Archive of SID

اثر روش های استخراج بر خصوصیات ضداکسایشی گیاه اناریجه (*pimpinella affinis*)

الهام شکوه صارمی[1]، محمد باقر حبیبی نجفی [2*]، محمد حسین حدادخداپرست [3]، معصومه بحرینی[4]

١- دانشجوی دکتری، استاد، استاد گروه علوم و صنایع غذایی و استادیار گروه زیست شناسی دانشگاه فردوسی مشهد
٢- استاد گروه صنایع غذایی دانشگاه فردوسی مشهد
٣- استاد گروه صنایع غذایی دانشگاه فردوسی مشهد
٤- استادیار گروه زیست شناسی دانشگاه فردوسی مشهد
(تاریخ دریافت: ٩٥/٠٤/٢٧ تاریخ پذیرش: ٩٥/٠٩/٠٣)

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی اثرات روش‌های مختلف استخراج بر فعالیت ضداکسایشی گیاه اناریجه (*pimpinella affinis*) بود. عصاره گیاه اناریجه با استفاده از روش‌های ماسراسیون، اولتراسوند و استفاده از سیال فوق بحرانی استخراج شد. بازده استخراج و میزان ترکیبات فنولی عصاره‌ها اندازه گیری شد و ارزیابی فعالیت ضد اکسایشی عصاره در چهار سطح غلظتی (٥٠٠، ١٠٠٠، ١٥٠٠ و ٢٠٠٠ ppm) با استفاده از آزمون مهار رادیکال آزاد DPPH و بیرنگ شدن بتاکاروتن:لینولئیک اسید انجام شد. فراکسیون ترکیبات فنولی با استفاده از دستگاه LC-MS تعیین شد. مقادیر فنول کل عصاره‌ها بین ١٨٣٦/٦٩- ١٥٠٢/٢٥ (mg GA/١٠٠g E) بود. نتایج نشان داد روش استخراج با سیال فوق بحرانی و استخراج با اولتراسوند به ترتیب بالاترین بازده استخراج و ترکیبات فنولی را داشتند. عصاره حاصل از اولتراسوند بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی را در روش مهار رادیکال آزاد DPPH داشت. بیشترین ترکیب سازنده عصاره (١٣/٥٤٪)، کلروژنیک اسید بود. نتایج این تحقیق پیشنهاد می کند عصاره اناریجه به دلیل دارا بودن ترکیبات فنولی، دارای خاصیت ضد اکسایشی بوده و میتواند جایگزین مناسبی برای نگهدارنده های سنتزی باشد.

کلید واژگان: اناریجه، روش های استخراج، آنتی اکسیدان

*مسئول مکاتبات: habibi@um.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

۱- مقدمه

رادیکال‌های آزاد که با عنوان مولکول‌های دارای الکترون جفت نشده در مدار خارجی تعریف شده‌اند، مولکول‌های ناپایدار و بسیار فعال و عامل اصلی بیماری‌های مزمن مانند پیری، تصلب شراین، بیماری‌های قلبی، آماس، دیابت و سرطان هستند. مصرف آنتی اکسیدان‌ها برای جلوگیری از اثرات مضر رادیکال‌های آزاد در سامانه‌های غذایی و بیولوژیکی توصیه شده است. به دلیل مشکلاتی که آنتی اکسیدان‌های سنتزی مانند بوتیل هیدروکسی آنیزول[1] و بوتیل هیدروکسی تولوئن[2] برای بدن ایجاد می کنند، توجه به مواد طبیعی میوه‌ها، برگ‌ها، سبزیجات، قسمت‌های ریشه، ساقه دارای خاصیت آنتی اکسیدانی افزایش یافته است [۱]. عصاره‌های گیاهی به دلیل دارا بودن ترکیبات ضداکسایشی و عوامل حذف کننده رادیکال آزاد، توانایی بالایی برای بکارگیری به عنوان یک نگهدارنده طبیعی دارا هستند [۲]. انارجه[3] گیاهی است یکساله با ارتفاع ۲۰-۱۱۰ سانتیمتر با قابلیت گل افشانی و تولید مثل که در حدود ۱۵۰ گونه مختلف دارد. این گیاه در نواحی مرکزی و شمالی ایران میروید [۳]. گیاه انارجه دارای ترکیبات فنولی مختلف با خاصیت ضد اکسایشی است. حضور ترکیبات حاوی فلاونوئید و سولفور، دی آلیل سولفید و تری سولفید و آلیل سیستئین بعنوان فاکتورهای موثر بیولوژیکی در این گیاه گزارش شده‌اند و در مطالعات بسیار آزمایشگاهی خواص آن ثابت شده است [٤ و ٥ و ٦]. این پژوهش با هدف تأثیر روش های مختلف استخراج عصاره بر خصوصیات ضد اکسایشی برگ گیاه انارجه انجام شد.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- مواد

مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش از شرکت مرک آلمان و سیگما آلدریچ خریداری شدند و همگی از درجه HPLC برخوردار بودند.گیاه انارجه بعد از جمع آوری از رویشگاه های طبیعی این گیاه در استان مازندران توسط بخش گیاهشناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه ساری مورد تایید قرار گرفت. سپس در محیط خشک و تاریک به دور از نور خورشید و در جریان هوا خشک شد و با آسیاب بصورت پودر درآمد و با الک مش ۸۰ (۸۰۰ میکرون) الک شد و تا زمان استفاده در کیسه پلی اتیلنی دو لایه تیره در یخچال با دمای ٤ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

۲-۲- روش ها

۲-۲-۱- استخراج عصاره برگ انارجه

استخراج عصاره برگ گیاه انارجه با استفاده از ماسراسیون، استفاده از سیال فوق بحرانی و اولتراسوند به ترتیب با روش های تاچاکیتیرونگرود و همکاران [۷]، گلی و همکاران [۸]، و آلبو و همکاران [۹] انجام شد. بعد از استخراج حلال اضافی به وسیله تبخیرکننده چرخشی (٤٥ درجه سانتیگراد) تبخیر و عصاره‌ها تا زمان استفاده در فریزر با دمای ۱۸- درجه سانتیگراد نگهداری شدند..

