ویژگی های آنتی اکسیدانی عصاره برگ زیتون و کاربرد آن در روغن آفتابگردان

زهرا رفیعی[۱]، سید مهدی جعفری*[۲]، مهران اعلمی[۳] و مرتضی خمیری[۴]

تاریخ دریافت: ۸۹/۷/٤ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۲/۲۸

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد صنایع غذایی، دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۲- استادیار مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۳- استادیار تکنولوژیصنایع غذایی، دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
٤- استادیار میکروبیولوژی صنایع غذایی، دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
* مسئول مکاتبه E-mail: Smjafari@gau.ac.ir

چکیده

در این پژوهش میزان ترکیبات فنولی برگ زیتون دو واریته کرونایکی و روغنی به کمک حلال‌های آب، متانول ۸۰٪ و استون استخراج شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های حاصل با سه روش مهار رادیکال دی پی پی اچ، نیروی احیا کنندگی و ظرفیت آنتی اکسیدانی تعیین و با آنتی‌اکسیدان های سنتزی (BHA و BHT) مقایسه شدند. در ادامه اثر عصاره متانولی واریته کرونایکی بر پایداری اکسایشی روغن آفتابگردان با اندازه گیری دو فاکتور اندیس پروکسید و اسید تیوباربیتوریک بررسی شد. نتایج نشان داد بیشترین میزان ترکیبات فنولی (۱۹٦/٦ ±۰/۳۳ میلی گرم معادل اسید تانیک در گرم عصاره) و کمترین IC_{50} در آزمون دی پی پی اچ (۱۰٦/۰٦٥ ±۰/٥٥ میکروگرم در میلی لیتر)، نیروی احیاکنندگی (۲٥۸/۱۳۷ ±۰/۱٦ میکروگرم در میلی لیتر) و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (۲۰٥/۹ ±۰/۱۸ میکروگرم در میلی لیتر) مربوط به عصاره متانولی واریته کرونایکی بود. همچنین عصاره متانولی کرونایکی در سطح ۱۰۰۰ پی پی ام به خوبی توانست اندیس پروکسید و اسید تیوباربیتوریک را کنترل کرده و جایگزین آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی بوتیله هیدروکسی آنیزول و بوتیله هیدروکسی تولوئن در دو سطح ۱۰۰ و ۲۰۰ پی پی ام شود.

واژه های کلیدی: برگ زیتون، ترکیبات فنولی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، روغن آفتابگردان.

Antioxidant Properties of Olive Leaf Extract and its Application in Sunflower Oil

Z Rafiei[1], SM Jafari*[2], M Alami[3] and M Khomeiri[4]

Received: 26 September, 2010 Accepted: 19 March, 2011

[1]MSc Graduate, Faculty of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
[2] Assistant Professor of Food Engineering, Faculty of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
[3] Assistant Professor of Food Technology Faculty of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
[4] Assistant Professor of Food Microbiology Faculty of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
* Corresponding author: E-mail: Smjafari@gau.ac.ir

Abstract
The antioxidant properties and total phenolics content of methanol (80%), acetone and water extracts of olive leaves produced by maceration method were examined. Two varieties of olive including Koroneiki and Roghani were studied. Various experimental models including reducing power, total antioxidant capacity and DPPH radical scavenging activity were used for evaluation of antioxidant activity of extracts and compared with synthetic antioxidants (BHA and BHT). At the next stage, effect of methanol extract of Koroneiki on oxidative stability of sunflower were assessed using peroxide value and thiobarbitoric acid index. Results revealed that the highest phenolic content (196.6±0.33 mg TAE/g extract) and the lowest IC_{50} in DPPH (106.065±0.55 µg/ml), reducing power (258.137±0.16 µg/ml) and total antioxidant capacity (205.9±0.18 µg/ml) indices were related to the methanol extract of Cronaiky. Also, methanolic extract of Cronaiky at 1000 ppm could control peroxide value and thiobarbitoric acid index and could be used instead of BHA and BHT at 100 and 200 ppm levels.

Key words: Antioxidant activity, olive leaf, phenolic compound, sunflower oil

مقدمه

اکسایش عامل اصلی فساد چربی‌ها و روغن‌ها محسوب می شود. به همین دلیل آنتی‌اکسیدان‌ها برای جلوگیری از بدطعمی ناشی از اکسایش به این محصولات اضافه می شوند. BHA [1]، BHT [2]، TBHQ[3] از مهمترین آنتی‌اکسیدان‌های فنولی سنتزی هستند (اسکین و رابینسون ۲۰۰۰). این ترکیبات فرار و حساس به گرما بوده و برای پایداری مواد غذایی مطلوب نیستند. از طرفی استفاده از آن‌ها سلامتی انسان را تهدید می‌کند (ایکس هو ۲۰۰۳). به این دلایل استفاده از مواد آنتی اکسیدانی طبیعی که بتواند جایگزین انواع سنتزی شود و یا مصرف آن‌ها را کاهش دهد، بسیار مورد توجه قرار گرفته‌است. فنول‌ها یکی از مهمترین آنتی‌اکسیدان های طبیعی بوده و موجب نگهداری غذاهای فراوری شده در برابر اکسایش می شوند (آنتوویچ و همکاران ۲۰۰٤).

برگ زیتون یکی از گیاهان دارویی می‌باشد که به خاطر ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی خود شناخته شده است. در بین بخش‌های مختلف درخت زیتون، برگ زیتون غنی‌ترین منبع ترکیبات فنولی و الئوروپین [4] فراوان‌ترین

[1]. Butylated hydroxyanisole
[2]. Butylated hydroxytoluene
[3].Tert-butyl hyroquinone
[4].Oleuropein

ترکیب فنولی موجود در برگ می‌باشد. بنابراین این برگ-ها منابع مفید و ارزان الئوروپین هستند (لوجان و همکاران ۲۰۰٦، محمد و همکاران ۲۰۰٦). از طریق هیدرولیز الئوروپین، ترکیبات دیگری هم از برگ استخراج شده‌اند که از لحاظ مقدار، کمتر از الئوروپین هستند. از جمله این ترکیبات می توان دی متیل الئوروپین، لیگستروزید، ورباسکوزید، الئوزید دی متیل استر، یک نوع اسکوئیریدوئید غیر گلیکوزیدی و الئوروزید را نام برد (گویندا ۲۰۰٦).

آتاوودی (۲۰۰۵) فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان دارویی آفریقا از جمله برگ زیتون آفریقایی را مورد مطالعه قرار داد و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن را خوب عنوان کرد.

