مجله الکترونیک فرآوری و نگهداری مواد غذایی
جلد اول، شماره دوم، تابستان ۸۸
۱۰۲-۸۵
www.ejfpp.info

اثر عصاره برگ گیاه گزنه (*Urtica dioica*) در جلوگیری از اکسیداسیون روغن سویا

*مهدی قره‌خانی[۱]، محمد قربانی[۲]، محمدعلی ابراهیم‌زاده[۳]، سیدمهدی جعفری[۲] و علیرضا صادقی ماهونک[۲]

[۱]دانشجوی کارشناسی‌ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۲]استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۳]دانشیار گروه شیمی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی ساری

تاریخ دریافت: ۸۸/۸/۱۰ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۰/۳۰

چکیده

به‌منظور بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گزنه در روغن سویا، از روش غرقابی برای استخراج عصاره از گیاه گزنه استفاده شد. همچنین تأثیر سه حلال؛ آب، متانول ۸۰ درصد و کلروفرم بر میزان استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی، به دام‌اندازی رادیکال DPPH (۲ و ۲′- دی فنیل- ۱- پیکریل هیدرازیل) و به تأخیراندازی اکسیداسیون روغن سویا بررسی شد. عصاره آبی بیش‌ترین درصد بازده استخراج و عصاره کلروفرمی بیش‌ترین میزان استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی و کمترین میزان غلظت عصاره را برای پاک‌سازی ۵۰ درصد رادیکال‌های DPPH داشتند. سپس اثر هر سه عصاره آبی، متانولی و کلروفرمی گزنه در سه سطح غلظت (۲۰۰، ۵۰۰ و ۸۰۰ پی‌پی‌ام) در به تاخیر انداختن اکسیداسیون در روغن سویا با اثر آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی بوتیلید هیدروکسی آنیزول (BHA) و بوتیلید هیدروکسی تولوئن (BHT) در دو سطح (۱۰۰ و ۲۰۰ پی‌پی‌ام) از طریق تعیین عدد پراکسید و عدد اسید تیوباربیتوریک مورد مقایسه قرار گرفتند. نتایج این آزمایش نشان دادند که غلظت‌های بالایی از عصاره‌ها قادرند تا حد زیادی روند اکسیداسیون را کند نمایند. در بین تیمارها، غلظت ۸۰۰ پی‌پی‌ام عصاره کلروفرمی بیش‌ترین اثر آنتی‌اکسیدانی را داشت و با آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT قابل قیاس بوده و حتی بهتر از آنتی‌اکسیدان سنتزی BHA عمل نمود. به این ترتیب می‌توان برگ‌های گزنه را به‌عنوان منبعی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی معرفی نمود و این اثر را ناشی از حضور ترکیبات فنولی در برگ‌ها دانست.

واژه‌های کلیدی: گزنه، استخراج، آنتی‌اکسیدان، ترکیبات فنولی، روغن سویا

* مسئول مکاتبه: m.ghrekhani@yahoo.com

مقدمه

چربی‌ها و روغن‌ها ترکیبات غذایی با ارزشی هستند که علاوه‌بر تامین انرژی نقش مهمی در سلامت و ادامه حیات انسان داشته و در گروه مواد غذایی ضروری جای دارند. اکسیداسیون چربی‌ها و روغن‌ها طی فرآوری و نگهداری غذاها نه تنها باعث از دست رفتن کیفیت تغذیه‌ای و هضمی غذا می‌شود، بلکه ترکیباتی مانند رادیکال‌های آزاد تولید می‌کند که این ترکیبات منجر به واکنش‌های نامطلوب شیمیایی و احتمالاً بیولوژیکی می‌شوند. با توسعه علم بیوشیمی نقش مؤثر رادیکال‌های آزاد در خیلی از بیماری‌ها مشخص شده است و نقش رادیکال‌های آزاد و اکسیژن فعال در بیماری‌هایی مثل تصلب شرایین، سرطان و پیری زودرس مورد توجه است (احمدی و همکاران، ۲۰۰۷).

آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که با جذب رادیکال آزاد و در نتیجه ممانعت از اکسیداسیون، از فساد، تغییر رنگ و یا تند شدن چربی‌ها جلوگیری می‌کنند. به‌خصوص آنتی‌اکسیدان‌هایی که بنیان حلقوی فنولی حاوی گروه OH را دارا می‌باشند، نقش مهمی در جلوگیری از اکسیداسیون چربی‌ها دارند (فنما، ۱۹۹٦).

اخیراً عوارض نامطلوبی از مصرف آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی گزارش شده و در حیوانات آزمایشگاهی باعث سرطان‌زایی و آسیب کبدی شده‌اند (ابراهیم‌زاده و همکاران، ۲۰۰۸). اگرچه آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی در مقادیر کم استفاده می‌شوند ولی نیاز به انواع آنتی‌اکسیدان‌های بدون عوارض جانبی نیز احساس می‌شود زیرا که نمی‌توان عوارض ناشی از مصرف طولانی‌مدت این ترکیبات را در انسان نادیده گرفت. بنابراین جستجو برای جایگزینی آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی منجر به بررسی آنتی‌اکسیدان‌های متعددی از منابع گیاهی گردیده است. میوه‌ها، سبزی‌ها، گیاهان دارویی، آجیل‌ها، ادویه‌ها و پوست درختان به‌عنوان منابع بالقوه آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در نظر گرفته می‌شوند (مهدوی و همکاران، ۱۹۹۵). در سال‌های اخیر مطالعات بسیاری در جهت بررسی و استخراج آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی از گیاهان مختلف صورت گرفته است که می‌توان به استخراج ترکیبات فنولی از میخک و نعناع (شوبانا و همکاران، ۲۰۰۰)، گشنیز (ملو و همکاران، ۲۰۰۵)، برگ شاه‌توت (عربشاهی و اروج، ۲۰۰۷)، رزماری (ارکان و همکاران، ۲۰۰۸)، کرفس کوهی (احمدی و همکاران، ۲۰۰۷) و برگ‌های کاهو (لوراچ و همکاران، ۲۰۰۸) اشاره نمود.

