هدایت زاده ابهری و اسـماعیل زاده کنـاری (۲۰۱۴) انجـام شـد (۱۲). بیشـترین مقـدار توکوفرول در عصاره اولتراسوند به کمـک اتـانول/آب مشاهده شد. در سیسـتم بتاکـاروتن -لینولئیـک اسـید عصاره اولتراسوند به کمک آب نشان دهنده بـالاترین درصـد مهارکننـدگی بـود کـه در مقایسـه بـا TBHQ بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی را به خـود اختصـاص داد.

نتیجه‌گیری

پژوهش حاضر با هـدف بررسـی اثـر روش‌هـای مختلـف اسـتخراج غوطـه وری، فـوق بحرانـی و اولتراسوند بر میـزان ترکیبـات فنـولی و توکـوفرول و ویژگی‌های آنتی اکسیدانی عصاره بـرگ تـوت سـفید انجام شد. بالاترین میزان ترکیبات فنولی و توکوفرول در روش اولتراسوند حاصل شده است. بین ترکیبـات مؤثره عصاره و فعالیت آنتی اکسیدانی رابطـه مسـتقیم وجود داشت و با افزایش غلظت عصاره فعالیت آنتـی اکسیدانی افزایش یافت. عصاره برگ توت سفید که با استفاده از روش اولتراسـوند اسـتخراج شـده بـود در غلظـت ۲۰۰۰ قسـمت در میلیـون بـا آنتـی اکسـیدان سنتزی TBHQ در غلظت ۱۰۰ میلیـون در قسـمت از نظر فعالیت آنتی اکسیدانی اخـتلاف معنـی‌دار آمـاری نداشت. در مجموع می‌توان گفت با توجه به فراوانـی درختان توت در کشور، برگ تـوت سـفید مـی‌توانـد به‌عنوان یک منبع ارزان قیمت برای تهیه عصاره مـورد استفاده قرار گیرد و به‌عنوان یک آنتی اکسیدان طبیعی معرفـی شـود. ایـن آنتـی اکسـیدان مضـرات آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی را ندارد.

منابع

1. Albo, A.P. 2001. Effect sesame seed flour on millet biscuit characteristics, Plant Foods for Human Nutrition. 56: 195-202.
2. Amarowicz, R., Pegg, R.B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., and Weil, J.A. 2004. Free radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. Food Chemistry. 84: 551–562.
3. Arabshahi, S., Devi, D.V., and Urooj, A. 2007. Evaluation of antioxidant activity of some plant extracts and their heat, Ph and storage stability. Food Chemistry. 100: 1100-1105.
4. Ayoughi, F., Barzegar, M., and Sahari, M. 2009. Evaluation of antioxidant activity and chemical compounds of essence of *Matricaria chamomile* plant. 18th national conference of Food Science and Technology (In Persian).
5. Chu, Q., Lin, M., Tian, X., and Ye, J. 2006. Study on capillary electrophoresis amperometric detection profiles of different parts of *Morus alba L*. Journal of Chromatography A. 1116: 1-2.286-290.
6. Delfanian, M., Esmaeilzadeh Kenari, R., and Sahari, M.A. 2015. Influence of extraction techniques on antioxidant properties and bioactive compounds of loquat fruit (*Eriobotrya japonica Lindl*.) skin and pulp extracts. Food Science & Nutrition. 3(3): 179–187
7. Demir, H., Acik, L., Burcu Bali, E., Koc, L.Y., and Kaynak, G. 2009. Antioxidant and antimicrobioal Solidayo

