

مقایسه خواص آنتیاکسیدانی و ضدرادیکالی عصاره متانلی سبزی‌های برگی خوراکی

غلامعلی گلی‌موحد^{۱*}، معصومه مهربان سنگ‌آتش^۲

۱- مریم پژوهش، عضو هیات علمی گروه پژوهشی فرآوری مواد غذایی، جهاددانشگاهی واحد مشهد

۲- مریم پژوهش، عضو هیات علمی گروه پژوهشی کیفیت و اینمنی مواد غذایی، جهاددانشگاهی واحد مشهد

*آدرس مکاتبه: مشهد، میدان آزادی، پردیس دانشگاه فردوسی، سهراهی علوم تربیتی، پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی جهاددانشگاهی واحد مشهد، صندوق پستی: ۹۱۷۷۵ - ۱۳۷۶

تلفن: ۰۵۱۱ (۸۷۶۲۰۰۴)، نامبر: ۰۵۱۱ (۸۳۲۳۷۱)

پست الکترونیک: qgoli@yahoo.com

تاریخ تصویب: ۸۷/۸/۲۴

تاریخ دریافت: ۸۶/۱۰/۱

چکیده

مقدمه: هر چند موجودات زنده هوایی سیستم‌های آنتیاکسیدانی کارآمدی دارند اما رژیم غذایی قادر است با تامین آنتیاکسیدان، نقش موثری در کاهش آثار تنفس اکسایشی ایفا نماید. تنفس اکسایشی در بروز سلطان، تصلب شرائین و پیری موثر است. هدف: در این پژوهش فعالیت آنتیاکسیدانی و ضدرادیکالی سبزیجات برگی که به صورت تازه‌خوری مصرف می‌شوند (تره، شاهی، نعناع، ریحان، ترخون و گشنیز) بررسی و مقایسه شد.

روش بررسی: از برگ‌های خشک شده نمونه‌ها، عصاره متانلی تهیه و فعالیت آنتیاکسیدانی آن‌ها در سیستم مدل اسیدلینولئیک بررسی شد. فعالیت ضدرادیکالی عصاره‌های به دست آمده نیز با استفاده از سیستم مدل حاوی رادیکال DPPH ارزیابی شد.

نتایج: نتایج نشان داد شاهی بیشترین (۱۱/۶۲ درصد) و ریحان کمترین (۴/۴۲ درصد) بازده استخراج را داشتند. همچنین در سیستم مدل امولسیون اسیدلینولئیک مشخص شد عصاره م atanلی ترخون بیشترین کارایی را در پیشگیری از اکسایش از خود بروز داد. (طول دوره القاء معادل ۶۰/۳ ساعت در مقایسه با ۱۳/۴ ساعت برای نمونه شاهد). در سیستم حاوی DPPH، نعناع و ترخون بالاترین فعالیت را از خود نشان دادند به طوری که کمترین مقدار IC50 (۲۱۹ میکروگرم در میلی‌لیتر) به نعناع تعلق داشت. این مقدار حتی از میزان IC50 ترکیب ستنتزی BHT نیز کمتر بود هرچند بین نعناع، BHT و ترخون اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: در مجموع مشخص شد عصاره م atanلی ترخون و نعناع بالاترین میزان فعالیت ضدرادیکالی و آنتیاکسیدانی را دارا بود.