یکی از گیاهانی که امکان بررسی و مطالعه بیشتر از نظر فعالیت آنتی‌اکسیدانی و میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی برای آن وجود دارد گیاه گزنه (*Urtica dioica*) است. برگ‌ها بخش دارویی این

گیاه را تشکیل می‌دهند. گزنه به‌صورت خوراکی به‌عنوان مدر، پایین‌آورنده قند خون و اسید اوریک و به‌صورت موضعی در درمان برخی از بیماری‌های پوست و مو از جمله اگزما، بیماری‌های التهابی و حتی در درمان ریزش مو مورد استفاده قرار می‌گیرد (فارماکوپه گیاهی ایران، ۲۰۰۲). در ایران این گیاه در نواحی مرطوب غالب نقاط ایران به‌ویژه مناطق شمالی و کرانه خزر و شمال‌غربی کشور می‌روید. در این مطالعه میزان ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی برگ‌های گزنه با حلال‌های مختلف بررسی گردید و اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های حاصله در به تاخیراندازی اکسیداسیون روغن سویا مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و شیمیایی: گیاه گزنه (*Urtica dioica*) از منطقه هزارپیچ واقع در گرگان در اردیبهشت‌ماه ۱۳۸۷ جمع‌آوری شد و سپس برگ‌های آن از ساقه‌ها جدا گردیدند و تحت شرایط طبیعی محیطی و با استفاده از جریان هوای خشک در سایه خشک گردیدند و با استفاده از دستگاه آسیاب با مش ٤٠ به پودر تبدیل شدند. نمونه‌های خشک شده تا زمان آزمایش (یک هفته بعد) در یخچال زیر صفر (۱۸- درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند. مواد شیمیایی مورد نیاز از شرکت مرک تهیه شدند.

روش استخراج غرقابی: در استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی از روش استخراج غرقابی استفاده شد. در این روش ۵۰ گرم پودر برگ خشک شده گزنه با نسبت ۱:٦ (حلال: ماده گیاهی) با هر یک از حلال‌های آب، متانول۸۰ درصد و کلروفرم به‌طور جداگانه در یک دکانتور و در دمای اتاق مخلوط گردید و پس از ٢٤ ساعت عصاره با استفاده از کاغذ صافی (واتمن شماره ٤٢) از مواد گیاهی جدا گردید. سپس حلال با استفاده از دستگاه تبخیرکننده چرخان از محلول عصاره جدا گردید و عصاره (ماده خشک) حاصله در یخچال با دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. مراحل ذکر شده برای هر یک از حلال‌ها به‌طور جداگانه انجام شدند.

محاسبه بازده استخراج: حلال موجود در عصاره حاصل از روش استخراج غرقابی توسط دستگاه تبخیر در خلا چرخشی تبخیر شد. با محاسبه وزن اولیه بالن و وزن نهایی آن که حاوی ماده خشک بر جای مانده است، مقدار کل ماده خشک استخراج شده در مرحله استخراج محاسبه شد و به‌صورت درصد (گرم به ۱۰۰ گرم نمونه خشک) بیان گردید.

اندازه‌گیری مقدار کل ترکیبات فنولی: مقدار کل ترکیبات فنولی موجود در عصاره این گیاه از طریق رنگ‌سنجی به روش فولین- سیوکالتو[1] مورد بررسی قرار گرفت. مطابق روش مک‌دونالد و همکاران (۲۰۰۱)، ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره استخراجی با ۵ میلی‌لیتر از معرف فولین- سیوکالتو (که با آب مقطر ۱۰ برابر رقیق شده بود) و ٤ میلی‌لیتر از محلول کربنات سدیم ۱ مولار به‌خوبی مخلوط شد. مخلوط به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. سپس مقدار جذب محلول توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷٦۵ نانومتر خوانده شد. مقدار کل ترکیبات فنولی با استفاده از معادله خط رسم شده بر مبنای اسید گالیک و به‌صورت میلی‌گرم در گرم عصاره (ماده خشک) بیان گردید.

اندازه‌گیری مقدار کل ترکیبات فلاونوئیدی: مقدار کل ترکیبات فلاونوئیدی هر عصاره از طریق روش رنگ‌سنجی ارزیابی شد. مطابق روش چانگ و همکاران (۲۰۰۲)، در یک لوله آزمایش ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره در ۱/۵ میلی‌لیتر متانول حل شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد و ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول پتاسیم استات ۱ مولار به آن اضافه شد. در نهایت ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر به آن‌ها اضافه گردید و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد و سپس جذب مخلوط حاصل در طول موج ٤۱۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتری خوانده شد. کوئرستین به‌عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد. مقدار فلاونوئید براساس میزان میلی‌گرم معادل کوئرستین در گرم عصاره (ماده خشک) گزارش گردید.

ارزیابی میزان توانایی به دام‌اندازی رادیکال دی‌پی‌پی‌اچ[2] (DPPH): مطابق روش کولوا و همکاران (۲۰۰۱)، در این آزمایش به ۱ میلی‌لیتر از عصاره استخراجی با سه حلال ذکر شده، ۱ میلی‌لیتر محلول متانولی ۰/۱ میلی‌مولار DPPH اضافه و مخلوط حاصل به‌خوبی تکان داده شد و به‌مدت ۱۵ دقیقه در مکان تاریک در دمای اتاق قرار گرفت. سپس جذب مخلوط توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در ۵۱۷ نانومتر در مقایسه با متانول به‌عنوان شاهد قرائت شد. آسکوربیک اسید و BHA و کوئرستین به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شدند و میزان IC_{50} به معنی غلظتی از هر عصاره که لازم است تا ۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد DPPH پاک‌سازی شوند، برای عصاره‌ها تعیین شد.