۲-۲-۲-بازده استخراج عصاره

برای اندازه گیری راندمان عصاره‌گیری روش های ذکر شده بر حسب ماده خشک، ۵ میلی لیتر عصاره درون بالن ته گرد ریخته شد و وزن آن ثبت گردید. بالن سپس در روتاری اواپراتور با دمای ٤٠ درجه سانتیگراد قرار گرفت و سپس در آون با دمای ۱۰۵-۱۰۳ درجه سانتیگراد خشک گردید. راندمان عصاره‌گیری بر حسب گرم عصاره در ۱۰۰ گرم عصاره خشک بیان گردید[۱۰].

بازده عصاره گیری = وزن عصاره ی خشک / وزن ماده ی اولیه × ۱۰۰

۲-۲-۳- اندازه‌گیری مقدار کل ترکیبات فنولی

در این روش مقدار ۰/۵ میلی لیتر از عصاره با ۵ میلی لیتر معرف فولین سیوکالچو که به نسبت ۱به ۱۰ با آب مقطر رقیق شده بود، مخلوط گردید. سپس ٤ میلی لیتر سدیم کربنات (۱ مولار) به آن اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در جمام آبی با دمای ٤٥ درجه سانتیگراد قرار گرفتند تا فاز آبی گسترش یابد و سپس جذب آن در ٧٦٥ نانومتر توسط اسپکتروفتومترUV-Vis خوانده شد. برای رسم منحنی استاندارد از گالیک اسید استفاده شد و مقدار فنول نمونه‌ها با قرار دادن مقدار جذب عصاره در معادله خطی ($Y = 1.02x + 0.431$) بر اساس میلی اکی والان اسید گالیک بر گرم عصاره بیان شد [۱۱].

1. Butylated Hydroxy Toluene (BHT)
2. Butylated Hydroxy Anisole (BHA)
3. Pimpinella affinis

www.SID.ir

Archive of SID

٢-٢-٤-اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره

٢-٢-٤-١- مهار رادیکال آزاد DPPH

آزمایش مهار رادیکال آزاد برای اولین بار به وسیله بلویس در سال ١٩٥٨ و بعد از کمی اصلاح در تحقیقات بیشماری به شکل کنونی انجام شده است. بدین منظور ٠/٣ میلی لیتر از عصاره با غلظت‌های مختلف با ٢/٧ میلی لیتر محلول متانولی (٦×١٠^{-٥}) DPPH مخلوط و به مدت ٦٠ دقیقه در دمای اتاق در مکان تاریک نگهداری شده و جذب در ٥١٧ نانومتر خوانده شد و از طریق فرمول زیر بدست آمد [١٢].

I%=(جذب محلول DPPH-جذب نمونه)/جذب محلول DPPH×١٠٠

IC٥٠ به عنوان غلظتی از عصاره که دارای فعالیت مهار کنندگی معادل ٥٠٪ رادیکال های آزاد DPPH می باشد تعریف می شود و بر اساس فرمول بالا و با استفاده از معادله خط مقدار آن بدست می آید [١٣].

٢-٢-٤-٢- بیرنگ شدن بتاکاروتن:لینولئیک اسید

این آزمایش براساس روش آمارویز و همکاران [١٤] با اندکی تغییر انجام گرفت. بدین منظور ابتدا یک محلول پایه از بتاکاروتن- لینولئیک اسید به صورت زیر تهیه گردید: ٥ میلی گرم از بتاکاروتن در ١٠ میلی لیتر کلروفرم حل شد، ٦٠٠ میکرو لیتر از محلول تهیه شده به مخلوط ٤٠ میلی گرم لینولئیک اسید و ٤٠٠ میلی گرم توئین ٤٠ اضافه شد. سپس با روش تبخیر در خلا کلروفرم جدا گردید و ١٠٠ میلی لیتر آب اکسیژنه به آن اضافه و شدیدا هم زده شد. ٥ میلی لیتر از امولسیون تهیه شده فوق به لوله آزمایش منتقل و ٢٠٠ میکرولیتر از هر عصاره به لوله آزمایش اضافه گردید. جذب نوری نمونه ها با اسپکتروفتومتر در ٤٧٠ نانومتر در زمان صفر و همچنین بعد از ١٢٠ دقیقه قرار گرفتن در حمام آب ٥٠ درجه سانتیگراد قرائت شد. نمونه شاهد حاوی تمام ترکیبات مذکور به جز عصاره است. ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره به عنوان درصد بازداری با استفاده از فرمول زیر محاسبه می شود.

٪فعالیت آنتی اکسیدانی = $(DR_C-DR_S)/DR_C\times 100$

DRc= میزان تجریه نمونه شاهد، DRs= میزان تجزیه عصاره، مقادیر DRc و DRs بر حسب ln(a/b) محاسبه میشوند که a جذب در زمان صفر و b جذب بعد از ١٢٠ دقیقه است.

٢-٢-٥- تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل نتایج بدست آمده از میزان ترکیبات فنولی و بازده استخراج و خصوصیات آنتی اکسیدانی عصاره ها، در قالب طرح آزمایشی کاملا تصادفی با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ٢٠صورت گرفت. برای افزایش دقت و کاهش خطا آزمایشات در سه تکرار انجام شدند.