گل واژگان: آنتیاکسیدان طبیعی، خواص ضدرادیکالی، رادیکال DPPH، سبزی‌های برگی

مقدمه

مواد می‌توانند نقش زیادی در تامین فیبر، ویتامین و املاح موردنیاز بدن داشته باشند. از سویی این گیاهان می‌توانند منبعی از آنتی اکسیدان‌های طبیعی باشند. جوانمردی و همکاران (۲۰۰۳) فعالیت آنتی اکسیدانی و میزان کل ترکیبات فنلی ۲۳ نوع ریحان ایرانی را بررسی کردند. نتایج نشان داد میزان کل ترکیبات فنلی بین ۲۲/۹ تا ۶۵/۵ میلی‌گرم اکی‌والان اسید‌گالیک در گرم در انواع ریحان مورد بررسی (ماده خشک) متغیر بود [۴]. هاینپورگ^۱ و همکاران (۲۰۰۶) فعالیت آنتی اکسیدانی برخی از سبزی‌ها و ادویه‌ها (ریحان، برگ‌بو، جعفری، سروکوهی، تخم بادیان، رازیانه، زیره سبز، هل و زنجیل) را بررسی کردند. نتایج نشان داد یک گرم عصاره ریحان قدرت آنتی اکسیدانی برابر با ۱۷۷ میلی‌گرم توروولوكس (معادل ویتامین E) داشت. آن‌ها میزان کل ترکیبات فنلی عصاره ریحان را ۱۴۷ میلی‌گرم اسید گالیک بر گرم برآورد کردند [۵]. المماری^۲ (۲۰۰۲) فعالیت آنتی اکسیدانی ۱۷ نوع سبزی مورد مصرف در یمن را بررسی کرد که در این بین گشتنیز بالاترین میزان میزان فعالیت آنتی اکسیدانی را به خود اختصاص داد [۶].

در این پژوهش قدرت به داماندازی رادیکال آزاد و خواص آنتی اکسیدانی عصاره متنالی تره^۳، گشنیز^۴، ریحان^۵، شاهی^۶، نعناع^۷ و ترخون^۸ مورد مقایسه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی

تیوسیانات آمونیوم، پتاسیم دی هیدروژن فسفات، سدیم هیدروژن فسفات، اسید کلریدریک، اسید لینولئیک، متنال، اتانول با خلوص بالا در حد آزمایشگاهی از شرکت مرک تهیه شد. ترکیبات DPPH و کلرید آهن II نیز از شرکت سیگما خریداری شد.

¹ Hinneburg

³ Allium ampeloprasum

⁵ Ocimum basilicum

⁷ Mentha spicata

² Al-Mamary

⁴ Coriandrum sativum

⁶ Lepidium sativum

⁸ Artemisia dracunculus



خواندن جذب نمونه‌ها، ۱/۰ سی سی از امولسیون با ۹/۷ سی سی اتانول ۷۵ درصد و ۰/۱ سی سی محلول ۰/۰۲ مولار کلرید فرو در اسید کلریدریک ۱۰ درصد مخلوط شد. پس از گذشت زمان ۳ دقیقه به این مخلوط ۰/۱ سی سی تیوسیانات آمونیوم ۳۰ درصد (W/V) اضافه و سپس جذب محلول در طول موج ۵۰۰ نانومتر خوانده شد [۷].

اساس این روش، اکسایش آهن II توسط پراکسیدهاست. آهن III به وجود آمده، با تیوسیانات آمونیوم کمپلکس قرمز رنگی ایجاد می‌کند. کمپلکس به وجود آمده در طول موج ۵۰۰ نانومتر دارای بیشترین جذب است و به عنوان شاخصی از میزان پراکسید موجود در نظر گرفته می‌شود.

برای مقایسه قدرت آنتی اکسیدانی تیمارهای مورد بررسی از روش تعیین طول دوره القاء براساس شبیب دو بخش منحنی اکسایش استفاده شد. به این منظور، در دو مرحله کند و تند منحنی افزایش جذب (شاخص پراکسید)، تابع خطی برآش داده شد. محل برخورد دو خط که با حل معادلات برآش شده به دست آمده بود به عنوان مختصات نقطه پایان مرحله القاء هر تیمار در نظر گرفته شد [۸].

اندازه‌گیری قدرت به داماندازی رادیکال DPPH

برای این منظور از روشی که با و سو^۱ (۲۰۰۷) گزارش کرده بودند، استفاده شد [۹]. واکنش در ۱/۵ میلی لیتر متانل حاوی ۱،۱-دی‌فنیل-۲-پیکریل هیدرازیل (DPPH) (غلظت ۰/۵ میلی مولار) و عصاره (غلظت ۱۰۰ تا ۵۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) انجام شد. براساس آزمایش‌های مقدماتی غلظت‌های ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر برای ترخون، نعناع و ترکیب BHT و غلظت‌های ۱۰۰۰، ۲۵۰۰ و ۵۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر برای سایر سبزی‌ها استفاده شد. مخلوط به مدت سی دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد و سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد.