1- Folin-Ciocalteu
2- 1,1-Diphenyl-2-Picryl Hydrazyl Radical

اندازه‌گیری اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های استخراجی از گیاه گزنه برروی روغن سویا: عصاره‌های برگ خشک شده گزنه در حلال‌های آب (Wat)، متانول ۸۰ درصد (Met) و کلروفرم (Chl) در ۳ سطح غلظت (۲۰۰، ۵۰۰ و ۸۰۰ پی‌پی‌ام) و آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی (BHA و BHT) در ۲ سطح غلظت (۱۰۰ و ۲۰۰ پی‌پی‌ام) به روغن سویای بدون آنتی‌اکسیدان (دارای ۱۰۰ پی‌پی‌ام اسید سیتریک) در شیشه‌های تیره رنگ اضافه گردید و برای مدت معینی (۲۵ روز) در دمای ٦۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در فواصل زمانی روز صفر، چهارم، هشتم، دوازدهم، هجدهم و بیست و چهارم عدد پراکسید (AOAC، ۱۹۹۰) نمونه‌های روغن تعیین و روزهای صفر، پنجم، دهم، پانزدهم، بیستم و بیست و پنجم عدد اسید تیوباربیتوریک (سیدول و همکاران، ۱۹٥٤) مشخص گردید. روند افزایش پراکسید و اسید تیوباربیتوریک نشان‌دهنده کارآیی آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی و عصاره‌ها در به تأخیر انداختن اکسیداسیون است.

تجزیه و تحلیل آماری: در این پژوهش در روش غرقابی تأثیر حلال‌ها برروی مقدار ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و میزان IC_{50} برای رادیکال DPPH در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. در بخش مربوط به ارزیابی اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها در روغن سویا، بررسی اثر تیمارهای مختلف (عصاره‌های آبی، متانولی و کلروفرمی هر کدام در سه غلظت) در طی زمان (صفر تا ۲۵ روز) با استفاده از روش اندازه‌گیری‌های تکرار شده در زمان[1] و در سطح احتمال (P<۰/۰۵) انجام گرفت. نتایج به‌دست آمده با استفاده از روش آنالیز واریانس (ANOVA) در سطح احتمال (P<۰/۰۵) و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال (P<۰/۰۵) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. همه آنالیزها و آزمایش‌های سه بار تکرار شدند. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار SAS و رسم نمودارها با نرم‌افزار EXCEL صورت گرفت.

نتایج و بحث

در جدول ۱ میانگین بازده استخراج و مقادیر ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی عصاره‌های به‌دست آمده با روش غرقابی آورده شده است.

1- Repeated Measures

جدول ۱- مقایسه بازده استخراج و مقادیر ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی عصاره‌های به‌دست آمده با روش غرقابی.

تیمار	بازده استخراج (درصد)	ترکیبات فنولی (mg GAE/ g extract[1])	ترکیبات فلاونوئیدی (mg QE/ g extract[2])
عصاره آبی	۲۲/۸٦±۰/۳۳[a]	۳۱/۱۰±۱/۰٤[b]	۱۹/۵۵±۰/٦۱[b]
عصاره متانولی	۱۹/۹۹±۰/۳۱[b]	۲٤/۲۸±۰/۷٦[c]	۲٤/۱۲±۰/۸٤[b]
عصاره کلروفرمی	٤/۳۵±۰/۱۷[c]	٤۹/۰۸±۱/۳۱[a]	۲۱۲/۵۲±۹/۷۳[a]

حرف مشابه در هر ستون بیانگر نبود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.

نتایج آنالیز واریانس نشان دادند که اثر نوع حلال به‌کار رفته برروی بازده استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در سطح احتمال (P<۰/۰۵) مؤثر و معنی‌دار بوده است. در بین تیمارها، عصاره آبی و عصاره کلروفرمی بیش‌ترین و کم‌ترین میزان بازده استخراج را داشتند. از نظر میزان استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی، عصاره کلروفرمی بیش‌ترین مقدار را نسبت به سایر عصاره‌ها داشت. عصاره متانولی نیز میزان استخراج ترکیبات فنولی کمتری در مقایسه با دو عصاره دیگر داشت و از نظر میزان استخراج ترکیبات فلاونوئیدی با عصاره آبی از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری نداشت.

در بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی گیاه گزنه، گلچین و همکاران (۲۰۰٤)، تنها از حلال آب برای استخراج ترکیبات فنولی استفاده کردند. آن‌ها مقدار کل ترکیبات فنولی را ۲۵/۳ میکروگرم معادل پیروکاتکول به میلی‌گرم ماده خشک (عصاره) گزارش کردند. ماوی و همکاران (۲۰۰٤)، در بررسی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی گزنه، مقدار کل ترکیبات فنولی را در عصاره متانولی، ۲۱/۷ میلی‌گرم معادل اسید گالیک به گرم ماده خشک بیان کردند. مقادیر به‌دست آمده از نتایج این پژوهش از نظر میزان ترکیبات فنولی استخراجی با دو حلال آب و متانول تا حدی مشابه نتایج محققان بالا بوده است. اوزتورک و همکاران (۲۰۰۷)، از دو حلال متانول و کلروفرم برای بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی ریشه ریواس (*Rheum ribes*) استفاده کردند. در مطالعه آن‌ها عصاره کلروفرمی ریشه میزان ترکیبات فلاونوئیدی بیش‌تری را در مقایسه با عصاره متانولی (۱٤۵/۵۹ در برابر ۱٦/۲۳ میکروگرم معادل کوئرستین به میلی‌گرم عصاره) استخراج کرده بود. همچنین عصاره کلروفرمی ریشه فعالیت بهتری از استاندارد کوئرستین در سیستم بتاکاروتن- اسید لینولئیک برای جلوگیری از پراکسیداسیون لیپید نشان داد. نتایج بالا از نظر بالا بودن میزان استخراج ترکیبات فلاونوئیدی با حلال کلروفرم، نتیجه پژوهش حاضر را تأیید می‌کنند.

1- Mg Gallic Acid Equivalent/ G Extract
2- Mg Quercetin Equivalent/ G Extract

مدل به دام‌اندازی رادیکال پایدار DPPH به‌طور گسترده‌ای برای ارزیابی توانایی آنتی‌اکسیدان‌ها در یک دوره زمانی کوتاه در مقایسه با روش‌های دیگر مورد استفاده قرار گرفته است (سورس و همکاران، ۱۹۹۷). مقایسه میانگین میزان توانایی به دام‌اندازی رادیکال DPPH عصاره‌های حاصل از روش غرقابی در مقایسه با کنترل‌های استاندارد در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۲- مقایسه میزان توانایی به دام‌اندازی رادیکال DPPH عصاره‌های به‌دست آمده با روش غرقابی در مقایسه با کنترل‌های استاندارد.