در پژوهش دیگری، محمد و همکاران (۲۰۰۷) ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان مناطق مدیترانه ای از جمله برگ زیتون را مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه مشخص شد بلوط اروپایی و برگ زیتون بیشترین مقدارآلفا توکوفرول را دارند. پتانسیل آنتی اکسیدانی بالای برگ های زیتون واریته های تونسی (بوعزیز و صیادی ۲۰۰۵) و پرتغالی (سیلوا و همکاران ۲۰۰٦) به ترتیب در برابر رادیکال های آزاد DPPH و $ABTS^{+}$ گزارش شده است. در مورد اثر عصاره برگ زیتون بر پایداری اکسایشی روغن های خوراکی، بوعزیز و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند غنی‌سازی روغن زیتون با عصاره برگ های زیتون موجب کاهش اندیس پراکسید و پایداری اکسایشی نسبت به نمونه شاهد شد. داده‌های سالتا و همکاران (۲۰۰۹) نیز بیانگر افزایش پایداری اکسایشی روغن‌های زیتون، پالم، آفتابگردان و یک شورتنینگ گیاهی غنی شده با ترکیبات فنولی برگ های زیتون (۲۰۰ میلی گرم / کیلوگرم) بود.

بنابراین با توجه به اینکه برگ زیتون به عنوان یک برگ همیشه سبز در تمام فصول سال به آسانی در دسترس بوده و یک ماده خام ارزان قیمت و غنی از ترکیبات فنولی می باشد، هدف از این پژوهش، استخراج ترکیبات فنولی برگ زیتون واریته های کرونایکی وروغنی با سه حلال متانول ۸۰ درصد، آب و استون به روش غرقابی و بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره ها با سه روش DPPH، نیروی احیا کنندگی و ظرفیت آنتی-اکسیدانی کل بود. همچنین اثر عصاره متانولی بر پایداری اکسایشی روغن آفتابگردان (به دلیل محتوای بالای اسید لینولئیک) مورد ارزیابی قرارگرفت.

مواد و روش ها

مواد شیمیایی

حلال‌های مصرفی از شرکت مجللی تهران و دیگر مواد شیمیایی مصرفی از نمایندگی‌های مرک و اپلیکم آلمان تهیه شدند.

آماده‌سازی برگ‌های زیتون

برگ‌های زیتون در اردیبهشت ماه سال ۸۸ از باغ زیتون جهاد کشاورزی کردکودی برداشت شد. بعد از برداشت برگ‌ها در سایه خشک و با استفاده از آسیاب (ساخت شرکت ایران خود ساز) پودر و از الک با مش ٤۰ عبور داده شد و تا زمان انجام آزمایشات بعدی در فریزر ۱۸- درجه سانتیگراد نگه داری شد.

استخراج ترکیبات فنولی با روش غرقابی

پودر برگ های زیتون دو واریته کرونایکی (واریته یونانی) و روغنی (واریته ایرانی) با نسبت ۵۰:۱ با سه حلال متانول ۸۰ درصد، آب و استون به مدت ۲٤ ساعت در دمای محیط به خوبی مخلوط شد. عصاره‌های حاصل پس از صاف شدن با کاغذ صافی واتمن شماره ۱ توسط دستگاه تبخیرکننده چرخان (آی کا آ مدل آر وی بیسیک ۰۵) با دمای ٤۰ درجه سانتیگراد تغلیظ و با دستگاه خشک کن انجمادی (ساخت شرکت اپرون مدل اف دی بی ۵۵۰۳) خشک گردید. در نهایت میزان ترکیبات فنولی عصاره ها به روش فولین- سیوکالتو اندازه گیری (عربشاهی و اروج ۲۰۰۷) و میزان ترکیبات فنولی به صورت میلی گرم معادل اسید تانیک در گرم عصاره برگ زیتون بیان شد.

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با آزمون‌های مختلف

از پودر خشک شده، غلظت‌های مختلفی (۱۰۰۰ -۵۰ پی پی ام) آماده و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها، با سه روش DPPH[1] (عربشاهی و اروج ۲۰۰۷) ، نیروی احیا کنندگی (ییلدریم و همکاران ۲۰۰۰) و ظرفیت آنتی-اکسیدانی کل (پریتو و همکاران ۱۹۹۹) تعیین و با آنتی-اکسیدان های سنتزی BHA و BHT مقایسه شد. در ادامه، نمودار فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ها در برابر میزان ترکیبات فنولی از طریق نرم افزار Excel رسم و معادلات خط و ضرایب تبیین (R^2) مربوطه مشخص گردید.

بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی در روغن آفتابگردان

روغن آفتابگردان بدون آنتی‌اکسیدان و اسید سیتریک از کارخانه پرتو دانه خزر بهشهرخریداری گردید. عصاره متانولی واریته کرونایکی در سه سطح ۲۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ پی پی ام و آنتی‌اکسیدان های سنتزی (BHA وBHT) در دو سطح ۱۰۰ و ۲۰۰ پی پی ام به خوبی به کمک همزن مغناطیسی (آی کا آ مدل آر اچ بی ۲) به مدت ۳۰ دقیقه با روغن مخلوط شد. نمونه های روغن در آون (ممرت مدل یو ال ام ٤۰۰) با دمای ۷۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۲ روز قرار داده شد و اندازه گیری اندیس پراکسید (AOAC ۱۹۹۰) و اسید تیو باربیتوریک (گلی و همکاران ۲۰۰۵) در روزهای ۰، ۲، ٤، ٦، ۸، ۱۰ و ۱۲ صورت گرفت.

آنالیز آماری

نتایج به دست آمده با استفاده از روش آنالیز واریانس (ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ($P<۰/۰۵$) صورت گرفت. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SAS صورت گرفت.

نتایج و بحث

تأثیر واریته و حلال بر میزان ترکیبات فنولی

توضیح عبارات اختصاری و میزان ترکیبات فنولی عصاره ها به ترتیب در جدول ۱ و۲ ارائه شده است. با توجه به نتایج تجزیه واریانس اثر واریته، حلال و اثر متقابل این دو فاکتور بر میزان ترکیبات فنولی در سطح ۵ درصد معنی دار بود. در مورد تأثیر واریته ها به استثنای عصاره های متانولی، واریته روغنی ترکیبات فنولی بیشتری را نسبت به واریته کرونایکی استخراج کرد. در بین حلال ها، بیشترین و کمترین میزان استخراج به ترتیب مربوط به عصاره های متانولی و عصاره های استونی بود (جدول ۱) و به طور کلی بیشترین (۰/۳۳± ۱۹٦/٦ میلی گرم معادل اسید تانیک در گرم عصاره) و کمترین (۰/۵۵± ٦٥۱/ ۱۰۵ میلی گرم معادل اسید تانیک در گرم عصاره) میزان ترکیبات فنولی به ترتیب در عصاره متانولی و استونی کرونایکی مشاهده شد.

---

[1] 2,2'-diphenyl-1-picryl hydrazyl

جدول ۱– تعریف عبارات اختصاری.

