فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲۸، شمارهٔ ۱، صفحهٔ ۷۲-۵۹ (۱۳۹۱)

بررسی اثر استخراج ترکیب‌های فنولی میوه بلوط (*Quercus branti var* persica Lindl.) با حلال‌های مختلف بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها در ثبات اکسیداتیو روغن آفتابگردان

مریم قادری قهفرخی[1*]، مهران اعلمی[2]، علیرضا صادقی ماهونک[2]، محمدحسین عزیزی[3] و محمد قربانی[2]

۱*- نویسنده مسئول، کارشناس ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
پست الکترونیک: mghaderi_gh@yahoo.com
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

تاریخ دریافت: شهریور ۱۳۸۹ تاریخ اصلاح نهایی: بهمن ۱۳۸۹ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۸۹

چکیده

بلوط (*Quercus branti var* persica Lindl.) متعلق به خانواده Fagaceae و جنس *Quercus* می‌باشد. میوه بلوط از دیرباز کاربرد زیادی در طب سنتی داشته‌است و برای درمان بیماریهایی نظیر اسهال، درد معده، بواسیر، نرمی استخوان، کم‌خونی، سوختگی، اگزما و واریس مورد استفاده قرار می‌گیرد. هدف از این مطالعه استخراج ترکیب‌های فنولی میوه بلوط (*Q. branti* var persica) با سامانه‌های مختلف حلال و بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها در ثبات اکسیداتیو روغن آفتاب‌گردان بود. ترکیب‌های فنولی عصاره‌ها با حلال‌های متانول (۸۰٪)، اتانول (۷۰٪) و آب با روش غوطه‌وری استخراج و میزان ترکیب‌های فنولی آنها با روش فولین سیوکالتو اندازه‌گیری شد. جهت بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی، عصاره‌ها در ۳ سطح غلظت ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام، BHA و BHT در دو سطح ۱۰۰ و ۲۰۰ پی‌پی‌ام و TBHQ با غلظت ۲۰۰ پی‌پی‌ام به روغن آفتاب‌گردان بدون آنتی‌اکسیدان افزوده و نمونه‌ها به مدت ۱۲ روز در گرمخانه با دمای ۷۰°C نگه‌داری شدند. اثر محافظت‌کنندگی عصاره‌ها با اندازه‌گیری اعداد پراکسید و تیوباربیتوریک اسید در فواصل زمانی مشخص مورد ارزیابی قرار گرفت. مقدار کل ترکیب‌های فنولی در عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی به‌ترتیب ۷۹/۲۸، ۱۳۸/۴۹ و ۱۸۳/۹۶ میلی‌گرم معادل تانیک اسید در گرم عصاره بود. عدد پراکسید نمونه شاهد از ۲۶/۲۳ به ۳۲۸/۸۸ میلی‌اکی‌والان و عدد تیوباربیتوریک از ۰/۰۷۳ به ۰/۵۸ میلی‌گرم در کیلوگرم رسید. نمونه‌های روغن حاوی TBHQ بیشترین ثبات اکسیداتیو را طی روزهای آزمایش داشتند. با افزایش غلظت عصاره، فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش یافت. البته از بین عصاره‌های فنولی نیز عصاره متانولی (۵۰۰ و ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام) بهترین عملکرد را داشت و بهتر از BHT قابل رقابت بود. سایر عصاره‌ها نیز با BHA و BHT در سطوح مختلف قابل رقابت بودند. بنابراین میوه بلوط می‌تواند به‌عنوان منبعی سرشار از ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی در صنایع دارویی و غذایی مورد توجه قرار بگیرد.

واژه‌های کلیدی: میوه بلوط (*Quercus branti var* persica Lindl.)، ترکیب‌های فنولی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، روغن آفتاب‌گردان.

مقدمه

زمانی که مقدار گونه‌های اکسیژن فعال شامل رادیکال‌های هیدروژن پراکسید، سوپراکسید و هیدروکسیل در سلول از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی موجود بالاتر رود، تعادل قدرت احیاءکنندگی درون سلولی تغییر می‌یابد. این پدیده با آسیب به مولکول‌های زیستی موجود

Archive of SID
www.SID.ir

از قبیل پروتئین، چربی و اسیدهای نوکلئیک، کاهش قابلیت زیستی سلول و آغاز فرایندهای پیرشدن بافت‌ها مرتبط است. استرس‌های اکسیداتیو با بروز بسیاری از بیماریهای مزمن نظیر سرطان، بیماریهای قلبی عروقی، ایدز، آرتریت، سندروم داون و ناهماهنگی‌های حرکتی مرتبط می‌باشند. مطالعات اپیدمیولوژیکی حکایت از آن دارد که جذب آنتی‌اکسیدان از منابع غذایی رژیمی در پیشگیری و درمان بسیاری از بیماریها مرتبط است. بنابراین توجه رو به رشد به آنتی‌اکسیدان‌های موجود در گیاهان دارویی و رژیمی ممکن است به جلوگیری یا کاهش آسیب‌های اکسیداتیو بدون اعمال اثرهای جانبی مضر کمک نماید (Hamad *et al.*, 2010). ترکیب‌های فنولی گروه بزرگی از متابولیت‌های ثانویه گیاهی هستند. حدود ۸۰۰۰ ترکیب مختلف در این گروه قرار می‌گیرند. مهمترین عملکرد این ترکیب‌ها در ارتباط با اکسیداسیون، غیرفعال کردن رادیکال‌های آزاد و تشکیل کمپلکس با یون‌های فلزی می‌باشد. ترکیب‌های فنولی از طریق اهداء الکترون به رادیکال‌های آزاد واکنش‌های اکسیداسیون چربی را مهار می‌کنند (Manach *et al.*, 2004).

بلوط متعلق به خانواده Fagaceae و جنس *Quercus* می‌باشد. این جنس شامل ۵۰۰ گونه مختلف است که به‌صورت درخت و درختچه در مناطق مختلف نیمکره شمالی به‌ویژه اکوسیستم‌های معتدل می‌روید. در ایران بیشترین تعداد گونه‌های بلوط در رشته‌کوه‌های زاگرس و در جنگل‌های بلوط غرب دیده می‌شود. در مناطقی که به دلیل خشکسالی کشت غلات در آنها محدود است، میوه بلوط نقش مهمی در تأمین غذای مورد نیاز ساکنان این مناطق به عهده دارد (Ozcan, 2007). میوه بلوط همچنین از دیرباز کاربرد زیادی در طب سنتی داشته‌است و میوه‌ای گرم و خشک به‌شمار می‌آید. دم‌کرده این میوه به‌خصوص نوع برشته شده آن را می‌توان برای درمان بیماریهایی نظیر اسهال، درد معده، بواسیر، نرمی استخوان، کم‌خونی، سوختگی و نیز جهت تقویت عمومی بدن استفاده کرد. علاوه بر این، جهت درمان خون‌مردگی، اگزما، واریس و برخی از بیماریهای پوستی استفاده از دم‌کرده پوست درخت بلوط به‌صورت کمپرس پیشنهاد می‌شود (ابوتراب، ۱۳۸۷). میوه بلوط علاوه بر ترکیب‌های تغذیه‌ای حاوی مقادیر قابل‌توجهی از ترکیب‌های فعال بیولوژیکی می‌باشد که از آن جمله می‌توان به تانن، گالیک اسید، الاجیک اسید و مشتقات گالویل یا هگزا هیدروکسی دی‌فنوئیل اشاره کرد که تمامی این ترکیب‌ها دارای خواص آنتی‌اکسیدانی هستند (Rakic *et al.*, 2007). در زمینه اندازه‌گیری مقدار و نیز شناسایی نوع ترکیب‌های فنولی میوه بلوط به‌ویژه گونه‌های ایرانی، بررسی‌های اندکی انجام شده‌است و اکثر تحقیقات در این زمینه بیشتر به اندازه‌گیری و تعیین درصد تانن این میوه محدود شده است. مسعودی‌نژاد و رضازاده آذری (۱۳۸۲) میزان تانن ده گونه بلوط ایران را اندازه‌گیری کردند. گونه *Q. blengri* حاوی بیشترین میزان تانن (۹/۷٪) از بین گونه‌های مورد بررسی بود. این میزان در سایر گونه‌ها از ۳/۲٪ تا ۷/۵٪ متغیر بود.