تیمار	IC_{50}* رادیکال DPPH (µg/ml)
عصاره آبی	۱۵۹/۸۸±۱/۵۷[b]
عصاره متانولی	۱۹۹/۷۱±۱/۰۲[a]
عصاره کلروفرمی	۷۷/۵۳±۰/۹۹[c]
BHA	۵۳/۹۳±۰/۳۵[d]
کوئرستین	۵/۲۸±۰/۱۵[e]
اسید اسکوربیک	۵/۰۵±۰/۱۱[e]

* میزان IC_{50} به معنی غلظتی از عصاره که لازم است تا ۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد DPPH پاک‌سازی شوند.
حرف مشابه در ستون بیانگر نبود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.

نتایج آنالیز واریانس و نیز مقایسه میانگین مقدار IC_{50} تیمارهای مختلف نشان می‌دهد که عصاره آبی، متانولی و کلروفرمی در مقایسه با یکدیگر و با کنترل‌های استاندارد تفاوت معنی‌داری داشتند ($P<۰/۰۵$). اسیداسکوربیک و کوئرستین بیش‌ترین توانایی را در به دام‌اندازی رادیکال DPPH در مقایسه با سایر تیمارها نشان دادند. همچنین در مقایسه بین عصاره‌ها، عصاره کلروفرمی کمترین IC_{50} و در نتیجه بیش‌ترین توانایی را در به دام‌اندازی رادیکال DPPH نسبت به عصاره آبی و متانولی داشت. عصاره متانولی بیش‌ترین IC_{50} و کم‌ترین توانایی را در به دام‌اندازی رادیکال DPPH در بین تیمارها داشت ($P<۰/۰۵$). همبستگی بالایی بین توانایی به دام‌اندازی رادیکال آزاد و مقدار ترکیبات فنولی برای غلات (پترسون و همکاران، ۲۰۰۱)، میوه‌جات (جئو و همکاران، ۲۰۰۰؛ جیمنز و همکاران، ۲۰۰۱)، سبزیجات (زنگ و وانگ، ۲۰۰۱) و نوشیدنی‌ها (فاگلیانو و همکاران، ۱۹۹۹) گزارش شده است.

به‌منظور بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های استخراجی گیاه گزنه در به تاخیر انداختن اکسیداسیون روغن سویا، عدد پراکسید روغن‌ها در روزهای صفر، چهارم، هشتم، دوازدهم، هجدهم و بیست و چهارم به روش AOAC (۱۹۹۰) اندازه‌گیری شد. بررسی نتایج آنالیز واریانس و نیز مقایسه میانگین اعداد پراکسید تیمارهای مختلف نشان داد که اثر تیمار و زمان برروی عدد پراکسید در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار می‌باشد (P<۰/۰۵). جدول ۳ مقایسه میانگین‌های اعداد پراکسید را در مجموع روزهای ٤، ۸، ۱۲، ۱۸ و ۲٤ نشان می‌دهد.

جدول ۳- مقایسه میانگین‌های اعداد پراکسید به‌دست آمده از تیمارهای انجام شده (عصاره‌های آبی، متانولی، کلروفرمی، BHA و BHT) برروی روغن سویا.

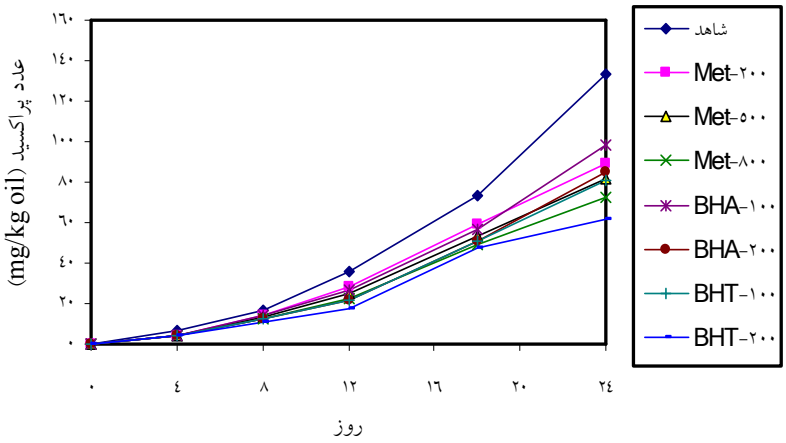
تیمارها	میانگین* اعداد پراکسید	حروف دانکن
شاهد	۵۳/۱۲	a
Wat -۲۰۰	۳۷/٤٤	d
Wat -۵۰۰	۳۳/٤۰	g
Wat -۸۰۰	۳۰/۱٤	i
Met -۲۰۰	۳۹/۱٦	c
Met -۵۰۰	۳۵/٦۰	e
Met -۸۰۰	۳۲/۱۹	h
Chl -۲۰۰	۳۵/۷۸	e
Chl -۵۰۰	۳۱/۷۳	h
Chl -۸۰۰	۲۷/۲٦	k
BHA -۱۰۰	٤۰/۱۲	b
BHA -۲۰۰	۳٤/۸٤	f
BHT -۱۰۰	۳۳/۹۵	g
BHT -۲۰۰	۲۸/۱۹	j

* میانگین اعداد پراکسید به‌دست آمده در طی روزهای چهارم، هشتم، دوازدهم، هجدهم و بیست و چهارم برای هر تیمار در سه تکرار.

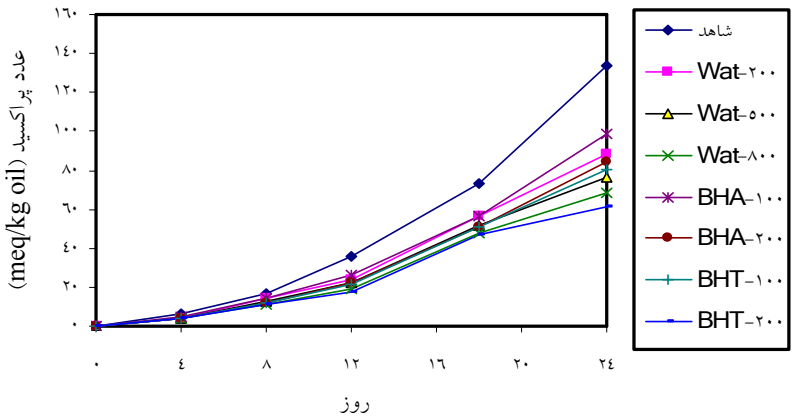
حرف مشابه در ستون بیانگر نبود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.