www.SID.ir

Archive of SID

15. Loew, D. and M. Kaszkin. 2002. Approaching the problem of bioequivalence of herbal medicinal products. Phytotherapy Research. 16: 705-711.
16. Lucas A. de, Martinez de la Ossa E., Rincon J., Blanco M.A., and Gracia I. 2002. Supercritical fluid extraction of tocopherol concentrates from olive tree leaves. Journal of Supercritical Fluids. 22 (3): 221–228.
17. Lee, S. Y., Dangaran, K.L., Guinard, J.X., and Krochta, J.M. 2002. Consumer acceptance of whey-protein-coated versus shellaccoated chocolates. Journal of food science. 67:2764–2769.
18. Mansoul Molla Shahi, A., and Varasteh Moradi, A. 2015. Investigation of different extraction methods on effective compounds and antioxidant activity of *Cynara scolymus* L. extract in Golestan province. Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants. 3:74-85. (In Persian)
19. Mathew, S., and Abraham, T.E. 2006. In vitro antioxidant activity and scavenging effects of Cinnamomum verum leaf extract assayed by different methodologies. Food Chemistry and Toxicology. 44: 198-206.
20. Palasuwan, A., Soogarun, S., Lertlum, T., Pradniwat, P., and Wiwanitkit, V. 2006. Inhibition of Heinz body induction in an in vitro model and total antioxidant activity of medicinal thai plants. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 6:458-463.
21. Peterson D.M, Emmons C.L, and Hibbs A. 2001. Phenolic antioxidant activity in pearling fractions of oat groats. Cereal Science. 33: 97-103.
22. Pokorny, J., Yanishlieva, N., and Gordon, M. 2001. Antioxidants in food. 1thed. New York. CRC. Press, USA. pP:107.
23. Prakash V. 1990. Leafy spices. CRC Press, Boca Raton, pp 1–2
24. Sakanaka, S., Tachibana, Y. 2005. Active oxygen scavenging activity of egg-yolk protein hydrolysates and their effects on lipid oxidation in beef and tuna homogenate. Food Chemistry. (95): 243-249.

Virga-aurea L. extracts. African Journal of Biotechnology. 8:274- 279.
8. Donald S., Prenzler, P. D., Autolovich, M., and Robards, K. 2001. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. Food chemistry. 73:73-84.
9. Esmaeilzadeh kenari R., Mohsenzadeh, F., and Amiri, Z., 2014. Antioxidant activity and total phenolic compound of Dezful sesame cake extracts obtained by classical and ultrasound assisted extraction methods. Food Science and Nutration, doi;10.1002/fsn3.118.
10. Farahmandfar, R. 2012. Comperihensive chemistry and technology of edible oil. Sahra press, 248p. (In Persian)
11. Ghasemzadeh, A., Jaafar, H. ZE., Karimi, E., and Rahmat, A. 2014. Optimization of ultrasound-assisted extraction of flavonoid compounds and their pharmaceutical activity from curry leaf (*Murraya koenigii* L.) using response surface methodology. BMC Complementary and Alternative Medicine. 14:318-328.
12. Hedayat Zadeh Abhari, M. and Esmailzadeh Kenari, R. 2013. Effect of different extraction methods (ultrasound and microwave) on antioxidant properties of leaf extract. The 2nd national conference on optimization of production, distribution and consumption chain in the food industry, Sari, Iran. http://www.civilica.com /Paper-COPDCFI02-COPDCFI02_ 226. html. (In Persian)
13. Karabegovic I.T., Stojicevic S.S., Velickovic D.T., Todorovic Z.B., Nikolic N.C., and Lazic M.L. 2014. The effect of different extraction techniques on the composition and antioxidant activity of cherry laurel (*Prunus laurocerasus*) leaf and fruit extracts. Industrial Crops and Products. 54:142–148
14. Kim, J.S., Ju, J.B., Choi, C.W. and Kim, S.C. 2006. Hypoglycemic and antihyperlipidemic effect of four Korean medicinal plants in alloxan induced diabetic Rats. American Journal of Biochemistry and Biotechnology. 2 (4): 154-160.

www.SID.ir

Archive of SID

Total Tocopherols in Palm Oil, Olein and Stearin. Journal of American Oil Chemists' Society. 65(2): 258–261.