آنتی‌اکسیدان‌ها به موادی گفته می‌شود که قادر به ایجاد تأخیر، کُندکردن و حتی توقف فرایندهای اکسیداسیون می‌باشند. این ترکیب می‌توانند به‌نحو مطلوبی از تغییر در رنگ و طعم مواد غذایی در نتیجه واکنش‌های اکسیداسیون جلوگیری کنند (Halliwell *et al.*, 1995). از مهمترین منابع آنتی‌اکسیدانی موجود در رژیم غذایی می‌توان به توکوفرول‌ها، گلوتاتیون‌ها، اسید آسکوربیک و نمک‌های آسکوربات، کاروتنوییدها و

Archive of SID

www.SID.ir

ترکیب‌های فنولی اشاره کرد (Pokorni, 2007). تأثیر آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی و طبیعی را می‌توان با اندازه‌گیری محصولات اولیه و ثانویه پراکسیداسیون چربی‌ها در مواد غذایی و سیستم‌های بیولوژیکی ارزیابی کرد. محققان زیادی اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی را در ثبات اکسیداتیو روغن‌های خوراکی ارزیابی نموده‌اند که از آن جمله می‌توان به کاربرد عصاره متانولی تفاله کنجد در روغن‌های سویا، آفتاب‌گردان و گلرنگ اشاره نمود. این عصاره اثر محافظت‌کنندگی خوبی را در تمامی روغن‌های مورد بررسی از خود نشان داد (Suja *et al.*, 2004). در کشور ما، جنگل‌های بلوط توزیع گسترده‌ای در نواحی غرب، جنوب‌غرب، شمال و شمال‌غرب دارند و میزان تولید سالیانه میوه بلوط در کشور هزاران تن می‌باشد. متأسفانه این میوه‌ها بجز استفاده 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 آنتی‌اکسیدانی عصاره فنولی میوه بلوط غرب در پایداری روغن آفتاب‌گردان در شرایط تسریع شده و مقایسه آن با آنتی‌اکسیدان‌های BHA و BHT می‌باشد.

مواد و روشها

مواد شیمیایی و روغن آفتاب‌گردان

کلیه مواد شیمیایی مورد استفاده در این بررسی از شرکت‌های مرک و سیگما با بالاترین درجه خلوص تهیه شدند. روغن آفتاب‌گردان تصفیه شده، رنگبری و بی‌بو شده از کارخانه پرتو دانه خزر واقع در شهرستان به‌شهر خریداری شد.

جمع‌آوری گیاه و تهیه عصاره

میوه‌های بلوط مورد استفاده در این تحقیق (*Q. branti* var persica) در آبان ماه ۱۳۸۷ از جنگل‌های بلوط منطقه بازفت استان چهارمحال و بختیاری جمع‌آوری گردید. پس از خشک کردن در دمای محیط و جدا کردن پوست‌های چوبی و داخلی، میوه‌ها توسط آسیاب چکشی (ایران خودساز، ایران) به‌صورت آرد (تا مش ۶۰) درآمدند. تهیه عصاره فنولی با روش خیساندن در سه حلال آب، متانول ۸۰٪ و اتانول ۷۰٪ (حجمی: حجمی) انجام شد. ۱۰۰ میلی‌لیتر حلال به ۱۰ گرم پودر افزوده و مخلوط بدست آمده به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط با همزن مغناطیسی هم‌زده شد. پس از این مرحله، بخش جامد به‌وسیله کاغذ صافی معمولی جدا گردید (Kowalski, 2009). عصاره اتانولی به‌وسیله تبخیرکننده چرخان در دمای ۴۰ °C تغلیظ و در نهایت هر دو عصاره توسط خشک‌کن انجمادی (FDB5503، کره) در دمای ۵۰ °C- به پودر تبدیل شدند و تا زمان استفاده در ظروف غیرقابل نفوذ به هوا در فریزر ۱۸ °C- قرار گرفتند. تمامی مواد مورد استفاده در این پژوهش با درجه خلوص بالا و از شرکت‌های مرک و سیگما تهیه شدند.

اندازه‌گیری مقدار کل ترکیب‌های فنولی

مقدار کل ترکیب‌های فنولی با روش فولین سیوکالته اندازه‌گیری شد (Slinkard & Singleton, 1977). جهت رسم منحنی استاندارد، از اسید تانیک استفاده شد. مقدار کل ترکیب‌های فنولی موجود در عصاره بر حسب معادل تانیک اسید و با استفاده از معادله بدست‌آمده از منحنی استاندارد محاسبه و نتایج بر

Archive of SID

www.SID.ir

حسب میلی‌گرم تانیک اسید در هر گرم عصاره پودر شده بیان شد.

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها در روغن آفتاب‌گردان

عصاره‌های آبی، متانولی و اتانولی در سه غلظت ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام و آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی BHA و BHT هر کدام در دو سطح مجاز ۱۰۰ و ۲۰۰ پی‌پی‌ام به روغن آفتاب‌گردان بدون آنتی‌اکسیدان اضافه شدند. عمل اختلاط عصاره‌ها با روغن توسط همزن مغناطیسی و به مدت ۳۰ دقیقه برای هر عصاره انجام شد. مقداری از روغن آفتاب‌گردان (بدون هیچ‌گونه افزودنی) نیز، به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. ظروف مورد استفاده در این بررسی، شفاف و با دهانه باز بودند که تا حجم ۸۰ میلی‌لیتر با روغن پُر شده و به گرمخانه‌ی ۷۰ °C منتقل شدند. دوره آزمایش ۱۲ روز بود و طی این مدت، میزان پیشرفت اکسیداسیون روغن در روزهای ۲، ٤، ٦، ۸، ۱۰ و ۱۲ با اندازه‌گیری عدد پراکسید و تیوباربیتوریک اسید تعیین گردید.