٣- نتایج و بحث

٣-١- مقایسه راندمان استخراج عصاره

پلی فنول‌ها مشتقات ثانویه متابولیت‌های گیاهی هستند که دارای یک یا تعداد بیشتر حلقه‌های آروماتیک با قابلیت تعویض گروه هیدروکسیل هستند [١٥]. این ترکیبات بطور گسترده از گیاهان سرچشمه میگیرند. گونه، جنس، محیط رشد، فصل رشد، آب و هوا، درجه حرارت، نور، نوع خاک و دیگر شرایط همگی بر روی میزان ترکیبات فنولی گیاه اناریجه موثرند و منجر به خواص آنتی اکسیدانی مختلف در این گیاه می‌شوند [١٦]. برای استخراج ترکیبات موثره گیاهان روش‌های مختلفی مانند خیساندن، استخراج با حلال، سوکسله، استخراج با میکروویو، استخراج با سیال فوق بحرانی و اولتراسوند وجود دارد [٢]. محاسبه راندمان استخراج ترکیبات موثره عصاره، کارآمدی روش استخراج را مشخص می نماید. بهترین روش، روشی است که ضمن افزایش میزان ترکیبات استخراج شده کمترین تغییرات را در خواص کاربردی ترکیبات ایجاد نماید [١٧]. در این مطالعه راندمان استخراج برای دو عصاره استخراج شده با روش اولتراسوند و ماسراسیون با یکدیگر تفاوت معنی دار آماری ($P<٠/٠٥$) نداشت. راندمان استخراج در روش سیال فوق بحرانی بالاتر بود و بعد از آن روش ماسراسیون قرار داشت (شکل ١). سانتوس و همکاران [١٨] عصاره گیاه اوکالیپتوس را با روش فوق بحرانی استخراج نمودند و اعلام نمودند راندمان استخراج در این روش نسبت به روش ماسراسیون بالاتر است. در روش استخراج با حلال مقادیر بالایی از حلال استفاده میشود که منجر به مخاطرات

www.SID.ir

Archive of SID

زیست محیطی می شود. در روش استخراج فوق بحرانی به واسطه استفاده از سیال فوق بحرانی در دمای کمتر، بازده استخراج بالاتر است.

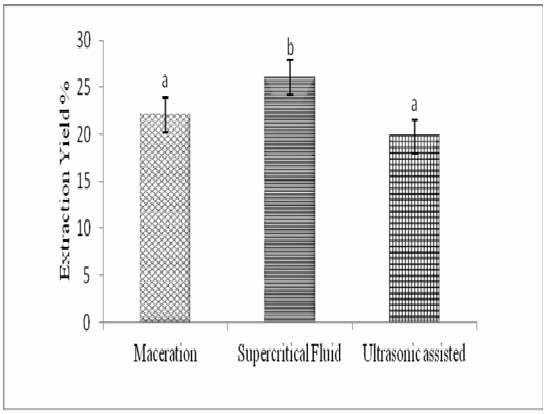

Fig 1 Extraction yield in different extraction techniqies.

چاترجی و همکاران [۱۹] دو روش استخراج با حلال و استخراج با سیال فوق بحرانی را برای استخراج آنتوسیانین‌های بادمجان مورد استفاده قرار دادند. نتایج بررسی آن ها نشان داد حداکثر بازدهی استخراج با استفاده از سیال فوق بحرانی بدست می آید. در مطالعه‌ای دیگر نشان داده شد که بازده استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی عصاره دانه انگور در روش اولتراسوند بالاتر از ماسراسیون است که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت ندارد [۲۰]. دلفانیان و همکاران [۲۱] عصاره پوست و پالپ میوه ازگیل ژاپنی را با روش های گوناگون استخراج نمودند و اعلام نمودند بازده استخراج در روش استفاده از سیال فوق بحرانی بالاتر از روش اولتراسوند است که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد [۲۱].

۳-۲- ترکیبات فنولی عصاره

رادیکال های آزاد عامل اصلی بیماری هایی مانند سیروز کبدی، تصلب شریان، سرطان، دیابت و ... هستند. گونه های اکسیژن فعال از قبیل سوپر اکسید (O2)، رادیکال های هیدروکسیل (OH) و نیتریک اکسید (NO) با غیر فعال کردن آنزیم ها باعث نابودی ترکیبات سلولی و آسیب به سلول ها می شوند [۲۲]. آنتی اکسیدان‌ها با خاصیت جاروب کنندگی رادیکال های آزاد مقاومت به اکسایش را افزایش می دهند. بسیاری از گیاهان حاوی ترکیبات آنتی اکسیدان هستند که از جمله میتوان به ویتامین C، E، کاروتنوئیدها، فلاونوئیدها، فنول ها، تانن ها و .. اشاره نمود. تمامی این ترکیبات با اثر بر رادیکال های آزاد خاصیت ضداکسایشی خود را اعمال میکنند [٦]. ترکیبات فنولی که گروه متابولیت های ثانویه آروماتیک گیاهی هستند که به طور گسترده ای در سراسر گیاه پخش شده اند و دارای تاثیرات بیولوژیکی متعدد همچون فعالیت آنتی اکسیدانی و فعالیت ضد باکتریایی هستند. فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیبات فنولیک در گیاهان عمدتاً به دلیل ویژگی‌های اکسایش-کاهش و ساختار شیمیایی آنها است که میتواند نقش‌های مهمی در خنثی کردن رادیکال‌های آزاد، احاطه کردن فلزات انتقالی و فرونشاندن[4] مولکول‌های اکسیژن یگانه[5] و سه گانه[6] از طریق تغییر مکان یا تجزیه پراکسیدها داشته باشند [۲۳].

Table1 Total phenol of different extracts

Extraction method	(mg GA/100gE) Total phenol
Maceration	1790.63[b]
Supercritical	1502.25[a]
Ultrasonic	1836.69[b]

Different letters in the column and row indicate significant differences (P< 0.05).