CM	عصاره متانولی واریته کرونایکی
RM	عصاره متانولی واریته روغنی
CW	عصاره آبی واریته کرونایکی
RW	عصاره آبی واریته روغنی
CA	عصاره استونی واریته کرونایکی
RA	عصاره استونی واریته روغنی

میزان ترکیبات فنولی عصاره متانولی برگ های زیتون واریته های پرتغالی ۴۰/۱- ۱۱/۷ میلی گرم معادل اسید تانیک در هر گرم برگ گزارش شده است (سیلوا و همکاران ۲۰۰۶). به علاوه آلتیوک و همکاران (۲۰۰۸) میزان ترکیبات فنولی عصاره های آبی برگ های زیتون ترکیه را ۳/۴ میلی گرم معادل اسید تانیک در گرم برگ عنوان کردند.

استفاده از آب برای استخراج، یک محیط کاملاً قطبی ایجاد می‌کند. در نتیجه برخی از ترکیبات فنولی با درجه قطبیت پائین کمتر استخراج می‌شوند. علاوه بر این عصاره‌های آبی حاوی ناخالصی‌هایی نظیر اسیدهای آلی، پروتئین‌ها و قندهای محلول می باشند (چرینوس و همکاران ۲۰۰۷) اما اتانول و متانول همراه با آب توانائی بیشتری در استخراج ترکیبات فنولی دارند (سوزوکی و همکاران ۲۰۰۲). با توجه به این موارد، علت میزان بالای استخراج ترکیبات فنولی در عصاره‌های متانولی نسبت به آب توجیه می‌شود. از طرفی چون استون یک حلال غیرقطبی می‌باشد، برای استخراج ترکیبات قطبی از جمله فنول‌ها مناسب نبود.

در استخراج ترکیبات فنولی عصاره‌های کاکل ذرت (محسن و آمار ۲۰۰۹) و برگ های چای (جان و همکاران ۲۰۰۶) نتایج مشابهی گزارش شده است.

جدول ۲- میزان ترکیبات فنولی عصاره ها (میلی گرم معادل اسید تانیک در گرم عصاره).

عصاره ها	میزان ترکیبات فنولی
CM	۱۹۶/۶۰ ±۰/۳۳ [a]
RM	۱۸۸/۸۳ ±۰/۲۶ [b]
CW	۱۶۲/۸۸ ±۰/۳۵ [d]
RW	۱۶۵/۷۹ ±۰/۳۵ [c]
CA	۱۰۵/۶۵ ±۰/۵۵ [f]
RA	۱۲۴/۴۱ ±۰/۷۶ [e]

حرف مشابه نشانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد.

آزمون DPPH

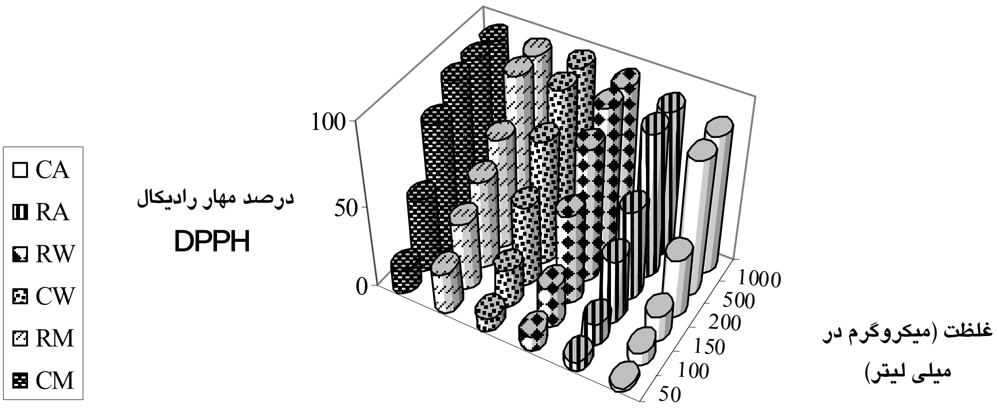
جدول ۳، IC_{50} عصاره‌ها در آزمون های مختلف بر حسب میکروگرم در میلی لیتر را نشان می‌دهد. IC_{50} بیانگر غلظتی از عصاره است که برای مهار ۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد DPPH مورد نیاز می‌باشد. IC_{50} کمتر نشان‌دهنده قدرت آنتی‌اکسیدانی بالای عصاره مربوطه می‌باشد. عصاره متانولی واریته کرونایکی با IC_{50} برابر با ۱۰۶/۰۶۵ ±۰/۵۵ میکروگرم در میلی لیتر بهترین عصاره در مهار این رادیکال بود اما عصاره های آبی و استونی واریته روغنی نسبت به کرونایکی توانایی بیشتری در مهار رادیکال داشتند (جدول ۳).

جدول ۳- IC_{50} عصاره ها در آزمون های مختلف.

آنتی اکسیدان ها	مهار رادیکال DPPH	قدرت احیاکنندگی	ظرفیت آنتی اکسیدانی کل
CM	^{f}۱۰۶/۰۶۵ ±۰/۵۵	^{f}۲۵۸/۱۳۷ ±۰/۱۶	^{f}۲۰۵/۹ ±۰/۱۸
RM	^{e}۱۲۹/۳۶۴ ±۰/۸۲	^{e}۲۷۹/۲۸۵ ±۰/۲۵	^{e}۲۲۴/۲۶۶ ±۰/۳۲
CW	^{c}۱۴۹/۰۷۹ ±۰/۵۶	^{d}۳۱۷/۱۱۱ ±۱/۱۶	^{d}۳۷۵/۸۸۸ ±۰/۱۶
RW	^{d}۱۳۹/۶۳ ±۰/۵۴	^{c}۳۶۱/ ۰۰۰±۰/۴	^{d}۳۷۷/۱۳۳ ±۰/۱۳
CA	^{a}۲۷۷/۰۴۱ ±۰/۵۸	^{a}۶۰۸/۷۱۴ ±۰/۲۹	^{a}۶۱۵/۴۱۶ ±۱/۲۶۷
RA	^{b}۱۸۳/۲۱۷ ±۰/۰۴	^{b}۵۸۹/۳۷۵ ±۰/۷۲	^{b}۵۰۸/۶۱۱ ±۱/۲۱
BHA	^{g}۸۹/۰۵۸ ±۰/۳۸	^{g}۲۰۵/۵۴۹ ±۰/۶۵	^{c}۴۲۲/۳۰۷ ±۰/۵
BHT	^{h}۴۱/۶۰۲ ±۰/۴۲	^{h}۵۹/۱۵۴ ±۰/۱۹	^{g}۱۷۹/۴۳۲ ±۰/۱

حروف مشابه در هر ستون نشانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشند.