اندازه‌گیری عدد پراکسید

۵ گرم روغن در یک ارلن توزین و پس از افزودن ۳۰ میلی‌لیتر محلول اسید استیک- کلروفرم، خوب هم زده شد تا روغن در آن حل گردد. در مرحله‌ی بعدی ۰/۵ میلی‌لیتر یدید پتاسیم اشباع به آن اضافه و به مدت ۱ دقیقه در تاریکی قرار گرفت. ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر به محلول بالا اضافه و تا از بین رفتن رنگ زرد با تیوسولفات سدیم تیتر گردید. سپس با افزودن ۱ میلی‌لیتر چسب نشاسته، تیتراسیون تا از بین رفتن رنگ آبی محلول ادامه یافت. همراه با تیتراسیون نمونه‌ها، تیتراسیون نمونه شاهد نیز انجام شد و عدد پراکسید بر حسب میلی‌اکی‌والان پراکسید در کیلوگرم روغن، با رابطه زیر محاسبه گردید (AOAC, 1990).

معادله ۱

$$\text{عدد پراکسید} = \frac{(V_2 - V_1) \times N \times 1000}{m}$$

(میلی‌اکی‌والان چربی در هر گرم)

که در این رابطه V2، V1 به‌ترتیب عدد تیتراسیون نمونه و شاهد، N نرمالیته تیوسولفات سدیم و m وزن نمونه بر حسب گرم می‌باشد. برای تعیین درصد بازدارندگی تیمارهای مختلف بر جلوگیری از افزایش عدد پراکسید نیز از فرمول زیر استفاده شد.

معادله ۲

میزان بازدارندگی (٪) =

(عدد پراکسید شاهد/۱۰۰ × عدد پراکسید تیمار)-۱۰۰

عدد تیوباربیتوریک اسید

یک گرم روغن در ۱۰ میلی‌لیتر تتراکلرید کربن حل شد. پس از افزودن ۱۰ میلی‌لیتر مخلوط اسید استیک- تیوباربیتوریک اسید به آن، نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه، سانتریفوژ شدند. سپس فاز بالایی جدا شده و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب جوش قرار گرفت. پس از سرد کردن، میزان جذب در طول موج ۵۳۲ نانومتر اندازه‌گیری شد (PG instruments Ltd +T80، ساخت انگلیس) (Sidewell *et al.*, 1954). عدد تیوباربیتوریک بر حسب میلی‌گرم مالون آلدئید در کیلوگرم روغن طبق رابطه زیر محاسبه گردید.

معادله ۳

$$\text{عدد تیوباربیتوریک اسید (میلی‌گرم مالون آلدئید در کیلوگرم روغن)} = \frac{e}{d.a}$$

Archive of SID

که در این رابطه e میزان جذب، d ضخامت سل نوری بر حسب سانتی‌متر و a وزن روغن بر حسب گرم می‌باشد.

آنالیز آماری

در روشهای اندازه‌گیری ترکیب‌های فنولی کل مقایسه‌ی میانگین‌های بدست‌آمده از سه تکرار با آزمون دانکن (p <۰/۰۵) بر پایه طرح کامل تصادفی انجام شد. همچنین مقایسه میانگین اعداد پراکسید و تیوباربیتوریک اسید مربوط به تیمارهای مختلف با طرح اندازه‌گیریهای تکرار شده در زمان در سطح احتمال ۵٪ صورت پذیرفت.

نتایج

مقدار کل ترکیب‌های فنولی

جدول ۱ مقایسه میانگین مقدار ترکیب‌های فنولی عصاره‌های حاصل از حلال‌های مختلف را نشان می‌دهد. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که نوع حلال مورداستفاده جهت استخراج تأثیر معنی‌داری (p < ۰/۰۵) بر مقدار ترکیب‌های فنولی عصاره‌ها دارد. در *Quercus branti*، بیشترین مقدار ترکیب‌های فنولی به‌ترتیب در عصاره‌های متانولی (۸۰٪)، اتانولی (۷۰٪) و آبی حاصل گردید و عصاره‌های حاصل از این نظر اختلاف معنی‌داری داشتند.

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها در به تأخیر انداختن اکسیداسیون روغن آفتابگردان

در این تحقیق برای رسم بهتر نمودارها و جدولها و نیز اختصار در بیان نتایج از یک سری حروف و علایم اختصاری استفاده شده است که در این قسمت تعاریف آنها آورده شده‌است:

EB – ۲۵۰، EB – ۵۰۰ و EB – ۱۰۰۰: به‌ترتیب روغن آفتاب‌گردان حاوی ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام عصاره اتانولی

MB – ۲۵۰، MB – ۵۰۰ و MB – ۱۰۰۰: به‌ترتیب روغن آفتاب‌گردان حاوی ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام عصاره متانولی

WB – ۲۵۰، WB – ۵۰۰ و MB – ۱۰۰۰: به‌ترتیب روغن آفتاب‌گردان حاوی ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام عصاره آبی

BHA – ۱۰۰ و BHA – ۲۰۰: به‌ترتیب روغن آفتاب‌گردان حاوی ۱۰۰ و ۲۰۰ پی‌پی‌ام آنتی‌اکسیدان سنتری BHA

BHT – ۱۰۰ و BHT – ۲۰۰: به‌ترتیب روغن آفتاب‌گردان حاوی ۱۰۰ و ۲۰۰ پی‌پی‌ام آنتی‌اکسیدان سنتری BHT

TBHQ – ۲۰۰: روغن آفتاب‌گردان حاوی ۲۰۰ پی‌پی‌ام آنتی‌اکسیدان سنتزی TBHQ

عدد پراکسید

نتایج آنالیز واریانس نشان داد که اثر تیمار، زمان و اثر متقابل تیمار در زمان بر میزان عدد پراکسید نمونه‌ها در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار است. تغییرات عدد پراکسید نمونه‌های روغن آفتاب گردان حاوی عصاره‌های متانولی، اتانولی و آبی در روزهای دوم، چهارم، ششم، هشتم، دهم و دوازدهم به‌ترتیب در جدول ۲ و شکل‌های ۱، ۲ و ۳ نشان داده شده‌است. لازم به تذکر این مطلب است که میزان عدد پراکسید نمونه‌های روغن آفتاب‌گردان در روز صفر ۱/۲۶ میلی‌اکی‌والان پراکسید در هر کیلوگرم روغن بود. در این بررسی عدد پراکسید تمامی نمونه‌ها با افزایش مدت زمان نگهداری در دمای ۷۰ $^{\circ}$C به‌تدریج افزایش

Archive of SID

www.SID.ir

یافت. افزایش عدد پراکسید به دلیل تشکیل محصولات اولیه اکسیداسیون یعنی هیدروپراکسیدها می‌باشد.