همانطور که در جدول ۱ نشان داده شده است، ترکیبات فنولی در دو روش ماسراسیون و اولتراسوند با یکدیگر اختلاف معنی دار آماری (P<۰/۰۵) نداشتند. عصاره استخراج شده به روش اولتراسوند بالاترین مقدار ترکیبات فنولی را داشت. توران و پیندی [٦] میزان ترکیبات فنولی کل عصاره گیاه اناریجه (*P. tirupatiensis*) که با روش ماسراسیون و با استفاده از حلال های گوناگون (آب، اتانول، پترولیوم اتر) استخراج شده بود را بین ۱۵۰۱/٦ تا ۲۳۱۳/۹ (mg GA/۱۰۰g E) اعلام نمودند که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد و دلیل اختلاف جزئی، تفاوت در واریته و حلال مورد استفاده است. لذا عصاره اناریجه به دلیل دارا بودن مقادیر بالای ترکیبات فنولی در عصاره دارای فعالیت روبش رادیکال های آزاد و خاصیت آنتی اکسیدانی است. عصاره استخراج شده به وسیله اولتراسوند به دلیل بالاتر بودن مقدار فنول کل گزینه مناسب تری برای استفاده به عنوان یک آنتی اکسیدان طبیعی می باشد. این نتایج مطابق با نتایج پژوهشگران قبلی است که نشان دادند میزان ترکیبات فنولی عصاره‌های استخراج شده با دو روش ماسراسیون و اولتراسوند با

4. Quenching
5. Singlet
6. Ttriplet

www.SID.ir

Archive of SID

هم اختلاف معنی دار آماری دارد و در روش اولتراسوند ترکیبات فنولی بسیار بیشتر است. استخراج ترکیبات فنولی از پوسته بادام زمینی [٢] برگ گیلاس [٢٤]، شاهدانه، تخم کتان و دانه کانولا [٢٥] پژوهش‌های انجام شده در این زمینه است. دلیل بالاتر بودن میزان ترکیبات فنولی در روش اولتراسوند مربوط به اثرات کاویتاسیون ناشی از امواج اولتراسوند می باشد. همچنین تخریب مکانیکی دیواره سلولی منجر به نفوذ بیشتر حلال در بافت‌های گیاهی میشود که به نفوذ هرچه بیشتر ترکیبات فنولی عصاره در بافت‌های گیاه کمک میکند [٢]. محققان بسیاری معتقد هستند که استخراج به روش اولتراسوند به دلیل تسریع زمان عصاره گیری، بازده استخراج را افزایش می دهد و فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتری نسبت به عصاره‌های استخراج شده با روش حلال دارد [٢٥ و ٢٦].

٣-٣- ترکیبات شناسایی شده در عصاره اناریجه

ترکیبات شناسایی شده توسط دستگاه LC-MS در جدول ٢ نشان داده شده است. پاپای و آنتال [٢٧] به بررسی اثرات آنتی اکسیدانی عصاره گیاه جعفری پرداختند. وجود فلاونوئید apigenin-7-O-glucoside و apiin ها در عصاره جعفری اثرات آنتی اکسیدانی بالایی به این عصاره بخشید. در عصاره اناریجه دو ترکیب ذکر شده وجود دارند و اثرات آنتی اکسیدانی خود را اعمال می کنند. نقش روبش رادیکال های آزاد در آپیجنین و گلیکوزید آن بستگی به ساختار دی هیدروکسی در موقعیت اورتو حلقه B و پیوندهای دوگانه کانژوگه C2-C3 دارد [٢٨]. وجود اسید کلروژنیک، پی-کوماریک اسید و کافئیک اسید در عصاره اناریجه که مشتقات سینامیک اسید هستند دارای اثرات آنتی اکسیدانی هستند که به حضور گروه‌های هیدروکسیل در ساختار این ترکیب فنولی بستگی دارد. این خاصیت در پی-کوماریک اسید نیز وجود دارد که به دلیل حضور یک گروه هیدروکسیل است. هر دو ترکیب به واسطه دارا بودن گروه های هیدروکسیل نقش مهمی در روبش رادیکال های آزاد بازی میکنند هر چند قدرت آنتی اکسیدانی آن ها از کافئیک اسید کمتر است [٢٩]. بسیاری از ترکیبات شناسایی شده در عصاره اناریجه دارای حلقه بنزنی هستند که این حلقه فعالیت آنتی اکسیدانی و توانایی روبش رادیکال های آزاد عصاره اناریجه را افزایش می دهد. بنابادجی و همکاران [٣٠] دریافتند که تعویض ایندول در حلقه بنزن با گروه متوکسی، فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره را به میزان زیادی افزایش می دهد. همانطور که اضافه کردن این گروه در چالکون ها باعث افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی می شود [٣١]. در عصاره اناریجه نیز وجود این ترکیبات با ساختار خاص فعالیت آنتی اکسیدانی را افزایش می دهد که در بخش بعد به آ« پرداخته شده است.