درصد بازداری از DPPH نمونه‌ها با مقایسه نمونه‌های عصاره و نمونه کنترل و استفاده از رابطه زیر به دست آمد:

[۱۰]

تهیه و آماده‌سازی نمونه‌های سبزی

سه نمونه مختلف از سبزی‌های مورد بررسی از فروشگاه‌های محلی تهیه شد. پس از حذف قسمت‌های غیرخوراکی و شستشو با آب آشامیدنی، سبزی‌ها در شرایط دور از نور آفتاب و با جریان ملایم هوا خشک و تا زمان انجام مراحل بعدی در دمای یخچال نگهداری شدند.

استخراج عصاره

برای استخراج عصاره ابتدا برگ‌ها با آسیاب خرد شدند و سپس طی سه مرحله متوالی طی ۲۴ ساعت با متانل عصاره‌گیری شدند. در مرحله اول، دو گرم نمونه با هفت میلی لیتر متانل مخلوط شد و برای تسريع عملیات استخراج به مدت دو ساعت روی شیکر قرار داده شد. پس از این مدت مخلوط صاف شد و تفاله مجدداً با هفت میلی لیتر متانل مخلوط و عمل قبل تکرار شد. در انتهای تفاله مرحله دوم با شش میلی لیتر متانل مخلوط و در دمای اتاق به مدت ۲۰ ساعت نگهداری و صاف شد. محلول‌های صاف شده سه مرحله با هم مخلوط و با استفاده از کربن فعال رنگبری شد. عصاره حاصله در پلیت‌های شیشه‌ای به صورت لایه نازک پخش و در دمای کمتر از ۴۰ درجه سانتی گراد خشک شد. با توزین پلیت‌ها (خالی و پس از خشک شدن عصاره) مقدار عصاره استحصالی و با تقسیم آن بر وزن نمونه بازده استخراج تعیین شد. عصاره تا زمان انجام آزمایش‌ها در دمای یخچال نگهداری شد [۷].

تعیین قدرت آنتی اکسیدانی در سیستم مدل اسید لینولئیک برای بررسی اثر روش استخراج و نوع ماده اولیه بر قدرت آنتی اکسیدانی عصاره سبزی‌های مورد بررسی از سیستم مدل امولسیونی اسید لینولئیک استفاده شد. به این منظور، ۲ سی سی محلول عصاره با غلظت ۲۰۰ میلی گرم در لیتر، ۲ سی سی محلول ۲/۵۱ درصد (W/V) اسید لینولئیک در اتانول، ۴ سی سی بافر فسفات ۰/۰۵ مولار با $pH = ۷/۰$ و ۲ سی سی آب مقطر در یک شیشه دریچه‌دار مخلوط و به آون $40^{\circ}C$ منتقل شد. پس از گذشت ۶ و ۱۲ ساعت جذب نمونه به روش تیوسیانات اندازه‌گیری شد. این عمل هر ۱۲ ساعت تکرار شد. برای

^۱ Bae and Suh

حالهای کاملاً قطعی و غیرقطعی قرار می‌گیرد. پشل^۱ و همکاران (۲۰۰۶) با بررسی اثر پنج حلال آب، متانل، اتانل، استون و هگزان در استخراج عصاره از ۱۳ نوع ضایعات میوه و سبزی و واحدهای فراوری مواد گیاهی نشان دادند مطابق انتظار حلالهای قطعی آب و متانل بیشترین بازده استخراج را به بار آوردند. همچنین مشخص شد عصارهای متانلی و اتانلی بالاترین میزان ترکیبات فنلی را داشتند [۱۲]. نکته‌ای که باید مورد توجه قرار داد این است که بین بازده استخراج و خصوصیاتی همچون میزان ترکیبات فنلی یا فعالیت آنتی اکسیدانی رابطه‌ی خاص و معنی‌داری وجود ندارد [۵].