با توجه به جدول ۳، بیش‌ترین میزان عدد پراکسید به‌دست آمده، مربوط به نمونه شاهد بوده که حاوی هیچ‌گونه آنتی‌اکسیدانی نبوده است. همچنین کم‌ترین مقدار اکسیداسیون و بیش‌ترین اثر آنتی‌اکسیدانی مربوط به تیمار ۸۰۰- Chl بود و کم‌ترین اثر آنتی‌اکسیدانی در میان تیمارهای حاوی آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی در تیمار ۱۰۰- BHA اتفاق افتاده بود.

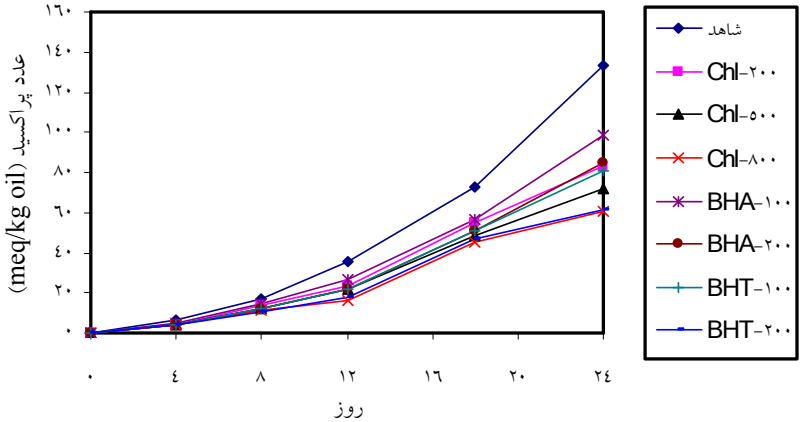
در میان آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی استفاده شده در روغن سویا، بیش‌ترین میزان اکسیداسیون مربوط به تیمار ۲۰۰- Met بوده است. تیمار ۵۰۰- Chl با ۸۰۰- Met از لحاظ آماری در سطح احتمال (P<۰/۰۵) با یکدیگر تفاوت معنی‌داری از نظر میزان عدد پراکسید نشان نداد و در مقایسه با آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی ۱۰۰-BHA، ۲۰۰-BHA و ۱۰۰-BHT میزان اکسیداسیون کمتر و اثر آنتی‌اکسیدانی بهتری داشتند. همچنین تیمار ۲۰۰-Chl و ۵۰۰-Met از نظر عدد پراکسیدی با یکدیگر معنی‌دار نبودند و کمتر از آنتی‌اکسیدان سنتزی ۱۰۰-BHA بودند. در تیمارهای مربوط به عصاره آبی نیز، تیمار ۸۰۰-Wat کم‌ترین میزان اکسیداسیون را بعد از تیمار ۸۰۰-Chl در بین آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی داشت. در بین آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی، کم‌ترین میزان اکسیداسیون و بیش‌ترین اثر آنتی‌اکسیدانی مربوط به تیمار ۲۰۰-BHT بود که در مقایسه با ۸۰۰-Chl میزان اکسیداسیون بیش‌تر و با ۸۰۰-Wat میزان اکسیداسیون کم‌تری داشت و از لحاظ آماری در سطح احتمال (P<۰/۰۵) معنی‌دار بودند. شکل‌های ۱، ۲ و ۳، مقادیر عدد پراکسید را در همه روزهای مورد آزمایش برای هر کدام از عصاره‌های متانولی، آبی و کلروفرمی در مقایسه با آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی نشان می‌دهند.



شکل ۱- مقایسه تیمارهای عصاره متانولی با آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی از نظر میزان عدد پراکسید.



شکل ۲- مقایسه تیمارهای عصاره آبی با آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی از نظر میزان عدد پراکسید.



شکل ۳- مقایسه تیمارهای عصاره کلروفرمی با آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی از نظر میزان عدد پراکسید.

شکل‌های ۱، ۲ و ۳ به‌وضوح نشان می‌دهند که با افزایش زمان نگهداری نمونه‌های روغن در شرایط اکسیداسیون، میزان عدد پراکسید افزایش یافته است و نمونه شاهد که حاوی هیچ نوع آنتی‌اکسیدانی نبود در مقایسه با بقیه تیمارها بیش‌ترین مقدار عدد پراکسید را در همه روزها داشت. این افزایش در میزان عدد پراکسید را می‌توان به تشکیل هیدروپراکسیدها یعنی محصولات اولیه اکسیداسیون نسبت داد. با افزایش زمان نگهداری نمونه‌ها در شرایط اکسیداسیون و حرارت‌دهی، تفاوت بین تیمارها بیشتر مشهود شد. تفاوت بین عصاره‌ها و غلظت‌های مختلف عصاره‌ها در مقایسه

با آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی (BHT و BHA) بیانگر آن است که با افزایش غلظت عصاره‌ها، توان آنتی‌اکسیدانی در بسیاری از موارد افزایش داشت. در همه روزها، حتی غلظت‌های پایین عصاره (۲۰۰ پی‌پی‌ام) توان مقایسه با آنتی‌اکسیدان سنتزی BHA (غلظت ۱۰۰ پی‌پی‌ام) را داشته‌اند. غلظت‌های ۵۰۰ پی‌پی‌ام عصاره‌ها نیز به تاخیراندازی اکسیداسیون و اثر آنتی‌اکسیدانی مشابهی با آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی BHA (۱۰۰ و ۲۰۰ پی‌پی‌ام) و BHT (۱۰۰ پی‌پی‌ام) داشتند. در روزهای پایانی به‌دلیل مصرف و تخریب آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی و سنتزی در اثر حرارت و گذشت زمان، تیمارها اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال (P<۰/۰۵) با یکدیگر پیدا کردند و تنها غلظت ۸۰۰ پی‌پی‌ام عصاره کلروفرمی قابل قیاس با آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT در غلظت ۲۰۰ پی‌پی‌ام از نظر میزان عدد پراکسید و اثر آنتی‌اکسیدانی بود. در مقایسه غلظت‌های ۸۰۰ پی‌پی‌ام عصاره‌های آبی و متانولی با آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی نیز می‌توان نتیجه گرفت که هر دو عصاره عدد پراکسید کمتر و به تاخیراندازی اکسیداسیون و اثر آنتی‌اکسیدانی بهتری از آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی نشان دادند. دلیل بالا بودن اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره کلروفرمی را می‌توان به بالا بودن میزان ترکیبات فنولی آن و انحلال بهتر عصاره کلروفرمی در روغن دانست. در عصاره‌های آبی و متانولی، پایین بودن میزان ترکیبات فنولی در مقایسه با عصاره کلروفرمی، حل شدن سخت این عصاره‌ها در روغن و احتمال حضور مقادیری ناخالصی در عصاره‌ها می‌تواند دلیلی بر پایین بودن اثر آنتی‌اکسیدانی این دو عصاره در مقایسه با عصاره کلروفرمی باشد.

نتایج آنالیز واریانس و نیز مقایسه میانگین اعداد اسید تیوباربیتوریک تیمارهای مختلف نشان دادند که اثر تیمار و زمان برروی عدد اسید تیوباربیتوریک در سطح احتمال (P<۰/۰۵) معنی‌دار بود. جدول ٤ مقایسه میانگین‌های مقادیر اعداد اسید تیوباربیتوریک را در مجموع روزهای ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ نشان می‌دهد.

همان‌طورکه در جدول نشان داده شده، بیش‌ترین میزان شاخص اسید تیوباربیتوریک در بین تیمارهای آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی و سنتزی، مربوط به تیمار Met-۲۰۰ بود که با آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی BHA-۱۰۰ تفاوت معنی‌داری نشان نداد و کم‌ترین مقدار این شاخص مربوط به تیمار Chl-۸۰۰ بود که با آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT-۲۰۰ دارای اختلاف معنی‌داری نبود. این شاخص بین تیمارهای Chl-۵۰۰، Wat-۵۰۰ و Met-۸۰۰ تفاوت معنی‌داری نداشت و نسبت به آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی BHA-۱۰۰، BHA-۲۰۰ و BHT-۱۰۰ مقادیر کمتری داشتند.

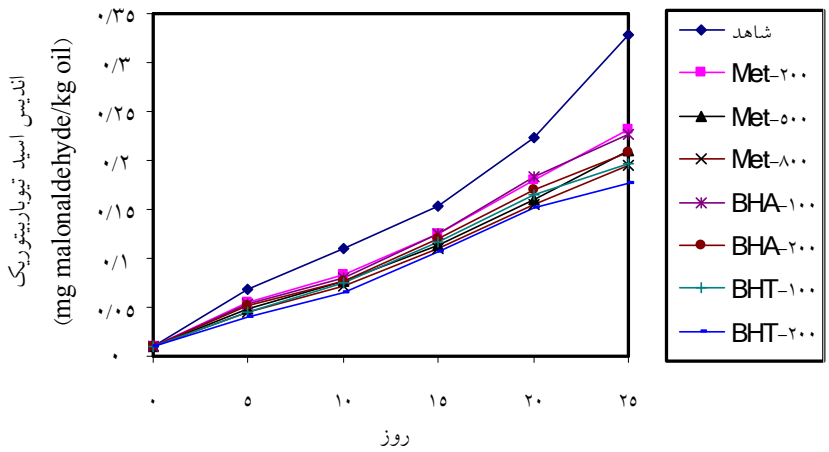
شکل‌های ٤، ٥ و ٦ مقادیر اندیس اسید تیوباربیتوریک را برای تیمارهای متانولی، آبی و کلروفرمی در مقایسه با آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی در همه روزهای مورد آزمایش به‌طور جداگانه به‌ترتیب نشان می‌دهند.

جدول ٤- مقایسه میانگین‌های اعداد اسید تیوباربیتوریک به‌دست آمده از تیمارهای انجام شده (عصاره‌های آبی، متانولی، کلروفرمی، BHA و BHT) برروی روغن سویا.

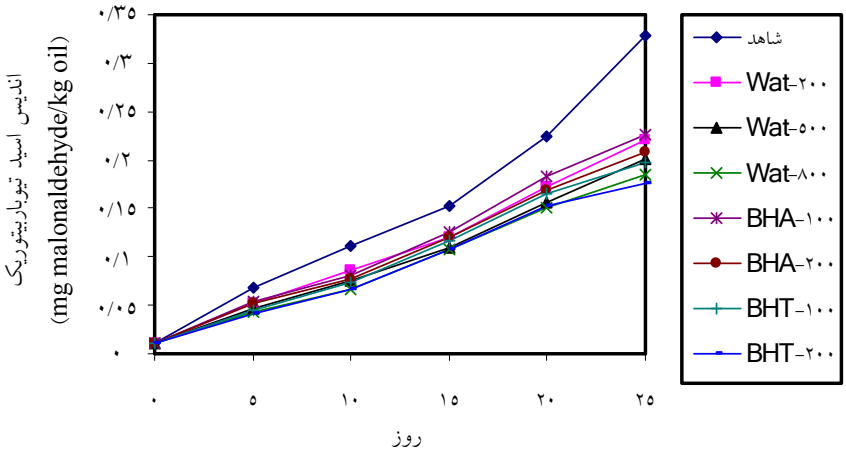
تیمارها	میانگین * اعداد اسید تیوباربیتوریک	حروف دانکن
شاهد	۰/۱۷۷	a
Wat -۲۰۰	۰/۱۳۰	cd
Wat -۵۰۰	۰/۱۱۸	ghi
Wat -۸۰۰	۰/۱۱۱	j
Met -۲۰۰	۰/۱۳۵	b
Met -۵۰۰	۰/۱۲۲	fg
Met -۸۰۰	۰/۱۱٦	hi
Chl -۲۰۰	۰/۱۲۸	de
Chl -۵۰۰	۰/۱۱۵	i
Chl -۸۰۰	۰/۱۰۵	k
BHA -۱۰۰	۰/۱۳٤	bc
BHA -۲۰۰	۰/۱۲۵	ef
BHT -۱۰۰	۰/۱۲۰	gh
BHT -۲۰۰	۰/۱۰۸	jk

* میانگین مقادیر اسید تیوباربیتوریک به‌دست آمده در مجموع روزهای پنجم، دهم، پانزدهم، بیستم و بیست و پنجم برای هر تیمار در سه تکرار.