Table 2 Chemical composition of pimpinella extract

R_T	%	Compound	R_T	%	Compound
13.4	0.84	Quercetin-3-O-glucuronide	4.1	5.09	Gallic acid
13.9	0.03	1,5-O-Dicaffeoylquinic acid	5.03	0.04	3-O-Caffeoylquinic acid
15.10	0.11	5-feruloylquinic acid*a*	6.1	1.59	4-O-Caffeoylquinic acid
15.12	0.02	3,5-O-Dicaffeoylquinic acid	7.39	1.33	3-caffeoylquinic acid (neochlorogenic acid)
15.22	1.34	quercetin-*O*-dihexoside	8.2	4.13	5-O-Caffeoylquinic acid
15.54	0.14	1-feruloylquinic acid*a*	8.22	0.07	5-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid)
16.04	12.73	Cafeic acid	11.32	31.54	chlorogenic Acid
16.1	3.26	apigenin-7-O-glucoside	11.73	0.24	3-feruloylquinic acid*a*
16.8	1.05	quercetin-3-*O*-rutinoside (rutin)	12	0.1	4-caffeoylquinic acid (cryptochlorogenic acid)
18.7	0.01	4,5-O-Dicaffeoylquinic acid	18.3	1	quercetin-3-*O*-galactoside (hyperoside)
19.81	0.12	Kaempferol 3-O-glucoside	18.42	8.14	Apigenin-acetyl-apiosylglucoside (acetyl-apiin)
20.28	0.06	quercetin-3-*O*-glucuronide (miquelianin)	18.54	0.06	Kaempferol 3-O-rutinoside
20.4	1.86	Luteolin-7-O-glucoside	18.6	0.54	quercetin-3-*O*-glucoside (isoquercitrin)
22.45	5.62	rosmarinic acid	21.5	11.19	Apigenin-6-C-glucoside
34.11	0.83	p-Coumaric acid derivative	21.69	0.07	1,5-dicaffeoylquinic acid

www.SID.ir

Archive of SID

۳-٤- فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره

فعالیت آنتی اکسیدانی غذاهای مختلف می تواند با استفاده از روش های گوناگونی مورد ارزیابی قرار بگیرد. بطور کلی دو مکانیسم اصلی برای تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره وجود دارد. جابجایی اتم های هیدروژن و جابجایی تک الکترون ها. به همین دلیل است که برای ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی نمیتوان به یک روش اکتفا نمود و لذا لازم است فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ها با روش های گوناگونی مورد ارزیابی قرار بگیرد [۳۲].

۳-٤-۱- مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها با روش مهار رادیکال آزاد DPPH

DPPH یک رادیکال آزاد مقاوم در درجه حرارت معمولی و فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH در عصاره‌های گیاهی بازتابی از توانایی عصاره‌ها در اهدا هیدروژن است. بطورکلی ترکیبات فنولی توانایی اهدا اتم هیدروژن اثرات بیشتری در مهار رادیکال-های DPPH دارند. نتایج پژوهش‌های مختلف نشان می دهد که عصاره هیدروالکلی اناریجه بر روی مهار رادیکال های DPPH موثر بوده است [۳۳]. مشاهده می شود که در تمام نمونه‌ها با افزایش غلظت عصاره درصد مهار رادیکال آزاد DPPH افزایش یافت و عصاره‌های استخراج شده با روش اولتراسوند بیشترین درصد مهار رادیکال‌های آزاد را داشتند (جدول ۳). فعالیت آنتی اکسیدانی بالای عصاره استخراج شده با روش اولتراسوند به دلیل بالاتر بودن ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی این عصاره است [۳٤]. سلیمان و همکاران [۳۵] دلیل افزایش مهار رادیکال آزاد DPPH با افزایش غلظت عصاره را افزایش کمی ترکیبات فنولی اعلام نمودند. این نتایج همچنین با نتایج تانیا و همکاران [۳٦] مطابقت دارد. تارون و پیندی [٦] ضمن استخراج ترکیبات فنولی عصاره و اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره با استفاده از روش مهار رادیکال آزاد DPPH افزایش میزان مهار رادیکال را با افزایش غلظت عصاره بیان نمودند که همراستا با نتایج این پژوهش می باشد. توانایی عصاره اناریجه در مهار رادیکال‌های آزاد DPPH به مقدار کل ترکیبات فنولی آن بستگی دارد. این نتایج مطابق با نتایج لوگانایاکی و همکاران [۳۷] می باشد. آن‌ها دلیل مهار بالاتر رادیکال های آزاد DPPH در عصاره میوه *Helicteres isora* و دانه های *Ceiba pentandra* را بالا بودن ترکیبات فنولی این عصاره‌ها اعلام نمودند. مهار رادیکال آزاد DPPH در عصاره اناریجه وابسته به حضور ترکیبات فنولی در آن است که نقش مهمی به عنوان یک آنتی اکسیدان بازی می کند. زیرا توانایی اهدا هیدروژن و جابجایی الکترون را دارا می باشد [۳۸].

Table 3 DPPH free radical scavenging of extract in different concentration

2000	1500	1000	500	Extract
68.97Db	61.67٦vCb	Bb49.67	32.04Ab	Maceration
51.89Da	٩41.97Ca	35.43Ba	24.08Aa	Supercritical
81.74Dc	74.98Cc	56.79Bc	36.27Ab	Ultrasonic

Different small and big letters in the column and row indicate significant differences (P< 0.05).

۳-٤-۲-معادله خطوط برای محاسبه IC50 عصاره های مختلف

خاصیت آنتی اکسیدانی گیاهان وابسته به میزان ترکیبات فنولی در آن ها است که به ظرفیت اهدا الکترون به رادیکال های آزاد در آن ها بستگی دارد. گونه های فعال اکسیژن (ROS) نقش مهمی در پیری و بیماری‌های وابسته به پیری بازی می کنند. لذا مصرف عصاره‌های طبیعی آنتی اکسیدانی روند پیر شدن را آهسته‌تر میکند. همانطور که در جدول٤ نشان داده شد، مقادیر IC50 برای نمونه های عصاره استخراج شده با روش اولتراسوند کمتر از عصاره‌های استخراج شده به دو روش دیگر بود. IC50 به عنوان غلظتی از عصاره تعریف می شود که آن غلظت می تواند ۵۰٪ رادیکال آزاد را مهار کند. هرچه مقادیر IC50 کمتر باشد قدرت آنتی اکسیدانی عصاره بیشتر است. مقادیر IC50 برای نمونه های اولتراسوند کمتر بود که نشان دهنده بالا بودن خاصیت