فعالیت آنتی اکسیدانی در سیستم مدل امولسیون اسید لیتوئیک
شکل شماره ۲ روند افزایش جذب نمونه‌های امولسیون اسید لیتوئیک حاوی عصاره متانلی سبزیجات را نشان می‌دهد. در این شکل ترکیب ستزی BHT نیز به عنوان کنترل مثبت نشان داده شده است. همانطور که مشخص است نمونه‌های شاهد و حاوی عصاره‌های تره، گشنیز، ریحان و شاهی به سرعت به مرحله شکست منحنی پراکسید شدن رسیده‌اند. مقدار جذب نمونه‌های شاهد، حاوی BHT و حاوی عصاره‌های تره، گشنیز، ریحان، شاهی، نعناع و ترخون پس از ۳۶ ساعت از شروع آزمایش به ترتیب $0/834$ ، $0/010$ ، $0/747$ ، $0/588$ ، $0/487$ ، $0/092$ و $0/307$ بود. این موضوع حاکی از فعالیت نسبتاً خوب عصاره ترخون بود.

^۱ Peschel

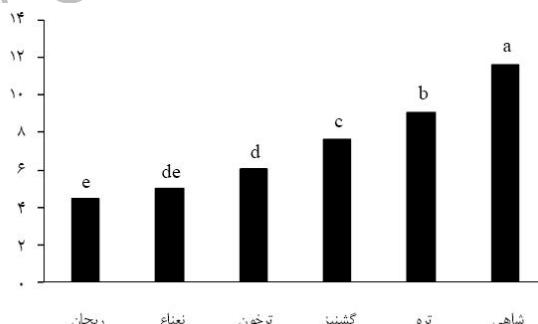
در رابطه فوق $A517_{\text{blank}} - A517_{\text{sample}} \times 100 = \text{درصد بازداری}$ برای مقایسه فعالیت عصاره‌ها از مفهوم IC50 استفاده شد. IC50 غلظتی از عصاره است که برای به دام اندازی ۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد موردنیاز است. برای محاسبه IC50 با استفاده از نرمافزار SlideWrite تابعی بین جذب نمونه و غلظت عصاره برازش شد و با استفاده از معادله به دست آمده IC50 تعیین شد. مقدار IC50 با فعالیت عصاره رابطه عکس دارد [۱۱].

نتایج و بحث

بازده استخراج

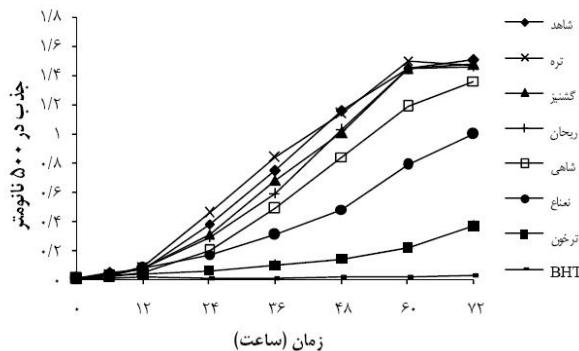
نتایج مقایسه میانگین بازده استخراج عصاره از سبزی‌های مورد بررسی در شکل شماره ۱ نشان داده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود شاهی بیشترین (۱۱/۶۲ درصد) و ریحان کمترین (۴/۴۲ درصد) بازده استخراج را به خود اختصاص دادند، ضمن اینکه اختلاف بین نعناع (۴/۹۸ درصد) با ریحان معنی‌دار نبود.

مهم‌ترین حلال برای استخراج ترکیبات پلی‌فنلی متانل و مخلوط‌های آب - متانل است. سایر حلال‌ها مثل استون و اتیل‌استات و مخلوط‌های آن‌ها نیز مورد استفاده قرار گرفته است اما معمولاً این حلال‌ها باعث کاهش راندمان می‌شوند. عوامل مختلفی بر بازده استخراج عصاره از مواد گیاهی تاثیر می‌گذارند که قطبیت حلال از آن جمله است. قطبیت متانل (در مقایسه با ۱۰/۲ برای آب) است و به این ترتیب بین



شکل شماره ۱- بازده استخراج عصاره متانولی سبزیجات





شکل شماره ۲- روند افزایش جذب نمونه‌های امولسیون اسیدلینوئیک حاوی عصاره متنالی سبزیجات

اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. عصاره تره کمترین میزان فعالیت را از خود نشان داد به طوری که امکان تعیین IC50 برای آن در دامنه غلظتی مورد استفاده ممکن نشد. بین شاهی، گشنیز و ریحان تفاوت معنی‌داری وجود نداشت اما اختلاف شاهی (۳۲۹۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) با گشنیز (۵۰۳۹ میکروگرم در میلی‌لیتر) و ریحان (۵۴۹۸ میکروگرم در میلی‌لیتر) قابل ملاحظه بود. لازم به یادآوری است که برای بررسی سبزیجات، سه نمونه مختلف از مراکز متفاوت تهیه شد و بنابراین واریانس در نمونه‌های سبزی نسبتاً بالا بود که به نظر می‌رسد این موضوع دلیل معنی‌دار نشدن اختلاف بین شاهی و ریحان و گشنیز باشد. هاینبورگ و همکاران (۲۰۰۶) مقدار IC50 را برای به داماندازی رادیکال DPPH توسط ترکیب BHT و اسید آسکوربیک را به ترتیب ۲۱۰ و ۹۰ میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش کردند [۵]. از سویی در پژوهشی که توسط عباس^۱ و همکاران (۲۰۰۶) بر روی برخی از سبزیجات مالایا انجام شد مقدار IC50 عصاره متنالی ریحان را برای به داماندازی رادیکال DPPH معادل ۱۹۰ میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش کردند. آنها این مقدار را برای اسید آسکوربیک ۵/۹ میکروگرم در میلی‌لیتر برآورد کردند [۱۳]. این اختلاف‌ها (که حتی در مورد ترکیب واحد اسید آسکوربیک مشاهده می‌شود) می‌تواند ناشی از متغیرهای آزمایش باشد.

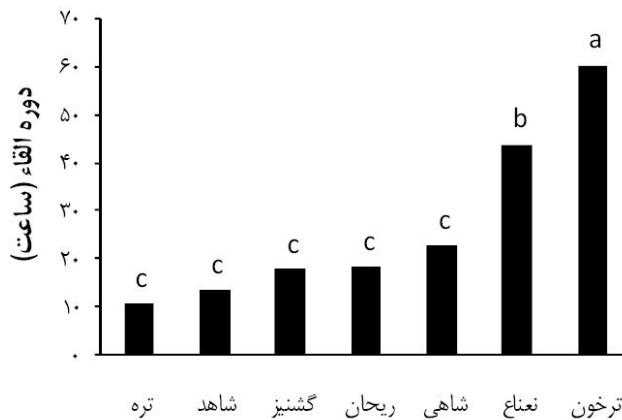
مقایسه طول دوره القاء نمونه‌های موردبررسی (شکل شماره ۳) نیز نشان می‌دهد عصاره ترخون بیشترین فعالیت را از خود بروز داد (طول دوره القاء ۶۰/۳ ساعت در مقایسه با ۱۳/۴ ساعت برای نمونه شاهد). نکته قابل توجه این که طول دوره القاء نمونه حاوی عصاره تره (۱۰/۶ ساعت) هر چند غیرمعنی‌دار اما کمتر از نمونه شاهد بود. این موضوع می‌تواند به دلیل وجود ترکیبات پرواکسیدان یا افزایینده اکسیژن نوزاد از داده باشد. ترکیبات فلزی و عوامل ایجادکننده اکسیژن نوزاد از مهم‌ترین ترکیبات پرواکسیدان موجود در مواد گیاهی هستند.

قدرت به داماندازی رادیکال DPPH

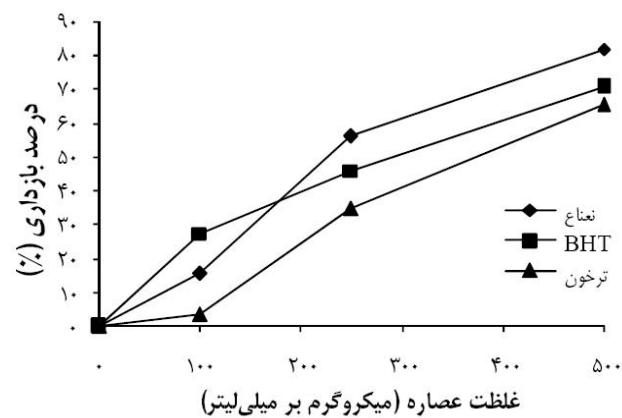
شکل‌های شماره ۴ و ۵ به ترتیب اثر به داماندازی رادیکال DPPH را توسط عصاره متنالی نعناع و ترخون و شاهی، گشنیز، ریحان و تره نشان می‌دهد. همان‌طور که شکل‌ها نشان می‌دهند با افزایش غلظت اثر عصاره‌ها افزایش یافت. تفاوت بین فعالیت نعناع و ترخون و سایر سبزی‌ها به حدی بود که برای انجام آزمایش اختلاف غلظت‌های مورد استفاده به میزان ده برابر رسید. نتایج آزمایش حاکی از فعالیت بالای ترخون و نعناع بود به طوری که فعالیتی معادل ترکیب سنتزی BHT از خود بروز دادند.