در روزهای ابتدایی آزمایش سرعت تشکیل این محصولات پایین بود، اما از روز چهارم به بعد با سرعت بیشتری ادامه یافت. میزان عدد پراکسید نمونه شاهد از ۱/۲۵ پس از ۲، ٤، ٦ و ۸ روز نگهداری به‌ترتیب به ۲٦/۲۳، ۵۵/۲۵، ۱۰۰/٦۱ و ۲۳۲/۷٤ میلی‌اکی‌والان در کیلوگرم روغن رسید، اما با افزایش زمان به ۱۰ و ۱۲ روز عدد پراکسید نمونه شاهد به‌ترتیب به ۲۹۲/۹۸ و ۳۲۸/۸۸ میلی‌اکی‌والان افزایش یافت (شکل‌های ۱، ۲ و ۳). در تمامی روزهای آزمایش روغن آفتاب‌گردان حاوی آنتی‌اکسیدان سنتزی TBHQ کمترین میزان عدد پراکسید را به خود اختصاص داد. همچنین عدد پراکسید تیمار ۱۰۰۰ – MB کمتر از سایر نمونه‌های حاوی عصاره و سطوح مختلف آنتی‌اکسیدان سنتزی BHA بود. در روزهای ۲، ٤، ٦، ۸ و ۱۰ اختلاف معنی‌داری (p <۰/۰۵) بین این تیمار و ۲۰۰ – BHT مشاهده نشد، اما در روز پایانی تیمار اخیر عملکرد بهتری در جلوگیری از اکسیداسیون روغن از خود نشان داد (شکل ۱). به‌طوری که عصاره‌ها در غلظت‌های مختلف با BHA در سطوح مختلف در روزهای آزمایش قابل رقابت بودند (شکل ۲ و ۳).

عدد تیوباربیتوریک

عدد تیوباربیتوریک اسید روغن آفتاب‌گردان در روز آغازین آزمایش ۰/۰۳۵ میلی‌گرم مالون آلدئید در کیلوگرم روغن بود. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که اثر تیمار، زمان و اثر متقابل تیمار در زمان بر میزان عدد تیوباربیتوریک اسید نمونه‌های روغن آفتاب‌گردان معنی‌دار است. مقدار مالون آلدئید موجود در نمونه‌های روغن از روز آغاز گرمخانه‌گذاری شروع به افزایش کرد، اما این افزایش به‌ویژه در نمونه‌های حاوی آنتی‌اکسیدان تا روز هشتم آزمایش با سرعت بسیار کمی انجام شد. میزان عدد تیوباربیتوریک اسید در نمونه شاهد در روز هشتم آزمایش از ۰/۲۲۲ به‌ترتیب به ۰/۳٦۷ و ۰/۵۸۰ میلی‌گرم در کیلوگرم در روز دهم و دوازدهم افزایش یافت. البته در نمونه‌های حاوی آنتی‌اکسیدان سرعت تشکیل محصولات ثانویه‌ی اکسیداسیون، کمتر از نمونه شاهد بود.

در روز دهم آزمایش اختلاف معنی‌داری بین میانگین عدد تیوباربیتوریک اسید تیمارهای مختلف مشاهده گردید (شکل‌های ٤، ۵ و ٦). به‌نحوی که از بین عصاره‌های میوه بلوط، بهترین عملکرد مربوط به عصاره‌های متانولی در غلظت ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام بود که عصاره‌ی متانولی از این نظر اختلاف معنی‌داری با ۲۰۰ – BHT نداشت (شکل ۵). توانایی عصاره‌های آبی برای مهار اکسیداسیون روغن و جلوگیری از تشکیل محصولات ثانویه در غلظت‌های ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام مشابه تیمار ۱۰۰ – BHT بود و اختلاف معنی‌داری بین این دو تیمار مشاهده نشد (شکل ٦). در روز دوازدهم نیز تفاوت معنی‌داری (p <۰/۰۵) بین تیمارهای مختلف از این نظر مشاهده گردید. مقدار مالون آلدئید در نمونه‌ی شاهد در این روز تقریباً ۱/۵ برابر روز دهم آزمایش بود، در حالی‌که مقدار عدد پراکسید نمونه‌ی شاهد در این روز نسبت به روز دهم ۱/۱ برابر بیشتر شد. این نتایج نشان می‌دهد که در روزهای پایانی آزمایش تشکیل محصولات ثانویه اکسیداسیون با سرعت بیشتری انجام می‌شود و مقدار زیادی از پراکسیدهای تشکیل شده در مراحل اولیه طی روزهای پایانی آزمایش تجزیه و به مالون آلدئید تبدیل شده‌اند. پس از نمونه شاهد بیشترین مقدار عدد تیوباربیتوریک متعلق به تیمارهای

Archive of SID

www.SID.ir

۱۰۰ – BHA و ۲۵۰ – WB بود که از این نظر اختلاف معنی‌داری (p <۰/۰۵) با یکدیگر نداشتند. غلظت ۲۵۰ پی‌پی‌ام عصاره‌های مختلف در روز دوازدهم فعالیت آنتی‌اکسیدانی چندانی از خود نشان ندادند و عملکرد آنها در جلوگیری از تشکیل محصولات ثانویه‌ی اکسیداسیون مابین ۱۰۰ – BHA و ۲۰۰ – BHA بود. کمترین مقدار عدد تیوباربیتوریک اسید در روزهای مختلف آزمایش مربوط به ۲۰۰ – TBHQ بود.

جدول ۱- مقایسه میانگین مقدار کل ترکیب‌های فنولی (میلی‌گرم معادل تانیک اسید در گرم عصاره) عصاره‌های فنولی حاصل از حلال‌های مختلف

گونه	حلال		
	متانول (۸۰٪)	اتانول (۷۰٪)	آب
Quercus branti	۱۸۳/۹۶ ± ۰/۷۷ a	۱۳۸/۴۹ ± ۰/۴۴ b	۷۹/۲۸ ± ۰/۸۸ c

حروف غیرمشابه در هر سطر بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ است.

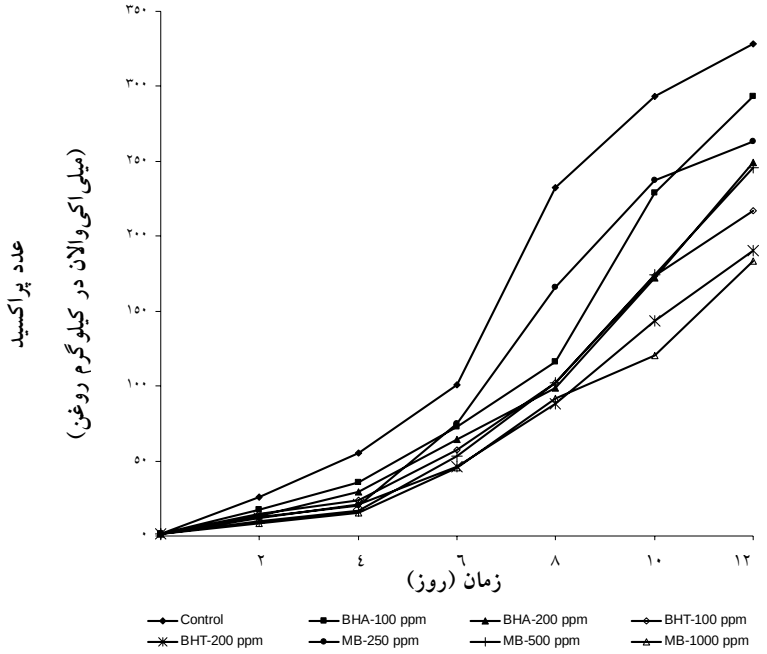
جدول ۲- میانگین درصد بازدارندگی تیمارهای مختلف بر جلوگیری از افزایش عدد پراکسید روغن آفتاب‌گردان طی ۱۲ روز گرمخانه‌گذاری در دمای ۷۰ °C