www.SID.ir

Archive of SID

آنتی اکسیدانی این عصاره بود. جمشیدی و همکاران [٣٩] فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره آبی اناریجه را بر حسب IC50 را ٣٧٤/٦٦ میکروگرم بر میلی لیتر محاسبه نمودند. در پژوهش حاضر مقدار IC50 برای عصاره استخراج شده به روش اولتراسوند ٨٤٨ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. نبوی و همکاران [٤٠] میزان IC50 را برای عصاره بخش‌های هوایی گیاه اناریجه ٠/٠٢±٠/٢٧ میلی گرم بر میلی لیتر گزارش نمودند که معادل ٢٧٠ پی پی ام می باشد. آن ها عصاره اناریجه را با روش پرکولاسیون استخراج نمودند. نامجویان و همکاران [٤١] میزان IC50 را برای عصاره متانولی و دی کلرومتانی گیاه (*Pimpinella Barbata*) به ترتیب ١١٤٠ و ١٨٧٠ میکروگرم بر میلی لیتر محاسبه نمودند که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد. اختلاف در نوع روش عصاره گیری، حلال مورد استفاده و نیز اندام مورد استفاده برای عصاره گیری از دلایل اختلاف در IC50 بدست آمده است. در پژوهش حاضر از حلال آب:اتانول استفاده شد.

Table 4 Line equations and IC50 of DPPH free radical scavenging of different extracts

IC50 (ppm)	Line equations	Extract
1130	Y=0.0247X+22.093	Maceration
1897	Y=0.018X+15.852	Supercritical
848	Y=0.0309X+23.793	Ultrasonic

٣-٤-٣- مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها با روش بتاکاروتن-اسید لینولئیک

بتاکاروتن فعالیت بیولوژیکی قوی نشان می دهد و از نظر فیزیولوژیکی یک ترکیب مهم است. در صورتیکه بتاکاروتن قبل از دریافت شدن در بدن تجزیه شود، اثرات بیولوژیک خود را اعمال نمیکند. بتاکاروتن حاوی ١١ باند دوگانه است لذا شدیدا به اکسیداسیون رادیکال های آزاد حساس بوده و به سرعت بوسیله لینولئیک اسید بیرنگ می شود [٤٢ و ٤٣]. همانطور که در شکل ٢ مشاهده میشود، عصاره اناریجه از بیرنگ شدن بتاکاروتن توسط لینولئیک اسید جلوگیری نمود و با افزایش غلظت عصاره میزان فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها افزایش یافت [٤٤] و اختلاف معنی دار آماری بین غلظت های مختلف وجود داشت. مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ها با استفاده از روش بتاکاروتن-لینولئیک اسید نشان داد در حضور آنتی اکسیدان‌ها بتاکاروتن به مقدار کمتری بیرنگ می شود که اساسا به دلیل به تاخیر افتادن فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد آنتی اکسیدان‌ها است [٤٥]. عصاره استخراج شده با روش سیال فوق بحرانی دی اکسید کربن بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی را داشت [٤٦] و بعد از آن عصاره حاصل از روش اولتراسوند قرار داشت. حسین و همکاران [٢] عصاره استخراج شده به روش اولتراسوند را موثرتر از روش ماسراسیون در استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی عصاره پوست بادام زمینی اعلام نمودند که با نتایج ما مطابقت دارد.

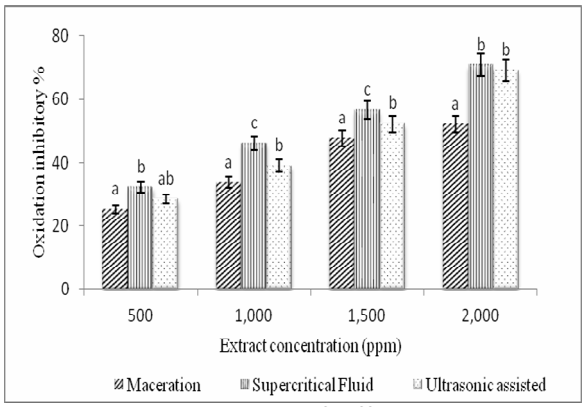

Fig 2 Antioxidant activity of different extracts using betacaroten:linoleic acid assay

٤- نتیجه گیری

در این پژوهش اثرات ضد اکسایشی عصاره اناریجه، که با روش های مختلف ماسراسیون، استفاده از سیال فوق بحرانی و امواج اولتراسوند استخراج شده بود، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان دهنده تاثیر معنی دار روش آماری بر بازده استخراج و میزان ترکیبات فنولی بود که خود بر فعالیت ضد اکسایشی عصاره اثرگذار بود. بطوریکه عصاره حاصل از روش استخراج با امواج اولتراسوند بالاترین فعالیت ضداکسایشی را نشان داد. عصاره گیاه اناریجه به دلیل دارا بودن ترکیبات فنولی مانند کلروژنیک اسید دارای خاصیت ضداکسایشی است و میتواند به عنوان یک نگهدارنده طبیعی در صنعت غذا مورد استفاده قرار بگیرد.

www.SID.ir

Archive of SID

۵- منابع

[1] Pumtes, P., Rojsuntornkitti, K., Kongbangkerd, T. and Jittrepotch, N. (2016). Effects of different extracting conditions on antioxidant activities of Pleurotus flabellatus. International Food Research Journal, 23(1): 173-179.

[2] Hussain, A.I., Anwar, F., Sherazi, S.T.H.. and Przybylski, R. (2008). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (Ocimum basilicum) essential oils depends on seasonal variations. Food Chemistry, 108: 986-995.