شکل شماره ۶ میزان IC50 عصاره سبزیجات مورد بررسی را در به داماندازی رادیکال DPPH نشان می‌دهد. همان‌طور که مشخص است کمترین مقدار ۲۱۹ میکروگرم در میلی‌لیتر به نعناع تعلق داشت. این مقدار حتی از میزان IC50 ترکیب سنتزی BHT نیز کمتر بود هر چند بین نعناع، BHT و ترخون

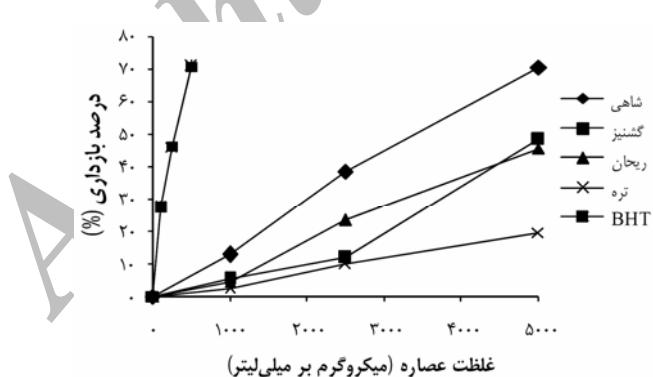
¹ Abbas



شکل شماره ۳- مقایسه طول دوره القاء سیستم امولسیون اسید لینولیک حاوی عصاره مтанولی سبز چایات

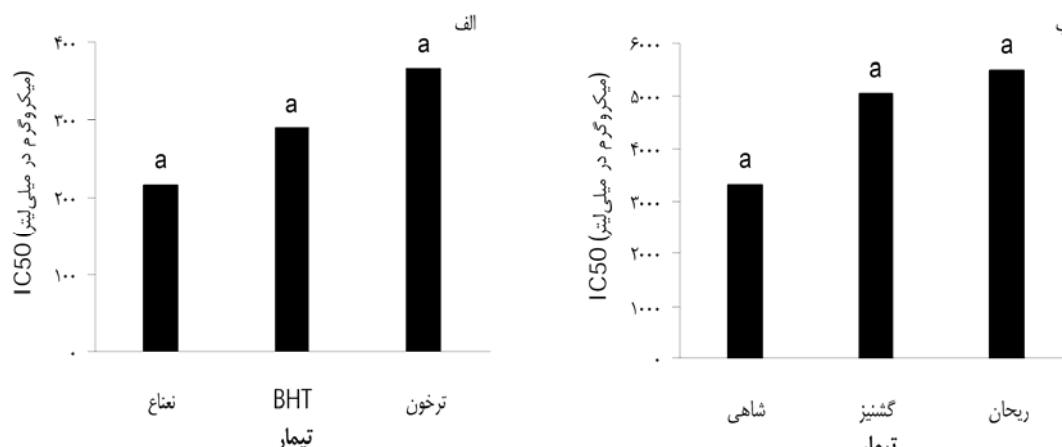


شکل شماره ۴- اثر به دام اندازی رادیکال DPPH توسط عصاره مtanولی نعناع و ترخون



شکل شماره ۵- اثر به دام اندازی رادیکال DPPH توسط عصاره مtanولی شاهی، گشنیز، ریحان و تره





شکل شماره ۶- مقایسه IC_{50} عصاره متابولی سبزیجات در به دامندازی رادیکال DPPH

آنتی اکسیدانی ترخون گزارش‌های کمی وجود دارد و بنابراین بررسی بیشتر این گیاه پیشنهاد می‌شود. همچنین بررسی اثر روش استخراج و نوع حلال‌ها نیز می‌تواند گزینه‌ای برای تحقیقاتی بیشتر باشد. همچنین بررسی تاثیر مصرف این سبزی‌ها بر شرایط فیزیولوژیکی بدن مثل ظرفیت آنتی اکسیدانی سرم مفید خواهد بود.