28. Yang Y. Wei M., Huang T., Lee S., and Lin, Sh. 2013. Comparison of modified ultrasound-assisted and traditional extraction methods for the extraction of baicalin and baicalein from Radix Scutellariae. Industrial Crops and Products. 45: 182–190.
29. Zhu, K.X., Lian, C.X., Guo, X.N., Peng, W., and Zhou, H.M. 2011. Antioxidant Activities and Total Phenolic Contents of Various Extracts from Defatted Wheat Germ. Food Chemistry. 126: 1122-1126.
25. Shokooh Saremi, E., Habibi Najafi, M.B., Hadad Khodaparast, M.H., and Bahreini, M. 2017. Effect of extraction methods on the antioxidant properties of *affinis pimpinella*. Journal of Food Science and Technology. 14 (69): 159-169. (In Persian)
26. Tatiya A.U., Tapadiya G.G., Kotecha S., and Surana S.J. 2011. Effect of solvents on total phenolics, antioxidant and antimicrobial properties of Bridelia retusa Spreng stem bark. Indian Journal of Natural Products and Resources. 2(4): 442-447.
27. Wong M.L., Tlmms R.E., and Goh E.M. 1988. Colorimetric Determination of

www.SID.ir

Archi

EJFPP, Vol. 10 (1): 85-98
http://ejfpp.gau.ac.ir

Effect of different extraction methods on phenolic compounds and antioxidant properties of white mulberry (*Morus alba* L.) leaf extract

B. Sedaghat[1], L. Najafian*[2]
[1]M.Sc. graduate, Department of Food Sciences and Technology,
Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran
[2]Assistant Prof., Department of Food Science and Technology,
Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran
Received: 2017/01/27; Accepted: 2017/10/16

Abstract

Background and objectives: Oxidation is the main causes of oils and fats rancidity. Oil oxidation changes the organoleptic properties of food and also reduces nutrition value and shelf life of oils. Synthetic antioxidants such as TBHQ, BHT, BHA and GA are added to oils and fats to preventing off-flavour that occurs by oxidation. Due to the adverse effects of such synthetic antioxidants health including mutagenic and carcinogenic effects, production of natural antioxidant as alternative for synthetic antioxidants is necessary. The aim of this study was to evaluate the effects of extraction techniques on phenolic compounds and antioxidant activity of white mulberry leaves extract as natural antioxidant.

Materials and Methods: The white mulberry leaves were dried and milled followed by different extraction techniques like maceration (ethanol solvent – water, 50:50), ultrasound assisted and supercritical fluid extraction. Total phenolic compounds (TPC) and tocopherol (TC) were measured using Folin–Ciocalteu method and colorimetric assay and antioxidant activity of resulted extracts were measured using 1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) radical scavenging, and β-caroten/linoleic bleaching assays. Antioxidant activity of the extracts was compared with that synthetic antioxidant TBHQ.

Results: The TPC and TC in ultrasonic extract were higher than those in other extracts. DPPH radical scavenging, and also in β-Caroten/linoleic acid assay, the activities of extracts were significantly concentration-dependent and more potent at higher extracts concentration. Free radical scavenging value varied from 40.98% to 77.46%. At all concentrations examined, samples from ultrasound-assisted extraction had the highest antioxidant activity and those from maceration extraction method showed the lowest activity. When extract concentration increased from 100 to 2000 ppm, antioxidant activity increased, while at 2000 ppm, the extracts activity was not statistically different from TBHQ (at 100 ppm).

Conclusion: In overall, the results this of study indicated that the ultrasound-assisted extraction was more effective in obtaining mulberry leaf extracts with antioxidant activity. The high antioxidant activity of the extracts appeared to be attributed to its high tocopherol and phenolics contents. Therefore, white mulberry leaf extract may be used as a natural antioxidant to replace the synthetic antioxidants in food industry.

***Keywords*:** White mulberry leaf extract, Antioxidant, Maceration, Ultrasound, Supercritical

*Corresponding Author; najafian_5828@yahoo.com

www.SID.ir