[3] Mozaffarian, V. A. (1996). Dictionary of Iranian Plant Names, Farhang Moaser, Tehran , Iran.

[4] Sallam, K.I., Ahmed, A.M., Elgazzar, M.M. and Eldaly, E.A. (2007). Chemical quality and sensory attributes of marinated Pacific saury (Cololabis saira) during vacuum-packaged storage at 4ºC. Food Chemistry, 102: 1061–1070.

[5] Özbek, H., Güvenalp, Z., Kuruüzüm-Uz, A., Kazaz, C. and Demirezer, L.O. (2016). Phenylpropanoids, Sesquiterpenoids and Flavonoids from *Pimpinella tragium* Vill. subsp. *lithophila* (Schischkin) Tutin. Record of Natural Products, 10(2): 207-213

[6] Tharun, G. and Kumar-Pindi, P. (2013). Evaluation of antioxidant potential and antimicrobial activity of successive extracts of Pimpinella tirupatiensis. Journal of Pharmacological Research, 7: 817-822.

[7] Tachakittirungrod, S., Okonogi, S. and Chowwanapoonpohn. S. (2007). Study on antioxidant activity ofcertain plants in Thailand: mechanism of antioxidant action of guava leaf extract. Food Chemistry, 103: 381–388.

[8] Goli, A.H., Barzegar, M. and Sahari, M.A. (2005). Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (Pistachia vera) hull extracts. Food Chemistry, 92(3): 521–525.

[9] Albu, S., Joyce, E., Paniwnyk, L., Lorimer, P. and Mason, J. (2004). Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from Rosmarinus officinalis for the food and pharmaceutical industry. Ultrasonic Sonochemistry, 11: 261–265.

[10] Zekovica, Z., Kaplanb, M., Pavlica, B., Oktem Olgunb, E., Vladica, J., Canlıc, O. and Vidovi, S. (2016). Chemical characterization of polyphenols and volatile fraction ofcoriander (*Coriandrum sativum* L.) extracts obtained by subcriticalwater extraction. Industrial Crop Products, 87: 54–63.

[11] Donald, S., Prenzler, P.D., Autolovich, M. and Robards, K. (2001). Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. Food Chemistry, 73: 73-84.

[12] 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 Nutrition, 5: 426-435.

[13] Lu, Y., Khoo, T.J. and Wiart, C. (2014). Antioxidant activity determination of citronellal and crude extracts of *Cymbopogon citratus* by 3 different methods pharmacology. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 5: 395-400.

[14] 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.

[15] Parr, A.J. and Bolwell, G.P. (2000). Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 80: 985– 1012.

[16] Bolling, B., Dolnikowski, G., Blumberg, J. and Chen, C.Y. (2010). Polyphenol content and antioxidant activity of California almonds depend on cultivar and harvest year. Food Chemistry, 122: 819–25.

[17] 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.

[17] Santos, S.A.O., Villaverde, J.J., Silva, C.M., Neto, C.P. and Silvestre, A.J.D. (2012). Supercritical fluid extraction of phenolic compounds from Eucalyptus globulus Labill bark. Journal of Supercritical Fluid, 71: 71–79.

www.SID.ir

Archive of SID

biological active ingredient. Europen Journal of Natural and Social Science, 3:1857-7881.

[28] Leopoldini, M., Pitarch, I.P., Russo, N. and Toscano, M. (2003). Structure, Conformation, and Electronic Properties of Apigenin, Luteolin, and Taxifolin Antioxidants. A First Principle Theoretical Study. Journal of Chemical Physic, 108(1): 92-96.

[29] Andreasen, M.F., Landbo, A.K., Christensen, L.P., Hansen, A. and Meyer, A.S. (2001). Antioxidant Effects of Phenolic Rye (*Secale cereale* L.) Extracts, Monomeric Hydroxyl Cinnamates, and Ferulic acid Dehydrodimers on Human Low Density Lipoproteins. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 49: 4090-4096.

[30] Benabadji, S.H., Wen, R., Zheng, J.B., Dong, X.C. and Yuan, S.G. (2004). Anticarcinogenic and antioxidant activity of diindolylmethane derivatives. Acta Pharmaceulogical Sinica, 25(5): 666–671.

[31] Miranda, C.L., Stevens, J.F., Ivanov, V., McCall, M., Balz, F. and Deinzer, M.L. (2000). Antioxidant and prooxidant actions of prenylated and nonprenylated chalcones and flavanones in vitro. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 48: 3876–3884.

[32] Xu, CH., Zhang, Y., Zhu, L., Huang, Y. and Lu, J. (2011). Influence of Growing Season on Phenolic Compounds and Antioxidant Properties of Grape Berries from Vines Grown in Subtropical Climate. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 59(4): 1078–1086.

[33] Leong, L.P. and Shui, G. (2002). An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. Food Chemistry, 76 (1): 69-75.

[34] Maqsood, S., Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Sumpavapol, P. and Abushelaibi, A. (2015). Antioxidant activity of date (*Phoenix dactylifera* var. Khalas) seed and its preventive effect on lipid oxidation in model systems. International Food Research Journal, 22(3): 1180-1188.

[35] Sulaiman, SH.F., Sajak, A.A.B., Ooi, K.H., Supriatno, L. and Seow, E.M. (2011). Effect of solvents in extracting polyphenols and antioxidants of selected raw Vegetables. Journal of Food Composition and Analysis, 24(4-5): 506–515.

[18] Chatterjee, D., Nikhil, T., Jadhav, A. and Bhattacharjee, P. (2013). Solvent and supercritical carbon dioxide extraction of color from eggplants :Characterization and food applications. LWT - Food Science and Technology, 51: 319-324.