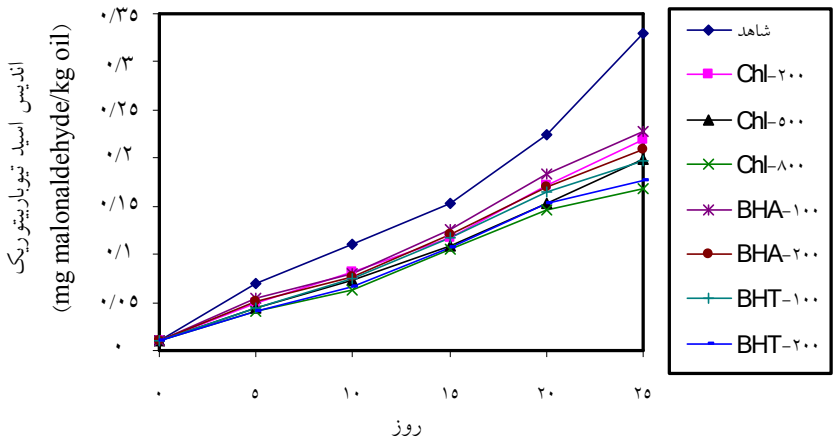
حرف مشابه در ستون بیانگر نبود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.



شکل ٤- مقایسه تیمارهای عصاره متانولی با آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی از نظر میزان اندیس اسید تیوباربیتوریک.



شکل ٥- مقایسه تیمارهای عصاره آبی با آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی از نظر میزان اندیس اسید تیوباربیتوریک.



شکل ٦- مقایسه تیمارهای عصاره کلروفرمی با آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی از نظر میزان اندیس اسید تیوباربیتوریک.

اندیس اسید تیوبابیتوریک به‌طور گسترده‌ای برای اندازه‌گیری محصولات ثانویه اکسیداسیون به‌کار می‌رود. آنچه که از بررسی شکل‌های ٤، ٥ و ٦ می‌توان استنباط کرد این است که یک افزایش مداومی در میزان اندیس اسید تیوباربیتوریک با افزایش دوره نگهداری در شرایط اکسیداسیون برای همه نمونه‌ها مشاهده شد. نمونه شاهد بیش‌ترین اندیس اسید تیوباربیتوریک را در همه مراحل آزمایش در طی نگهداری نشان داد. در این روش نیز مشابه روش عدد پراکسید، شدت بروز خاصیت آنتی‌اکسیدانی به غلظت عصاره‌ها وابسته بود. به‌طوری‌که این فعالیت با افزایش غلظت عصاره‌ها به‌طور معنی‌داری افزایش و میزان اندیس اسید تیوباربیتوریک کاهش یافت که این به تجمع ترکیبات فنولی نسبت داده می‌شود.

از آنجا که شاخص اسید تیوباربیتوریک شاخصی است که در روزهای پایانی آزمایش یا دوره اکسیداسیون افزایش پیدا می‌کند، پس در روزهای اول آزمایش اختلاف زیادی بین تیمار شاهد و سایر تیمارها وجود نداشت ولی در روزهای پایانی به‌خصوص روز بیست و پنجم اختلاف بین تیمارها و همچنین نمونه شاهد معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$) و در نتیجه اثر آنتی‌اکسیدانی زیاد شده بود. باید ذکر کرد که روند تغییرات عدد پراکسید با عدد اسید تیوباربیتوریک در طی دوره اکسیداسیون با یکدیگر متفاوت بود و عدد اسید تیوباربیتوریک به‌طور آهسته افزایش یافته است. در نهایت می‌توان گفت که آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی از نظر حفظ اثر آنتی‌اکسیدانی به‌خوبی توانسته بودند با آنتی‌اکسیدان‌های

سنتزی رقابت کرده و در غلظت‌های بالاتر (۸۰۰ و ۵۰۰ پی‌پی‌ام) اثر آنتی‌اکسیدانی خیلی بهتری نسبت به آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی به‌خصوص در روزهای پایانی آزمایش نشان بدهند. در بین عصاره‌های آبی، متانولی و کلروفرمی، عصاره کلروفرمی با بیش‌ترین اثر آنتی‌اکسیدانی به‌عنوان بهترین آنتی‌اکسیدان طبیعی معرفی می‌گردد. به این ترتیب، می‌توان برگ‌های گزنه را به‌عنوان منبعی که دارای اثر آنتی‌اکسیدانی است معرفی نمود و این اثر را ناشی از حضور ترکیبات فنولی در برگ‌ها دانست.

کار مشابهی در زمینه اثر آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولی گیاه گزنه در منابع کتابخانه‌ای و اینترنتی به‌دست نیامد که نتایج با آن مقایسه شود ولی پژوهش‌های زیادی در پایداری روغن‌های خوراکی با آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی از منابع گیاهی مختلف صورت گرفته است.گلی و همکاران (۲۰۰۵)، غلظت‌های مختلف ترکیبات فنولی موجود در پوست پسته را در مقایسه با آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی در روغن سویا بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که غلظت‌های مختلف ترکیبات فنولی قادرند به‌خوبی روند اکسیداسیون را کند نمایند و اثر عصاره‌ها در غلظت ٦٠٠ پی‌پی‌ام مشابه اثر آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی در غلظت ۲۰۰ پی‌پی‌ام است. ابوطالبیان (۲۰۰٦) گزارش کرد که اثر آنتی‌اکسیدانی نعناع، پونه و ریحان در روغن آفتاب‌گردان به‌عنوان آنتی‌اکسیدان در غلظت ٦٠٠ پی‌پی‌ام با اثر آنتی‌اکسیدانی BHT در غلظت ۲۰۰ پی‌پی‌ام قابل قیاس است و در میان گیاهان استفاده شده عصاره استخراجی از گیاه پونه بالاترین اثر آنتی‌اکسیدانی را از خود نشان داد و به‌دنبال آن گیاهان نعناع و ریحان قرار گرفتند. نتایج ما نیز از نظر روند تغییرات اعداد پراکسید و اسید تیوباربیتوریک در طی دوره نگهداری در شرایط اکسیداسیون و تأثیر غلظت عصاره‌های افزوده به روغن در مقایسه با آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی مشابه نتایج محققان بالا بوده است.