به طور کلی از نظر مهار رادیکال DPPH، عصاره‌های متانولی بیشترین و عصاره های استونی کمترین قدرت آنتی‌اکسیدانی را دارا بودند. علاوه بر این داده ها حاکی از افزایش قدرت مهار رادیکال DPPH همراه با افزایش غلظت بود (شکل ۱).



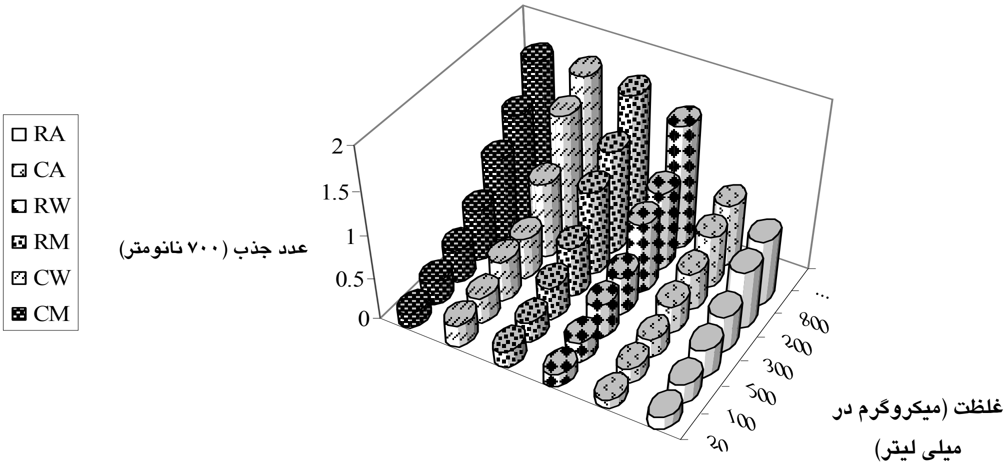
شکل ۱- اثر غلظت های مختلف عصاره‌ها بر میزان مهار رادیکال DPPH.

در مقایسه با آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی همه عصاره‌های مورد آزمون، IC_{50} بیشتری نسبت به BHT (۰/۴۲± ۴۱/۶۰۲ میکروگرم در میلی لیتر) و BHA (۰/۳۸± ۸۹/۰۵۸ میکروگرم در میلی لیتر) داشتند. در پژوهش بوعزیز و صیادی (۲۰۰۵) IC_{50} عصاره هیدرولیزی، عصاره اتیل استات و عصاره متانولی واریته های تونسی برگ زیتون به ترتیب برابر با ۰/۶۵، ۱/۲۵ و ۱/۵۷ میکروگرم در هر میلی لیتر گزارش شد که با داده های این پژوهش متفاوت است. دلیل این اختلاف را می توان به تفاوت در نوع واریته و ترکیبات فنولی، شرایط اقلیمی و... نسبت داد.

نیروی احیا کنندگی

در این آزمون، منظور از IC_{50} غلظتی است که جذب عصاره به نیم برسد. با توجه به داده‌های جدول ۳، بالاترین قدرت احیاکنندگی مربوط به عصاره متانولی کرونایکی (۰/۱۶± ۲۵۸/۱۳۷ میکروگرم در میلی لیتر) بود. در بین عصاره‌های آبی، واریته کرونایکی (۱/۱۶± ۳۱۷/۱۱۱ میکروگرم در میلی لیتر) و در بین عصاره‌های استونی، واریته روغنی (۰/۲۹± ۶۰۸/۷۱۴ میکروگرم در میلی لیتر) فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به سایر عصاره‌ها نشان دادند. شکل ۲، نشان دهنده وجود رابطه

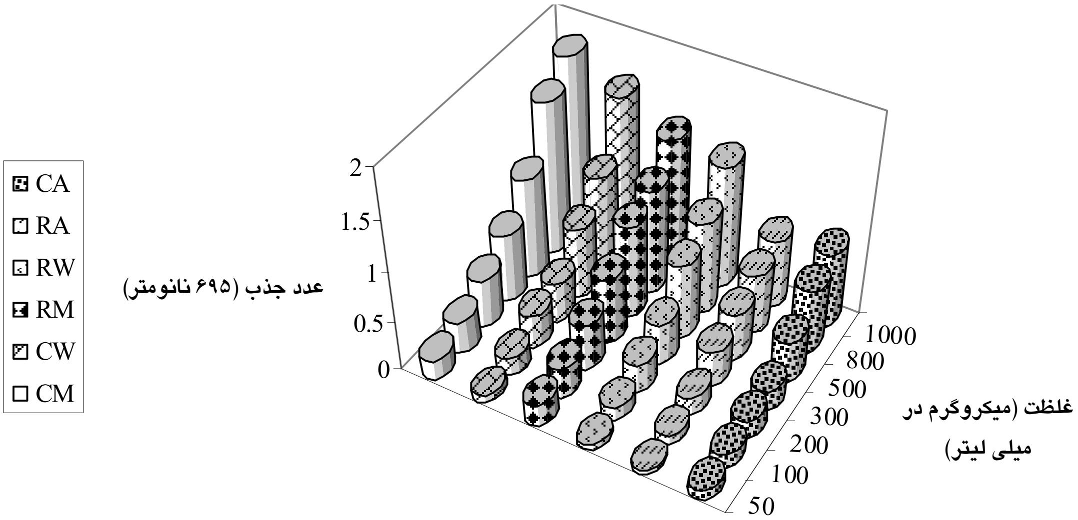
مستقیم بین افزایش غلظت عصاره و فعالیت آنتی-اکسیدانی است. همچنین همه عصاره‌ها، IC_{50} بیشتری نسبت به BHT (۰/۱۹± ۵۹/۱۵٤ میکروگرم در میلی لیتر) و BHA (۰/٦٥± ۲۰۵/٥٤۹ میکروگرم در میلی لیتر) داشتند.



شکل ۴- اثر غلظت های مختلف عصاره‌ها بر نیروی احیاکنندگی.