[19] Samavardhana, K., Supawititpattana, P., Jittrepotch, N., Rojsuntornkitti, K. and Kongbangkerd, T. (2015). Effects of extracting conditions on phenolic compounds and antioxidant activity from different grape processing byproducts. International Food Research Journal, 22(3): 1169-1179.

[20] Delfanian, M., Esmaeilzadeh Kenari1, 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 and Nutrition, 3(3): 179–187.

[21] Swarnalatha, S. and Aswath, M.S. (2000). Flavonoids: a nutritional protection against oxidative and UV induced cellular damages. Pharmacognosy Reviews Journal Impact and Description, 1(1): 30-40.

[22] Lee, J.C. and Lim, K.T. (2000). Effects of cactus and ginger extracts as dietary antioxidants on reactive oxidant and plasma lipid level. Food Science and Biotechnology, 9(2): 83–8.

[23] 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 compositionand antioxidant activity of cherry laurel (*Prunus laurocerasus*) leaf and fruit extracts. Industrial Crop Products, 54:142–148.

[24] Teh, S. and Brich, J.B. (2014). Effect of ultrasonic treatment on the polyphenol content and antioxidant capacity of extract from defatted hemp, flax and canola seed cakes. Ultrasonic Sonochemistry, 21(1): 346–353.

[26] Khan, M.K., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A.S., Dangles, O. and Chemat, F. (2010). Ultrasonic-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. Food Chemistry, 119: 851-858.

[27] Papay, Z.E. and Istvan, A. (2014). Study on the antioxidant activity during the formation of

www.SID.ir

Archive of SID

Jundishapour Journal of Natural Pharmacological Products, 5(1): 1-5.

[42] Sarkar, A., Bishayee, A. and Chatterjee, M. (1995). Beta-carotene prevents lipid peroxidation and red blood cell membrane protein damage in experimental hepato carcinogenesis. Cancer biochemistry biophysics Journal Impact and Description, 15: 111–125.

[43] Ziegler, R.G., Colavito, E.A., Hartge, P., Mcadams, M.J., Schoenberg, J.B. and Mason, T.J. (1996). Importance of a-carotene, bcarotene, and other phytochemicals in the etiology of lung cancer. Journal of the Egyptian National Cancer Institute, 88(23): 612–615.

[44] Rafiee, Z., Jaafari, S.M., Aalamim, M. and Khamirim, M. (2011). The antioxidant features of extracts of olive leaves and their application in sunflower oil. Journal of Food Industrial Research, 21(1): 12 – 23.

[45] Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W. and Shahidi, F. (2012). Gelatin hydrolysate from blacktip shark skin prepared using papaya latex enzyme: Antioxidant activity and its potential in model systems. Food Chemistry, 135 (3): 1118-1126.

[46] Herzi, N., Bouajila, J., Camy, S., Romdhane, M.. and Condoret, J. (2013). Comparison of different methods for extraction from Tetraclinis articulata: Yield, chemical composition and antioxidant activity. Food Chemistry, 141(4): 3537–3545.

[36] 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 Product Research, 2(4): 442-447.

[37] Loganayaki, N., Siddhuraju, P. and Manian, S. (2013). Antioxidant activity and free radical scavenging capacity of phenolic extracts from *Helicteres isora* L. and *Ceiba pentandra* L. Journal of Food Science and Technology, 50 (4): 687-695.

[38] Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel Wissenschaft and Technology, 28(1): 25-30.

[39] Jamshidi, M., Ahmadi-Ashtebani, H., Fathi-Azad, F., Mazandarani, M., and Khaki, A. (2000). Evaluation and comparison of phenolic compounds and antioxidant activity of some plant species native to the Caspian. Journal of Medical Plant Science, 2(34): 1-10.

[40] Nabavi, S.M., Ebrahimzadeh, M.A., Nabavi, S.F. and Jafari, M. (2008). Free radical scavenging activity and antioxidant capacity of Eryngium caucasicum Trautv and Froripia subpinnata. Journal of Pharmacological Research, 3:19-25.

[41] Namjooyan, F., Azemi, M.E. and Rahmanian, V.R. (2010). Investigation of antioxidant activity and total phenolic content of various fractions of aerial parts of *PIMPINELLA BARBATA* (DC.) BOISS.

www.SID.ir

Archive of SID

Effect of extraction methods on the antioxidant properties of *Pimpinella affinis*

Saremi, E. [1], Habibi Najafi, M. B. [2*], Haddad Khodaparast, M. H. [3], Bahraini, M. [4]

1. Ph. D student, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
2. Professor, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
3. Professor, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
4. Assist. Prof. Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

(Received: 2016/07/17 Accepted: 2016/11/23)

The purpose of this study was to investigate the effect of different extracting conditions on antioxidant and antimicrobial activity of *pimpinella affinis*. Samples were extracted by using maceration, ultrasonic assisted method (UAE) and supercritical fluid extraction (SFE). Extraction yield and total phenolic compounds (TPC) of extracts were measured and the antioxidant activity of were analyzed in terms of four concentration (500, 1000, 1500 and 2000 ppm) using DPPH free radical scavenging and betacaroten:linoleate assays. The phenolic compounds fractions were determined using LC-MS system. TPC of extracts ranged between 1502.25 to 1836.69 mg GA/100g E. The results showed that SFE and UAE have highest extraction yield and TPC respectively. The UAE extract has highest antioxidant activity in DPPH free radical scavenging method. Clorogenic acid (13.54%) was the most compound of extract. The results of this study suggest that pimpinella extract due to have phenolic compound have antioxidant and antimicrobial activity and it can be good alternative for synthetic antioxidants.

Keywords: Pimpinella affinis, Extraction methods, Antioxidant

* Corresponding Author E-Mail Address: habibi@um.ac.ir

www.SID.ir