تیمار	روز					
	۲	۴	۶	۸	۱۰	۱۲
MB - 250	۴۶/۱۶	۶۲/۶۷	۲۵/۶۵	۲۸/۵۷	۱۹/۰۷	۱۹/۹۷
MB - 500	۵۹/۳۷	۶۹/۱۷	۴۶/۹۹	۵۶/۲۳	۴۰/۴۳	۲۵/۲۲
MB - 1000	۶۴/۳۳	۷۱/۵۸	۵۴/۸۱	۶۰/۵۳	۵۲/۰۲	۴۴/۲۹
EB - 250	۴۲/۱۲	۴۱/۰۳	۰/۲۹	۳۳/۰۶	۲۵/۶۳	۱۸/۱
EB - 500	۴۹/۷۵	۴۶/۳۱	۵/۱۶	۴۸/۶	۳۵	۲۴/۳۴
EB - 1000	۵۶/۹۵	۵۴/۲۴	۳۱/۳	۵۸/۸۳	۵۲/۰۸	۳۱/۹۵
WB - 250	۳۶/۵۴	۳۷/۸۲	۰/۵۵	۲۰/۱۶	۲۵/۱۲	۱۰/۴۵
WB - 500	۴۴/۳۳	۶۹/۳۹	۲۲/۳۲	۴۴/۸	۳۷/۷۵	۱۹/۲۲
WB - 1000	۵۷/۵۴	۵۵/۶۵	۱۸/۵۴	۵۳/۷۱	۳۰/۵۴	۲۸/۵۳
BHA - 100	۲۷/۸۳	۳۵/۳۴	۲۷/۸۶	۵۰/۱۵	۲۱/۹	۱۰/۹۰
BHA - 200	۴۵/۱۶	۴۶/۷۱	۳۶/۰۵	۵۷/۶۰	۴۱/۳۳	۲۴/۲۸
BHT - 100	۳۸/۳۷	۵۶/۳۹	۴۲/۶۷	۵۶/۱۳	۴۰/۷۷	۳۳/۹۷
BHT - 200	۵۰/۷۵	۶۱/۷۹	۵۴/۰۹	۶۲/۱۸	۵۱/۱	۴۲/۰۵
TBHQ - 200	۸۹/۷	۹۴/۲۴	۹۱/۲۷	۹۳/۱۳	۹۲/۱۵	۹۱/۰۹

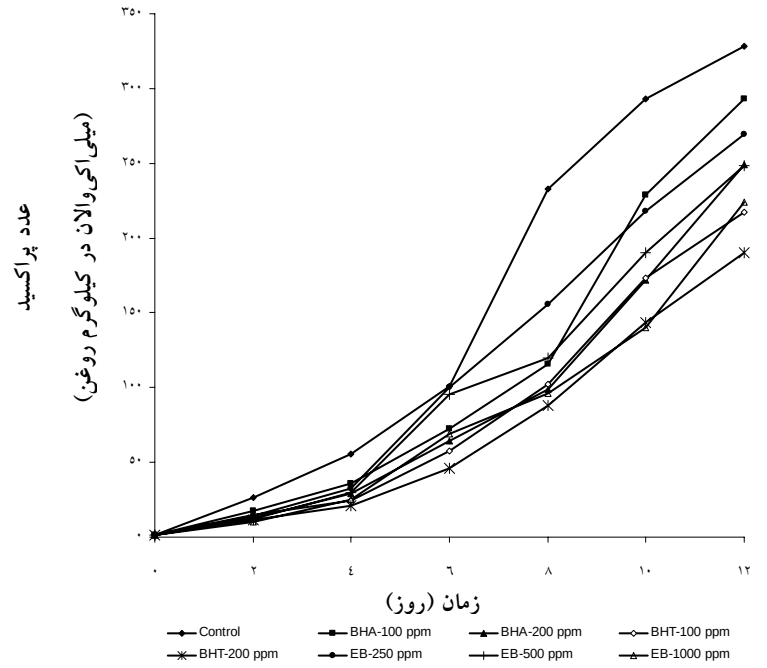
MB، EB و WB: به‌ترتیب بیانگر عصاره‌های متانولی، اتانولی و آبی واریته برانتی و ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ بیانگر غلظت‌های مختلف این عصاره‌ها در روغن آفتاب‌گردان بر حسب ppm و BHA، BHT و TBHQ نیز بیانگر آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی مورد استفاده می‌باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

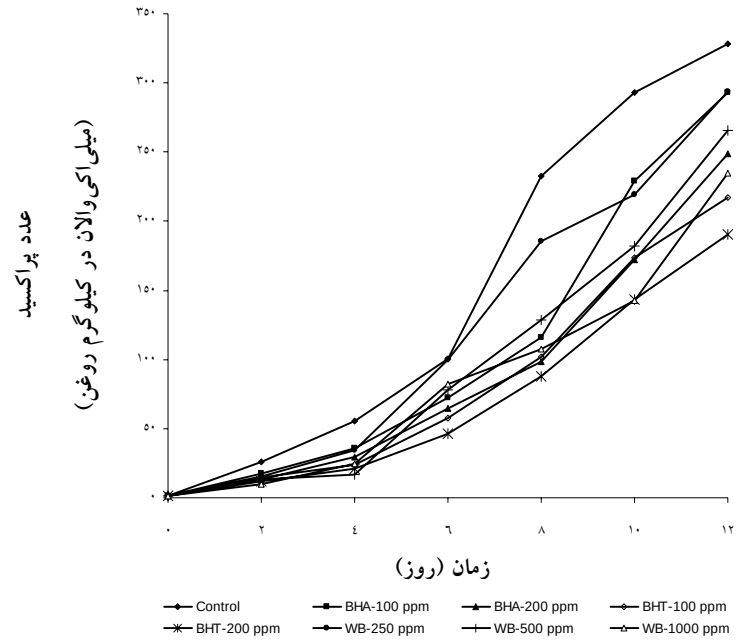


شکل ۱- تغییرات عدد پراکسید نمونه‌های روغن آفتاب‌گردان حاوی غلظت‌های مختلف عصاره متانولی میوه بلوط و آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی طی ۱۲ روز در دمای ۷۰°C