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل

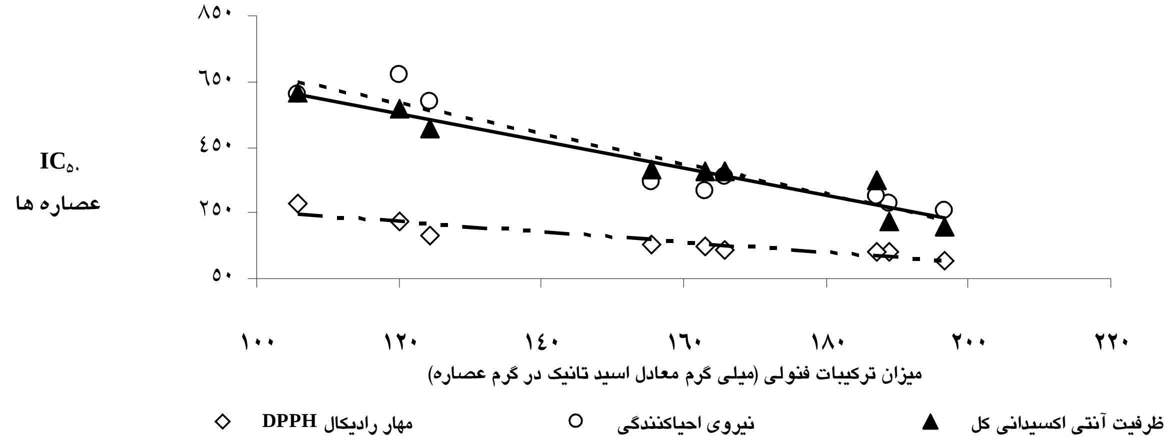
در این آزمون هم، IC_{50} بیانگر غلظتی است که میزان جذب به عدد نیم برسد. با توجه به اطلاعات جدول ۳، بیشترین و کمترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به ترتیب مربوط به عصاره متانولی (۰/۱۸± ۲۰۵/۹ میکروگرم در میلی لیتر) و عصاره استونی واریته کرونایکی (۱/۲٦۷± ٦۱٥/٤۱٦ میکروگرم در میلی لیتر) بود. همچنین، عصاره استونی واریته روغنی در مقایسه با کرونایکی فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری نشان داد. در این آزمون هم قدرت آنتی‌اکسیدانی وابسته به غلظت عصاره ها بود (شکل ۳).



شکل ۳- اثر غلظت های مختلف عصاره‌ها بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل.

در مقایسه با آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی، به استثنای عصاره‌های استونی، سایر عصاره ها فعالیت آنتی-اکسیدانی بیشتری نسبت به BHA داشتند اما هیچ یک از عصاره ها قابل رقابت با BHT نبودند.

رابطه بین میزان ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی-اکسیدانی هر سه روش مورد آزمون در شکل ٤ و جدول ٤ نشان داده شده است. در هر سه مورد رابطه خطی منفی بین IC_{50} و ترکیبات فنولی وجود داشت به این معنا که هر چه میزان ترکیبات فنولی کمترباشد، IC_{50} افزایش و در نتیجه فعالیت آنتی‌اکسیدانی کاهش می یابد.



شکل ۴- ارتباط بین IC_{50} و میزان ترکیبات فنولی عصاره ها در آزمون های مختلف.

با توجه به معادلات ارائه شده در جدول ٤، ٨٧ درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی در مهار رادیکال DPPH، ٨٩ درصد نیروی احیا کنندگی و ٩٤ درصد ظرفیت آنتی-اکسیدانی کل مربوط به ترکیبات فنولی بود. سیلوا و همکاران (٢٠٠٦) نیز گزارش کردند به استثای هسته در بقیه موارد، ارتباط خطی بین میزان ترکیبات فنولی و فعالیت‌آنتی اکسیدانی بخش‌های مختلف درخت زیتون وجود دارد. وجود این ارتباط توسط کاتسوب و همکاران (٢٠٠٤) و دجریدان و همکاران (٢٠٠٦) نیز به اثبات رسیده است.

جدول ۴– معادلات خط مربوط به ارتباط بین میزان ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ها.

نوع آزمون	(R^2)	معادله خط
مهار رادیکال DPPH	٠/٨٧٨١	y = −١/٥٣٣٥x+٤٠٥/٨٢
نیروی احیاکنندگی	٠/٨٩١٢	y = −٤/٦٠٣٣x+١١٣٣/٦
ظرفیت آنتی اکسیدانی کل	٠/٩٤٠٧	y = −٤/١٦١٣x+١٠٥١/٢

همانطور که مشاهده شد، عصاره های استخراج شده با حلال های قطبی نسبت به استون قدرت آنتی اکسیدانی و بازده استخراج بالاتری داشتند. آیکبال و بنجر (٢٠٠٧) عنوان کردند عصاره متانولی سیر بالاترین فعالیت آنتی-اکسیدانی و بازده استخراج را نسبت به حلال های دیگر(اتانول، استون، اتیل استات، n- هگزان) داشت که در تطابق با نتایج این پژوهش می باشد. با وجودیکه افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی به حضور آنتی اکسیدان ها به ویژه ترکیبات فنولی نسبت داده می شود (چو و همکاران ٢٠٠٢) اما میزان فعالیت آنتی اکسیدانی بسته به ساختمان شیمیائی این ترکیبات متفاوت است. علاوه بر این در طی فرآیند استخراج ترکیبات دیگری نظیر اسید اسکوربیک، اسیدهای آمینه، پروتئین‌ها و قندها که خود اهداء کننده‌ی الکترون می‌باشند، همراه با ترکیبات فنولی

وارد عصاره می‌شوند. بنابراین مشخص شد ۱۳ درصد مهار رادیکال DPPH، ۱۱ درصد قدرت احیاکنندگی و ٦ درصد ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل مربوط به سایر آنتی-اکسیدان ها و برهم کنش بین این ترکیبات بود.

علاوه بر موارد ذکر شده، مقدار ترکیبات فنولی بافت های گیاهی تحت تاثیر فاکتورهای ژنتیکی، میزان تابش نور خورشید، شرایط خاک، شرایط محیطی و آب و هوائی، عملیات پس از برداشت و شرایط نگهداری می باشد (فالر و فیالهو ۲۰۰۹). اختلاف در نوع این ترکیبات نیز یکی دیگر از عوامل وجود اختلاف معنی‌دار از نظر میزان ترکیبات فنولی، در بین واریته‌های مورد آزمون می‌باشد (تو وهمکاران، ۲۰۱۰).

از طرفی، فعالیت آنتی اکسیدانی مواد فیتوشیمایی گیاهان به واسطه جلوگیری از تشکیل یا خنثی سازی و مهار رادیکال های آزاد، احیا کردن این ترکیبات، شلاته کردن فلزات و ... می باشد (آمیک و همکاران ۲۰۰۳). نحوه آماده سازی، شرایط واکنش، نوع سوبسترا و آزمون و بسیاری از فاکتورها از دیگر دلایل اختلاف نتایج تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی با روش های مختلف می باشند (کولایلی و همکاران ۲۰۰۳). اختلاف نتایج بین واریته ها و روش های مختلف سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی در مورد دارچین (پراسد و همکاران ۲۰۰۹) و چای (ترکمن و همکاران ۲۰۰٦) نیز گزارش شده است. در مورد دارچین بیشترین میزان ترکیبات فنولی مربوط به عصاره‌های واریته بورمانی بود اما از نظر مهار رادیکال DPPH، قدرت احیاکنندگی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل، واریته زیکانیکا بهترین عصاره معرفی شد. همچنین توانایی به دام اندازی رادیکال DPPH توسط عصاره حاصل از استون ۵۰ درصد واریته بلک و عصاره اتانول ۵۰ درصد واریته بلک میت بیشتر از بقیه عصاره‌ها بود.