تشکر و قدردانی

در نهایت نویسندها مقاله مایلند از آقای مهندس امیر سالاری و خانم‌ها مهندس فائزه تجلی و سمانه گازرانی به خاطر زحماتی که در اجرای این تحقیق متحمل شدند سپاس‌گزاری نمایند.

درباره مقدار بالای IC_{50} برای به دامندازی رادیکال DPPH توسط گیاه تره باید به میزان پایین ترکیبات فنلی کل این گیاه اشاره کرد. ترکمن^۱ و همکاران (۲۰۰۵) نشان دادند میزان این ترکیبات در گیاه تره (۳۰۰/۸ میلی‌گرم اکی والان اسید گالیک در ۱۰۰ گرم ماده خشک) به طور معنی‌دار کمتر از سبزیجاتی همچون فلفل، اسکوآش، بروکلی و اسفناج بود. در این تحقیق میزان ترکیبات فنلی کل فلفل (۱۳۴۴/۸ میلی‌گرم اکی والان اسید گالیک در ۱۰۰ گرم ماده خشک) محاسبه شد [۱۴].

نتیجه گیری

براساس نتایج این تحقیق نعناع و ترخون در بین سبزی‌های مورد بررسی بیشترین فعالیت را از خود بروز دادند. با اینکه در خصوص نعناع منابع زیادی وجود دارد اما درباره خواص

¹ Turkmen

منابع

- Liu RH and Hotchkiss JH. Potential genotoxicity of chronically elevated nitric oxide: a review. *Mutat. Res.* 1995; 339: 73 – 89.
- Liu RH. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of

- phytochemicals. *Am. J. Clin. Nutr.* 2003; 78 (suppl): 517S – 20S.
- Block G, Patterson B and Subar A. Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutr. Cancer* 1992; 18



(1): 1 – 29.

- 4.** Javanmardi J, Stushnoff C, Locke E and Vivanco JM. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian Ocimum accessions. *Food Chem.* 2003; 83: 547 – 50.
- 5.** Hinneburg I, Damien Dorman HJ and Hiltunen R. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food Chem.* 2006; 97 (1): 122 - 9.
- 6.** Al-Mamary MA. Antioxidant activity of commonly consumed vegetables in Yemen. *Mal. J. Nutr.*, 2002; 8 (2): 179 - 89.
- 7.** Farhoosh R, Golmovahhed GA and Khodaparast MHH. Antioxidant activity of various extracts of old tea leaves and black tea wastes (*Camellia sinensis* L.). *Food Chem.* 2007; 100 (1): 231 - 6.
- 8.** Pokorny J, Yanishlieva N and Gordon M. (eds.) *Antioxidants in Food: Practical Applications*. CRC Press LLC, Boca Raton, FL 2001.
- 9.** Bae SH and Suh HJ. Antioxidant activities of five different mulberry cultivars in Korea. *LWT*. 2007; 40: 955 - 62.

- 10.** Hou WC, Wu WC, Yang CY, Chen HJ, Liu SY, Lin YH. Antioxidant activities of methanolic and hot-water extracts from leaves of three cultivars of Mai-Men-Dong (*Liriope spicata* L.). *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 2004; 45: 285 - 90.
- 11.** Dasgupta N, De B. Antioxidant activity of some leafy vegetables of India: A comparative study. *Food Chem.* 2007; 101 (2): 471 - 4.
- 12.** Peschel W, Rabaneda F, Diekmann W, Plescher A, Gartzia I, Jimenez D, Raventos L, Buxaderas S and Codina C. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chem.* 2006; 97 (1): 137 – 50.
- 13.** Abbas F, Lajis NH, Israf DA, Khozirah S and Umi Kalsom Y. Antioxidant and nitric oxide inhibition activities of selected Malay traditional vegetables. *Food Chem.* 2006; 95 (4): 566 - 73.
- 14.** Turkmen N, Sari F and Velioglu S. The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. *Food Chem.* 2005; 93 (4): 713 - 8.