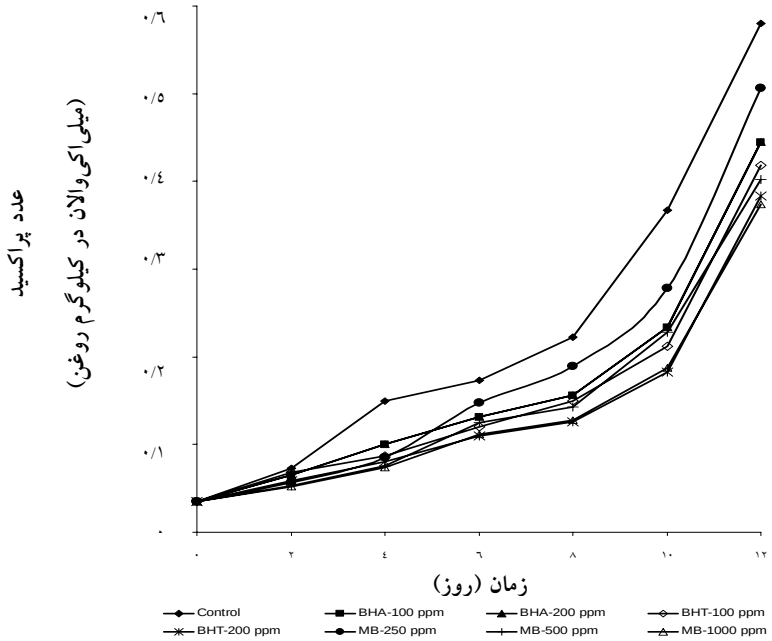


شکل ۲- تغییرات عدد پراکسید نمونه‌های روغن آفتاب‌گردان حاوی غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی میوه بلوط و آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی طی ۱۲ روز در دمای ۷۰°C

www.SID.ir

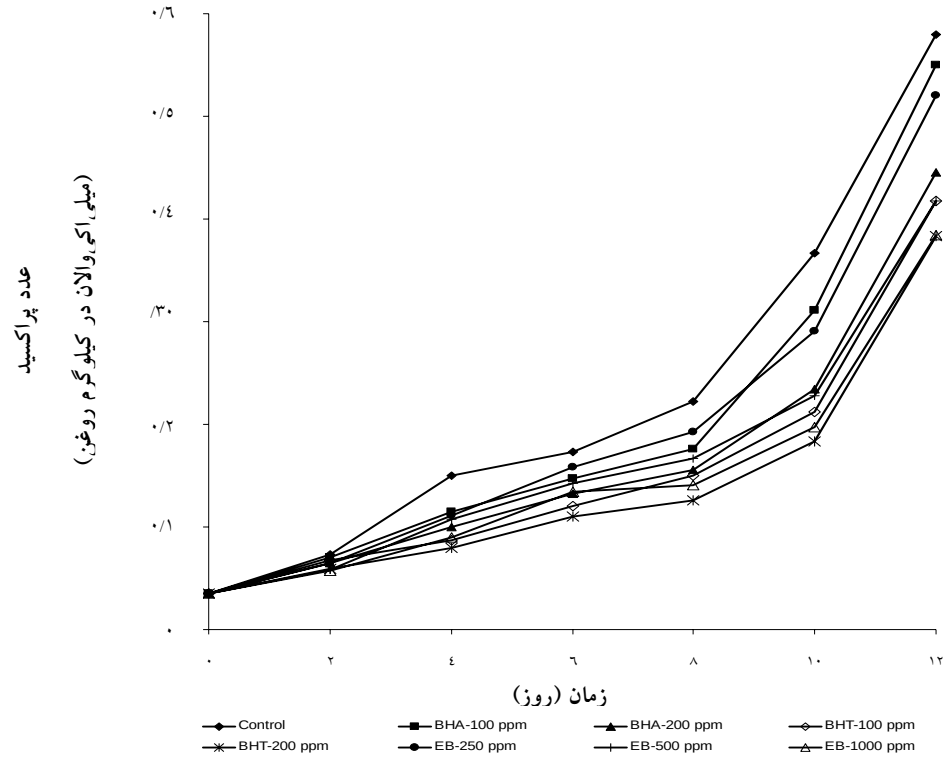


شکل ۳- تغییرات عدد پراکسید نمونه‌های روغن آفتاب‌گردان حاوی غلظت‌های مختلف عصاره آبی میوه بلوط و آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی طی ۱۲ روز در دمای ۷۰ °C

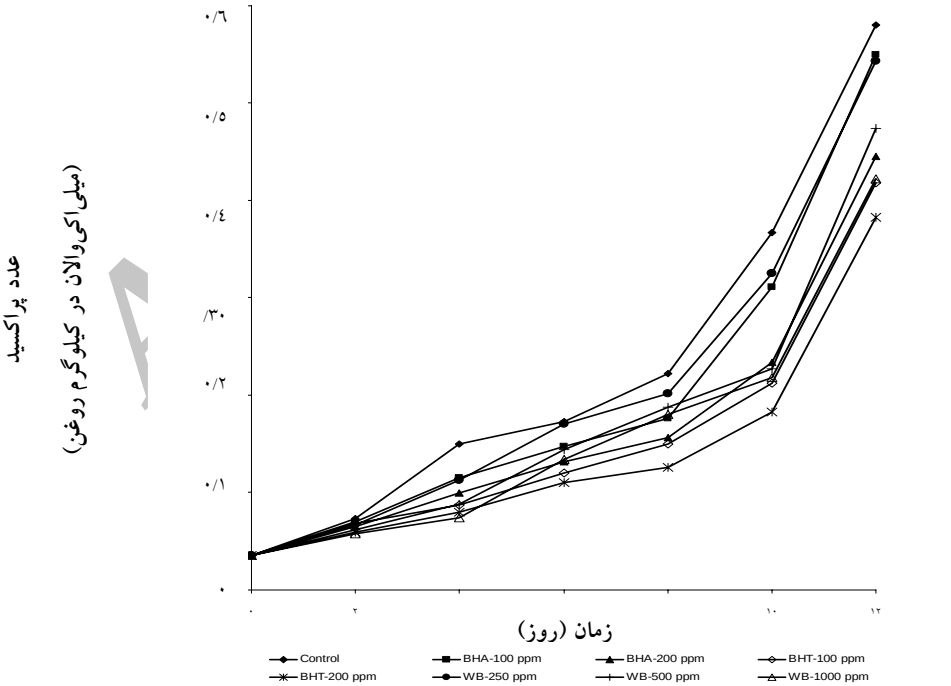


شکل ٤- تغییرات عدد تیوباربیتوریک اسید نمونه‌های روغن آفتاب‌گردان حاوی غلظت‌های مختلف عصاره متانولی میوه بلوط و آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی طی ۱۲ روز در دمای ۷۰ °C

www.SID.ir



شکل ۵- تغییرات عدد تیوباربیتوریک اسید نمونه‌های روغن آفتاب‌گردان حاوی غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی میوه بلوط و آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی طی ۱۲ روز در دمای ۷۰°C