اثر عصاره متانولی واریته کرونایکی بر پایداری اکسایشی روغن آفتابگردان

همان طور که ملاحظه شد، عصاره متانولی واریته کرونایکی بیشترین میزان ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی-اکسیدانی را داشت. به این دلیل، در ادامه تأثیر این عصاره در پایش اکسایش روغن آفتابگردان بررسی شد.

مقادیر به کار رفته بعد از عبارت اختصاری نیزبیانگر غلظت عصاره در روغن می باشد.

اندیس پراکسید

بررسی نتایج آنالیز واریانس و نیز مقایسه میانگین نشان داد که اثر تیمار و زمان بر اندیس پراکسید در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار می‌باشد. جدول ۵ میانگین کلی اعداد پراکسید و اسید تیوباربیتوریک در طی شش روز اندازه گیری را نشان می‌دهد. با توجه به داده های این جدول، کمترین و بیشترین اندیس پراکسید به ترتیب مربوط به CM -۱۰۰۰ (۸۳/٤۲۸ میلی اکی والان در کیلوگرم روغن) و نمونه شاهد (۱۷۱/۸۱ میلی اکی والان در کیلوگرم روغن) بود. غلظت های بالای عصاره در پایش اندیس پراکسید موفق تر عمل کردند.CM -۲۰۰، قابل رقابت با هیچ یک از آنتی-اکسیدان‌های سنتزی نبود در حالیکه CM -۱۰۰۰ توانست جایگزین BHA وBHT در هر دو سطح مورد بررسی شود. در مورد CM -۵۰۰ به استثنای BHT-۲۰۰ اندیس پراکسید پایین تری نسبت به آنتی‌اکسیدان های سنتزی مشاهده شد.

اندیس اسید تیوباربیتوریک

بررسی نتایج آنالیز واریانس و نیز مقایسه میانگین تیمارهای مختلف نشان داد که اثر تیمار و زمان بر اندیس اسید تیوباربیتوریک در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار می‌باشد. طبق داده‌های جدول ۵، بالاترین میزان اندیس اسید تیوباربیتوریک (۲۳٤/ ۰ میلی گرم مالون آلدئید در کیلوگرم روغن)، در نمونه شاهد مشاهده شد در حالیکه کمترین اندیس اسید تیوباربیتوریک (۰/۱۳۵ میلی گرم مالون آلدئید در کیلوگرم روغن) مربوط به CM -۱۰۰۰ بود. CM -۱۰۰۰ با هر دو سطح آنتی-اکسیدان های سنتزی مورد آزمون، CM -۲۰۰ با BHA

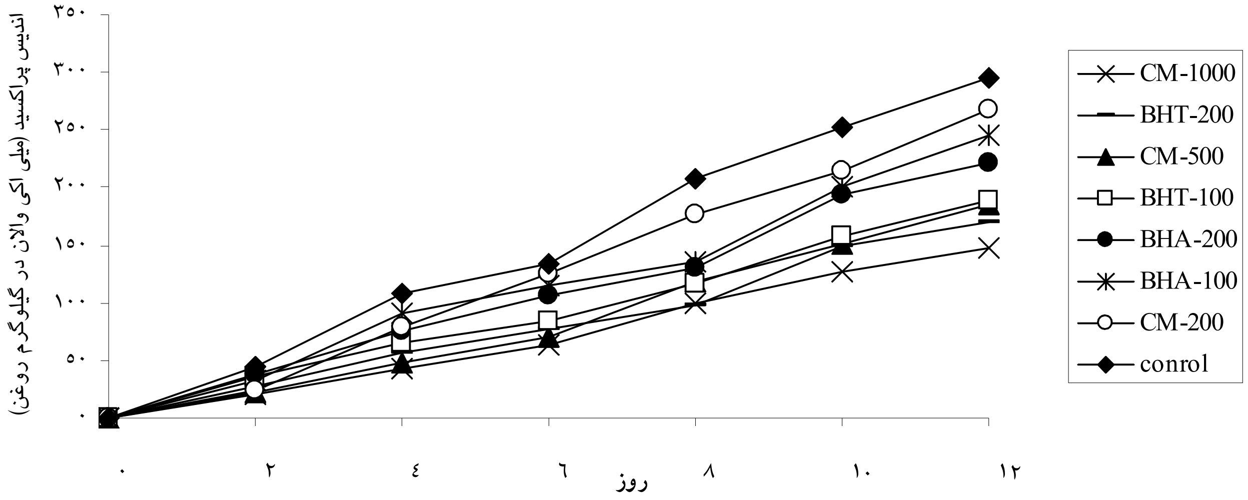
و BHT در سطح ۱۰۰ پی پی ام و ۵۰۰- CM به استثنای ۲۰۰-BHT با دیگر موارد قابل رقابت بود.

جدول ۵- میانگین اندیس پراکسید و اسید تیوباربیتوریک تیمارهای مختلف.

تیمار ها	اندیس پراکسید	اندیس اسید تیوباربیتوریک
نمونه کنترل	۱۷۱/۸۱[a]	۰/۲۳۴[a]
۲۰۰- CM	۱۴۷/۷۴[b]	۰/۱۵۶[d]
۵۰۰- CM	۹۸/۹۸۶[f]	۰/۱۴۴[f]
۱۰۰۰- CM	۸۳/۴۲۸[h]	۰/۱۳۵[h]
BHA-۱۰۰	۱۳۶/۷۱[c]	۰/۱۸۲[b]
BHA-۲۰۰	۱۲۷/۵[d]	۰/۱۵۴[e]
BHT-۱۰۰	۱۰۸/۳۴[e]	۰/۱۵۷[c]
BHT-۲۰۰	۹۶/۱۴۸[g]	۰/۱۴[g]

حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد.

با افزایش زمان نگهداری نمونه‌های روغن در شرایط اکسایش، میزان اندیس پراکسید و اندیس اسید تیوباربیتوریک افزایش و در نتیجه فعالیت آنتی‌اکسیدانی کاهش یافت (شکل ۵ و ۶).



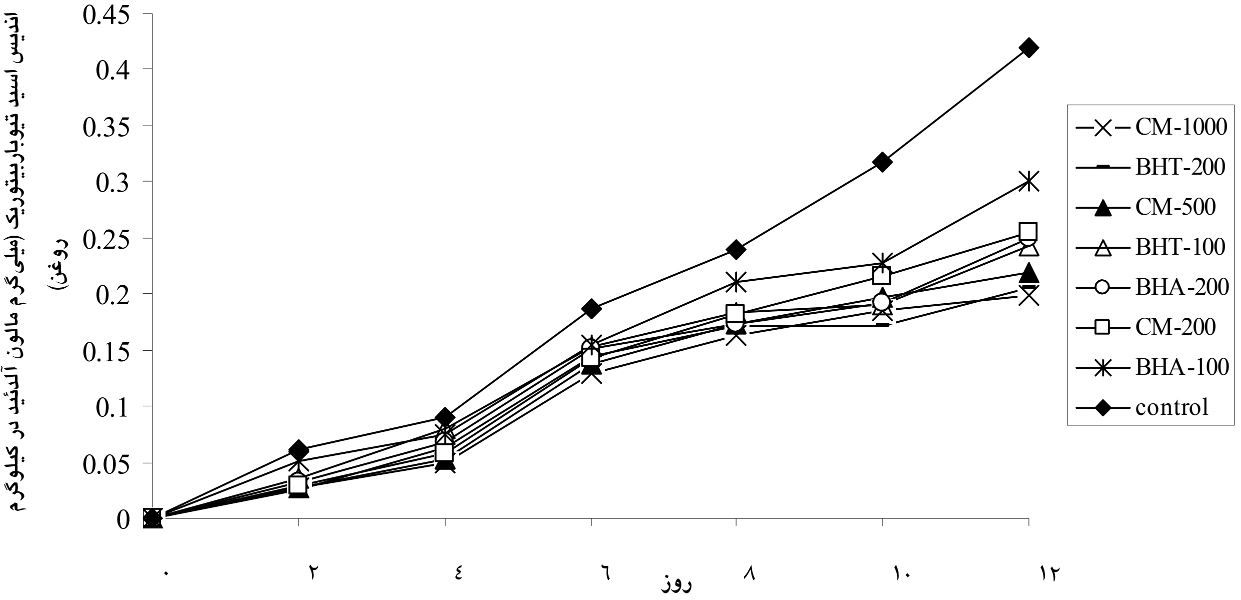
شکل ۵- اندیس پراکسید تیمارها در روزهای مختلف اندازه گیری.

در روزهای ابتدایی فعالیت آنتی‌اکسیدانی غلظت های مختلف عصاره، تفاوت زیادی با هم نداشت اما در روز های آخر این تفاوت افزایش یافته و عصاره در غلظت ۲۰۰ نسبت به ۱۰۰۰ کاهش بیشتری در فعالیت آنتی-اکسیدانی نشان داد (شکل ۵ و ٦). به دلیل اینکه مالون آلدئید از محصولات ثانویه اکسایش بوده و از تجزیه محصولات اولیه از جمله پراکسیدها به دست می‌آید، عکس اندیس پراکسید با سرعت کمتری افزایش یافت و این افزایش در روزهای پایانی بیشتر مشهود بود. اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها در مورد اندیس پراکسید و اسید تیوباربیتوریک در تمام روزها مشابه یکدیگر نبود. دلیل این امر این است که یکسری از ترکیبات آنتی-اکسیدانی از شروع واکنش اکسایش و تشکیل پراکسید جلوگیری می‌کنند اما بعضی دیگر، تجزیه پراکسید ها و تشکیل محصولات ثانویه را به تعویق می اندازند. بوعزیز و همکاران (۲۰۰۸) نیز گزارش کردند که بعد از

۶ مـاه ذخیـره سـازی روغـن زیتـون در ۵۰ درجـه سانتیگراد، عدد پراکسید نمونه کنترل و نمونه تیمار شده با ۴۰۰ پی پی ام عصاره متانولی برگ زیتون بـه ترتیب از ۱۵/۹ بـه ۸۲۰ و ۶۳۰ میلـی اکـی والان در کیلـوگرم روغن رسید.

دادههای پژوهش فـاراگ و همکـاران (۲۰۰۵)، بیـانگر کاهش اندیس پراکسید روغن آفتـا بگـردان از ۴۳ بـه ۳۳ میلی اکی والان گرم در کیلوگرم روغـن و انـدیس اسـید تیوباربیتوریک از ۲/۳ به ۰/۸ میلی گرم مالون آلدئیـد در کیلوگرم روغن در حضور ۸۰۰ پی پـی ام عصـاره بـرگ زیتون بود.

در مورد سایر گیاهان نیز نتایج مشابهی مشـاهده شـده است. عماد (۲۰۰۶) گزارش کرد عصاره پوست انگور به دلیل وجود ترکیبات فنولی بیشتر اثرات آنتـی اکسـیدانی بهتری نسبت به عصاره دانه در روغن آفتابگردان نشـان داد. همچنین مشخص شـد کـه فعالیـت آنتـی اکسـیدانی عصاره ی سیر بر پایداری روغن آفتـابگردان در غلظـت ۱۰۰۰ پی پی ام در مقایسه بـا BHA و BHT در غلظـت ۲۰۰ پی پی ام بیشتر بود (شهید و بنگر ۲۰۰۷).



شکل ۵- اندیس اسید تیوباربیتوریک تیمارها در روزهای مختلف اندازه گیری.

سینگ و همکاران (۲۰۰۷) اثرات آنتی اکسـیدانی اسـانس برگ دارچین را در رونـد اکسیداسـیون روغـن خـردل و تشکیل پراکسید و تیوباربیتوریـک اسـید مـورد بررسـی قرار دادند و نتایج حاکی از آن بود که اسـانس در سـطح غلظتی ۰/۰۲ درصد اثرات قوی تـری نسـبت بـه پروپیـل گالات دارد. در پژوهش دیگری که توسـط شهسـواری و همکاران (۲۰۰۸) انجـام گرفـت، فعالیـت آنتـی اکسـیدانی اسـانس *Zataria multiflora* را در روغن سویای خام، با کنترل دو عدد پراکسـید و تیوباربیتوریـک اسـید بررسـی شد. نتایج نشان داد که این اسانس در سطح غلظتـی ۰/۱ درصد دارای اثر آنتی اکسیدانی معـادل BHA در غلظـت ۰/۰۲ می باشد.

نتیجه گیری کلی

در بین واریتهها، واریته روغنـی و در بـین حـلالهـا، متانول بیشترین میزان استخراج ترکیبات فنولی بـه خـود اختصـاص دادنـد. در بررسـی فعالیـت آنتـیاکسـیدانی کمتـرین IC_{50} در آزمـون DPPH، نیـروی احیاکننـدگی و ظرفیت آنتیاکسـیدانی کـل مربـوط بـه عصـاره متـانولی واریته کرونایکی بود. نتایج داده های پایداری اکسایشـی در حضور عصاره متانولی کرونـایکی نشـان داد انـدیس

پراکسید و اسید تیوباربیتوریک با افزایش زمان نگهداری نمونه ها در شرایط اکسایش و همچنین با کاهش غلظت عصاره‌ها افزایش یافت. در بین عصاره‌ها، شاهد بیشترین اثر آنتی‌اکسیدانی در در سطح ۱۰۰۰ پی پی ام بودیم و این عصاره قابل رقابت با BHA و BHT در هر دو سطح مورد آزمون بود. بنابراین می تواند جایگزین این ترکیبات در روغن های خوراکی شود.