شکل ٦- تغییرات عدد تیوباربیتوریک اسید نمونه‌های روغن آفتاب‌گردان حاوی غلظت‌های مختلف عصاره آبی میوه بلوط و آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی طی ۱۲ روز در دمای ۷۰°C

www.SID.ir

بحث

درجه قطبیت حلال‌های مختلف میزان استخراج ترکیب‌های پلی‌فنولی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. در استخراج ترکیب‌های فنولی، عصاره‌های حاصل از حلال‌های مختلف از نظر مقدار ترکیب‌های فنولی کل، نوع ترکیب‌های استخراج شده و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی متفاوتند. حلالیت ترکیب‌های فنولی با توجه به نوع حلال، درجه پلیمریزاسیون آنها و برهم‌کنش آنها با سایر ترکیب‌های موجود در بافت‌های گیاهی متفاوت است (Trabelsi *et al.*, 2010). حلال‌های اتانول و متانول به‌صورت مخلوط با آب (۸۰-۴۰٪) توانایی بیشتری نسبت به حالت خالص در استخراج ترکیب‌های فنولی از بافت‌های گیاهی دارند (Suzuki *et al.*, 2002). استفاده از آب به‌عنوان حلال استخراج، یک محیط کاملاً قطبی ایجاد می‌کند که در آن برخی از ترکیب‌های فنولی با درجه قطبیت پایین به میزان کمتری استخراج می‌شوند. افزودن آب به حلال‌های آلی با تشکیل یک محیط نسبتاً قطبی همراه بوده، بنابراین از استخراج مقادیر و انواع بیشتری از ترکیب‌های فنولی در این شرایط اطمینان حاصل می‌گردد. علاوه بر این، عصاره آبی حاوی مقادیر زیادی از ناخالصی‌هایی نظیر اسیدهای آلی، پروتئین‌ها و قندهای محلول می‌باشد که می‌توانند در تشخیص و تعیین مقدار ترکیب‌های فنولی و نیز فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها تداخل ایجاد نمایند (Chirinos *et al.*, 2007). در بررسی انجام شده توسط Rakic و همکاران (۲۰۰۷) مقدار ترکیب‌های فنولی کل و تانن عصاره متانولی میوه بلوط گونه *Quercus Robur* به‌ترتیب ۰/۲۲۳ و ۰/۲۰۴ و برای گونه *Quercus suber* ۰/۲۲۹ و ۰/۲۱۸ میلی‌گرم معادل اسید گالیک در میلی‌گرم عصاره بود. مقادیر گزارش شده برای ترکیب‌های فنولی این گونه‌ها از مقادیر ترکیب‌های فنولی کل عصاره متانولی *Q. branti* بیشتر بود. البته باستثنای تحقیق یاد شده، هیچ گزارش دیگری در ارتباط با استخراج ترکیب‌های فنولی از میوه‌ی بلوط با حلال‌های مختلف در منابع علمی یافت نشد.

در روزهای ابتدایی آزمایش سرعت تشکیل محصولات اولیه اکسیداسیون بالا بود، اما در روزهای پایانی آزمایش سرعت تشکیل این محصولات کاهش یافت. احتمالاً بخشی از هیدروپراکسیدهای تشکیل شده در مرحله‌ی انتشار شروع به تجزیه شدن نموده و به محصولات ثانویه‌ی اکسیداسیون نظیر آلدئیدها و کتون‌ها تبدیل می‌شوند. بنابراین افزایش چشمگیر عدد تیوباربیتوریک اسید در روزهای پایانی آزمایش، کاهش مشاهده شده در سرعت تشکیل هیدروپراکسیدها را تصدیق می‌نماید. مقدار مالون آلدئید موجود در نمونه‌های روغن از روز آغاز گرمخانه‌گذاری شروع به افزایش کرد، اما این افزایش تا روز هشتم آزمایش با سرعت بسیار کمی انجام شد. در نمونه‌های حاوی آنتی‌اکسیدان سرعت تشکیل محصولات ثانویه‌ی اکسیداسیون کمتر از نمونه‌ی شاهد بود و این به دلیل اثر آنتی‌اکسیدان‌ها در جلوگیری از تجزیه‌ی هیدروپراکسیدها می‌باشد. هیدروپراکسیدها در دماهای بالا شروع به تجزیه شدن نموده و رادیکال‌های آزاد بیشتری تولید می‌کنند و به واکنش‌های زنجیری ادامه می‌دهند. اما در برخی موارد نیز محصولات غیررادیکالی پایدار نظیر آلدئید، کتون، الکل و اسید از تجزیه این ترکیب‌ها حاصل می‌گردد. آنتی‌اکسیدان‌ها در این مرحله از یک طرف با اهدای الکترون به رادیکال‌های آزاد باعث شکسته‌شدن واکنش‌های زنجیری اکسیداسیون می‌شوند و از طرف دیگر از طریق واکنش با رادیکال‌های آلکوکسیل

Archive of SID

www.SID.ir

(RO°) از تجزیه‌ی پراکسیدها به محصولات پایدار و مضر جلوگیری می‌نمایند (Frankel, 1996). همان‌طور که مشاهده شد، توانایی آنتی‌اکسیدان‌ها در مهار اکسیداسیون وابسته به غلظت بود. در کل افزایش غلظت ترکیب‌های فنولی به‌طور مستقیم میزان توانایی عصاره‌های مختلف را در مهار رادیکال‌های آزاد افزایش می‌دهد. در غلظت‌های بالاتر ترکیب‌های فنولی به دلیل افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل موجود در محیط واکنش، احتمال اهداء هیدروژن به رادیکال‌های آزاد و بدنبال آن قدرت مهارکنندگی عصاره افزایش می‌یابد. قدرت مهارکنندگی عصاره‌های مختلف به میزان زیادی به تعداد و موقعیت گروه‌های هیدروکسیل و وزن مولکولی ترکیب‌های فنولی بستگی دارد. در ترکیب‌های فنولی با وزن مولکولی پایین‌تر گروه‌های هیدروکسیل راحت‌تر در دسترس قرار می‌گیرند (Sanchez-Moreno *et al.*, 1999).

اگرچه در روزهای ابتدایی اختلاف بین غلظت‌های مختلف هر عصاره چندان محسوس نبود، اما با گذشت زمان نمونه‌های روغن حاوی مقادیر بیشتری از عصاره یا آنتی‌اکسیدان سنتزی ثبات اکسیداتیو بیشتری نشان دادند. افزایش قدرت آنتی‌اکسیدانی ترکیب‌های فنولی در نتیجه‌ی افزایش غلظت را می‌توان به افزایش تعداد جایگاه‌های فعال این ترکیب‌ها برای واکنش با رادیکال‌های آزاد نسبت داد. علاوه بر این، تفاوت‌های مشاهده شده بین قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی در این تحقیق را می‌توان به تفاوت در مقادیر ترکیب‌های فنولی آنها نسبت داد.

Rakic و همکاران (۲۰۰۷) تأثیر عصاره آبی میوه بلوط گونه *Quercus Robur* را در به تأخیر انداختن اکسیداسیون چربی خوک طی ۱۰ روز در دمای ۶۰°C مورد بررسی قرار دادند. غلظت‌های مختلف (۰/۰۲ و ۰/۰٤) این عصاره توانستند تشکیل مالون آلدئید را نسبت به نمونه شاهد به تأخیر بیندازند، اما هیچ‌کدام از آنها با آنتی‌اکسیدان سنتزی BHA در غلظت ۰/۰۲٪ قابل رقابت نبودند. در زمینه‌ی کاربرد عصاره‌های میوه بلوط در روغن‌های گیاهی هیچ گزارشی در منابع علمی یافت نشد، اما محققان زیادی تأثیر افزودن عصاره‌های آبی و الکلی گیاهان مختلف را در به تأخیر انداختن اکسیداسیون روغن‌های گیاهی مورد بررسی قرار دادند. تأثیر عصاره متانولی سیر در ۳ سطح غلظت (۲۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام) و آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی BHA و BHT (۲۰۰ پی‌پی‌ام) در ثبات اکسیداتیو روغن آفتاب‌گردان در دمای ٦٥°C مورد بررسی قرار گرفت. درجه تأثیر عصاره‌ها و آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی در روشهای مختلف بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی به‌صورت زیر گزارش شد (Iqbal & Bhanger, 2007).