منابع مورد استفاده

Altiok E, Baycin D, Bayraktar O and Ulku S, 2008. Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea* L.) by adsorption on silk fibroin. Sepration and Purification Tecnology 62: 342- 348.

Amic D, Davidovic-Amic D, Beslo D, Trinajstic N, 2003. Structure– radical scavenging activity relationship of flavonoids. Croatia Chemistry Acta 76: 55-61.

Antolovich M, Bedgood DJR, Bishop A, Jardine D, Prenzler P and Robards K, 2004. LC–MS investigation of oxidation products of phenolic compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52: 962–971.

AOAC, 1990. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists, 15th ed. Washington, DC, USA.

Arabshahi S and Urooj A, 2007. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. Food Chemistry 102: 1233-1240.

Atawodi SE, 2005. Antioxidant potential of African medicinal plants. African Journal of Biotechnology 4: 128 -133.

Bouaziz M and Sayadi S, 2005 Isolation and evaluation of antioxidants from leaves of a Tunisian cultivar olive tree. European Journal of Lipid Science and Technology 107: 497–504.

Bouaziz M, Fki I, Jemai H, Ayadi M and Sayadi S, 2008. Effect of storage on refined and husk olive oils composition:stablization by addition of natural antioxidants from *Chemlali* olive leaves. Journal of Food Chemistry 108: 253-262.

Chirinos R, Rogez H, Campos D, Pedreschi R and Larondelle Y, 2007. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (Tropaeolum tuberosum Ruız & Pavon) tubers. Separation and Purification Technology 55: 217–225.

Chu Y, Sun J, Wu X and Liu R, 2002. Antioxidant and antiproliferative activity of common vegetable. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50: 6910–6916.

Djeridane A, Yousif M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P and Vidal N, 2006. Antioxidant activity of some Algerian medical plants extracts containing phenolic copmounds. Food Chemistry 97: 654-660.

Emad S, 2006. Antioxidant effect of extracts from red grape seed and peel on lipid oxidation in oils of sunflower. LWT-Food Science and Technology 39: 883-92.

Eskin NAM and Przybylski R. 2001. Antioxidants and shelf life of foods. In: Food shelf life stability: chemical, biochemical, and microbiological changes. Eds. DS. Robinson and NAM Eskin. CRC Press.

Faller ALK and Fialho E, 2009. The antioxidant capacity and polyphenol content of organic and conventional retail vegetables after domestic cooking. Food Research International 42: 210-215.

Farag RS, Mahmoud EA and Basuny AM, 2007. Use crude olive leaf juice as a natural antioxidant for the stability of sunflower oil during heating. International Journal of Food Science and Technology 42: 107-115.

Goli AH, Barzegar M and Sahari MA, 2005. Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. Food Chemistry 92: 521–525.

Guinda A, 2006. Use of solid residue from the olive industry. Grasas Y Aceites 57: 107-115.

Iqbal S and Bhanger MI, 2007. Stabilization of sunflower oil by garlic extract during accelerated storage. Food Chemistry 100: 246–254.

John KMM, Vijayan D, Kumar RR and Premkumar R, 2006. Factors influencing the efficiency of extraction of polyphenols from young tea leaves Asian Journal of Plant Sicences 5: 123-126.

Katsub T, Tabata H, Ohta Y, Yamasaka Y, Anuurad E and Shiwaku K, 2004. Screening for antioxidant activity in edible plant products: Comparison of low – density lipoprotein oxidation assay, DPHH radical scavenging assay, and Foline – Ciocalteu assay. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52:2391–2396.

Kolayli S, Kucuk M, Duran C, Candan F and Dincer F, 2003. Chemical and antioxidant properties of *Laucerasus officinalis* Roem. (Cherry Laurel) fruit grown in Black sea region. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51: 7489-7494.

Lujan RJ, Rodriguez JML and Castro MDL, 2006. Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. Journal of Chromatography A 1108: 76-82.

Mohamed R, Pineda M and Aguilar M, 2007. Antioxidant capacity of extracts From wild and crop plants of mediterranean region. Journal of Food Science 72: 59-63.

Mohsen SM and Ammar ASM, 2009. Total phenolic contents and antioxidant activity of corn tassel extracts. Food Chemistry 112: 595–598.

Prasad KN, Yang B, Dong X, Jiang G, Zhang H, Xie H and Jiang Y, 2009. Flavonoid contents and antioxidant activities from Cinnamomum species. Innovative Food Science and Emerging Technologies 10: 627–632.

Prieto P, Pineda M and Aguilar M, 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. Analytical Biochemistry 269: 337–341.

Salta FN, Mylona A, Chiou A, Boskou G and Andrikopoulos NK, 2009. Oxidative stability of edible vegetable oils enriched in polyphenols with olive leaf extract. Food Science and Technology International 13: 413- 421.

Shahid I and Bhanger M, 2007. Stabilization of sunflower oil by garlic extract during accelerated storage. Food Chemistry 100: 246 - 54.

Shahsavari N, Barzegar M, Sahari MA and Naghdibadi H, 2008. Antioxidant activity and chemical characterization of essential oil of *Bunium persicum*. Plant Foods Human Nutrition 63: 183-88.

Silva S, Gomes, L, Leitão F, Coelho AV and Boas LV, 2006. Phenolic compounds and antioxidant activity of *olea europaea* l. fruits and leaves. Food Science and Technology International 12: 385–396.

Singh G, Maurya S and Delampasona MP, 2007. A comparison of chemical antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. Food and Chemical Toxicology 45: 1650-1661.

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. Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi 49: 507-511.

Thoo YY, Ho SK, Liang JY, Ho CW and Tan CP, 2010. Effects of binary solvent extraction system, extraction time and extraction temperature on phenolic antioxidants and antioxidant capacity from mengkudu (Morinda citrifolia). Food Chemistry 120: 290–295.

Turkmen N, Sari F and Velioglu YS, 2006. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. Food Chemistry 99: 835–841.

Yildirim A, Mavi A, Oktay AA, Algur OF and Bilaloglu V, 2000. Comparison of antioxidant and antimicrobial activity of tilia (Tilia argenta Desf. Ex. D.C.), sage (Salvia triloba L.) and black tea (*Camellia sinensis* L.) extracts. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48: 5030-5034.

X Hou D, 2003. Potential mechanisms of cancer chemoprevention by anthocyanins. Current Molecular Medicine 3: 149–159.