غلظت ۱۰۰۰ > BHT > BHA > غلظت ۵۰۰ > غلظت ۲۵۰ پی‌پی‌ام

بنابراین همان‌گونه که مشاهده می‌شود، نتایج این بررسی مشابه با تحقیق فوق می‌باشد و نشان داد که ثبات اکسیداتیو روغن‌های خوراکی در حضور مقادیر بیشتری از عصاره‌های گیاهی دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش می‌یابد.

نتایج بدست آمده در این بررسی نشان داد که میوه بلوط به واسطه‌ی داشتن مقادیر زیادی از ترکیب‌های فنولی دارای پتانسیل آنتی‌اکسیدانی بالایی است. بنابراین با توجه به غنی‌بودن پوشش گیاهی جنگل‌های غرب و شمال کشور از درخت بلوط، تولید سالانه هزاران تن از این میوه در این مناطق و با در نظر گرفتن اثرهای

Archive of SID

www.SID.ir

نامطلوب آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی بر سلامت انسان، می‌توان تحقیقات در زمینه استفاده از این میوه را به‌عنوان یک منبع آنتی‌اکسیدانی جدید در صنایع غذایی و دارویی مورد توجه قرار داد.

منابع مورد استفاده

- ابوتراب، ن.، ۱۳۸۷. بررسی خواص و ترکیب آرد بلوط و امکان بهبود کیفیت نان حاصل از آن. پایان‌نامه کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان.
- مسعودی‌نژاد، م.ر. و رضازاده آذری، م.، ۱۳۸۲. مقایسه چهار روش استخراج تانن از میوه‌های گونه‌های مختلف بلوط ایران. مجله پژوهشی حکیم، ٦(۱): ۹۱-۸۱.
- AOAC, 1990. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists, 15th ed., Washington, USA.
- 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) tubers. Separation and Purification Technology, 55(2): 217-225.
- Frankel, E.N., 1996. Antioxidant in lipid food and their impact on food quality. Food Chemistry, 57: 51-55.
- Halliwell, B., Aeschbach, R., Loliger, J. and Arouma, O.I., 1995. The characterization of antioxidants. Food Chemistry and Toxicology, 33(7): 601-617.
- Hamad, I., Erol-Dayi, O., Pekmez, M., Onay-Ucar, E. and Arda, N., 2010. Antioxidant and cytotoxic activities of *Aphanes arvensis* extracts. Plant Food for Human Nutrition, 65: 44-49.
- Iqbal, S. and Bhanger, M.I., 2007. Stabilization of sunflower oil by garlic extract during accelerated storage. Food Chemistry, 100: 246-254.
- 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(4): 820-830.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C. and Jimenez, L., 2004. Polyphenols: Food sources and bioavailability. American Journal of Clinical Nutrition, 79: 727-747.
- Ozcan, T., 2007. Characterization of Turkish *Quercus* L. Taxa Based on Fatty Acid compositions of the acorns. Journal of the American Oil Chemists' Society, 84(7): 653-662.
- Pokorny, J., 2007. Are natural antioxidants better and safer than synthetic antioxidant?. European Journal of Lipid Science and Technology, 109(6): 629-642.
- Rakic, S., Petrovic, S., Kukic, J., Jadranin, M., Tesevic, V., Povrenovic, D. and Siler-Marinkovic, S., 2007. Influence of thermal treatment on phenolic compounds and antioxidant properties of oak acorns from Serbia. Food Chemistry, 104(2): 830-834.
- Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J.A. 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.
- Sidewell, G.G., Salwin, H., Benca, M. and Mitchel, J.H., 1954. The use of thiobarbituric acid as a measure of fat oxidation. Journal of the American Oil Chemists' Society, 31(12): 603-606.
- Slinkard, K. and Singleton, V.L., 1977. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. American Journal of Enology and Viticulture, 28: 49-55.
- Suja, K.P., Abraham, J.T., Thamizh, S.N., Jayalekshmy, A. and Arumughan, C., 2004. Antioxidant efficacy of sesame cake extract in vegetable oil protection. Food Chemistry, 84(3): 393-400.
- 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. Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology, 49: 507-511.
- Trabelsi, N., Megdiche, W., Ksouri, R., Falleh, H., Oueslati, S., Soumaya, B., Hajlaoui, H. and Abdelly, C., 2010. Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. LWT-Food Science and Technology, 43(4): 632-639.

Archive of SID

www.SID.ir

Effects of phenolic compounds extraction from acorn fruit´s (*Quercus branti* var persica Lindl.) with different solvents on antioxidant activity in oxidative stability of sunflower oil

M. Ghaderi Ghahfarokhi[1*], M. Alami[2], A.R. Sadeghi Mahoonak[2], M.H. Azizi[3] and M. Ghorbani[2]

1*- Corresponding author, Department of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran, Email: mghaderi_gh@yahoo.com
2- Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
3- Department of Food Science and Technology, College of Agricultural, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Received: September 2010 Revised: January 2011 Accepted: February 2011

Abstract

The species of oak, the *Quercus* genus, is classified into *Fagaceae* family. Acorns (*Quercus branti* var persica Lindl.) have been traditionally used for treatment of many diseases such as diarrhea, collywobbles, hemorrhoid, rickets, anemia, eczema and varix. The objective of this research was extraction of phenolic compounds with various solvents and determination of antioxidant activity of the extracts in oxidative stability of sunflower oil. Phenolic compounds were extracted with methanol (80%), ethanol (70%) and water and total phenolic content was measured by Folin-Ciocalteu method. Extracts of acorns at three different concentrations (250, 500 and 1000 ppm), BHA and BHT at two concentrations of 100 and 200 ppm and TBHQ at 200 ppm were added to the sunflower oil and all samples were kept at 70°c for 12 days. Protective effects of the extracts in stabilizing sunflower oil were tested by measuring peroxide and thiobarbituric acid values at definite time intervals. Total phenolic content of water, ethanolic and methanolic extracts were 79.38, 138.49 and 183.96 (mg tannic acid equivalent/gr dry extract), respectively. During the experimental period, the peroxide and thiobarbitoric acid values of the control samples were raised from 26.23 to 328.88 (meq peroxide/ kg oil) and 0.073 to 0.58 (mg malon aldehyde/kg oil) respectively. TBHQ showed the highest oxidative stability at all days of the experiment. Methanolic extracts (at 500 and 1000ppm concentration) was the best among other extracts and stronger than BHT. Also, other extracts at various concentrations were comparable with BHA and BHT at different levels.

Key words: Acorn fruit (*Quercus branti* var persica Lindl.), phenolic compound, antioxidant activity, sunflower oil.

Archive of SID

www.SID.ir