منابع

Abutalebian, M. 2006. The extraction of phenolic compounds from peppermint, pennyroyal and sweet basil and comparison of their antioxidative effect in sunflower oil. M.Sc. Thesis of food science and technology. Isfahan University of Technology.

Ahmadi, F., Kadivar, M., and Shahedi, M. 2007. Antioxidant activity of *Kelussia odoratissima* Moza. in model and food systems. *Food Chemistry*, 105: 57-64.

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

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

Chang, C., Yang, M., Wen, H., and Chern, J. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food Drug Analysis*, 10: 178-182.

Ebrahimzadeh, M.A., Pourmorad, F., and Hafezi, S. 2008. Antioxidant activities of Iranian corn silk. *Turkish Journal of biology*, 32: 43-49.

Erkan, N., Ayranci, G., and Ayranci, E. 2008. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella Sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acidand sesamol. *Joural of Food Chemistry*, doi: 10.1016/j. foodchem.2008.01.058.

Fennema, O.R. 1996. *Food Chemistry*, NewYork: Marcel Dekkert U.S.A.

Fogliano, V., Verde, V., Randazzo, G., and Ritieni, A. 1999. Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 1035-1040.

Gao, X., Ohlander, M., Jeppsson, N., Bjork, L., and Trajkovski, V. 2000. Changes in antioxidant effICts and their relationship to phytonutrients in fruits of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) during maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1485-1490.

Goli, A.H., Barzegar, M., and Sahari, M.A. 2005. Antioxidant activity and totalphenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. *Food Chemistry*, 92: 521-525.

Gülçin, I., Küfrevioglu, Ö.I., Oktay, M., and Büyükokuroglu, M. 2004. Antioxidan antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). *Journal of Ethnopharma*, 90: 205-215.

Iranian herbal pharmacopoeia. 2002. Compilation committee of Iranian herbal pharmacopoeia. Ministry of health and medical education. Food-Drug organization, 1st edn.

Koleva, I.I., Van Beek, T.A., Linssen, G.A., and Evstatieva, LN. 2002. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical Analysis*, 13: 8-17.

Jimenez-Escrig, A., Rincon, M., Pulido, R., and Saura-Calixto, F. 2001. Guava fruit (Psidium guajava L.) as a new source of antioxidant dietary fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 5489-5493.

Llorach, R., Martı´nez-Sa´nchez, A., Tomas-Barberan, F., Gil, M., and Ferreres, F. 2008. Characterisation of polyphenols and antioxidant propertiesof five lettuce varieties and escarole. *Food Chemistry*, 108: 1028-1038.

Mahdavi, D.L., Deshpande, S.S., and Salunkhe, D.K. 1995. Food Antioxidant. 1st edn. New York: Marcel Dekker, Inc, U.S.A.

Mavi, A., Terzi, Z., Ozgen, U., Yildirim, A., and Coskun, M. 2004. Antioxidant Properties of Some Medicinal Plants: *Prangos ferulacea* (Apiaceae), *Sedum sempervivoides* (Crassulaceae), *Malva neglICta* (Malvaceae), *Cruciata taurica* (Rubiaceae), *Rosa pimpinellifolia* (Rosaceae), *Galium verum subsp. verum* (Rubiaceae), *Urtica dioica* (Urticaceae). *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 27: 5. 702-705.

McDonald, S., Prenzler, P.D., Autolovich, M., and Robards, K. 2001. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chemistry*, 73: 73-84.

Ozturk, M., Aydogmus-Ozturk, F., Duru, M.E., and Topcu, G. 2007. Antioxidant activity of stem and root extracts of Rhubarb (Rheum ribes): An edible medicinal plant. *Food Chemistry*, 103: 623-630.

Peterson, D.M., Emmons, C.L., and Hibbs, A.H. 2001. Phenolic antioxidants and antioxidant activity in pearling fractions of oat groats. J. Cereal Sci. 33: 97-103.

Shobana, S., and Nidu, K.A. 2000. Antioxidant actitvity of selected Indian spices. *Prostaglandins, leukotriens and essential fatty acids*, 62: 2. 107-110.

Sidewell, G.G., Salwin, H., Benca, M., and Mitchel, J.A. 1954. The use of thiobarbituric acid as a measure of fat oxidation. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 31: 603-606.

Soares, J.R., Dins, T.C.P., Cunha, A.P., and Ameida, L.M. 1997. Antioxidant activity of some extracts of *Thymus zygis*. *Free Radical Research*, 26: 469-478.

Zheng, W., and Wang, S.Y. 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selICted herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 5165-5170.

Iranian Association of Food Scientists and Technologists

EJFPP., Vol. 1 (2): 85-102
www.ejfpp.info

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Effect of nettle (*Urtica dioica*) leaves extract on the inhibition of soybean oil oxidation

***M. Gharekhani[1], M. Ghorbani[2], M.A. Ebrahimzadeh[3], S.M. Jafari[2] and A.R. Sadeghi Mahoonak[2]**

[1]M.Sc. Student, Dept. of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [2]Assistant Prof., Dept. of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [3]Associate Prof., Dept. of Pharmaceutical Chemistry, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari

Abstract

The traditional extraction method was used to evaluate the antioxidant properties of nettle leaves in soybean oil. Also the effects of three different solvents (water, 80% methanol and chloroform) on the extraction content of phenolic and flavonoid compounds from nettle leaves were examined. Water extract had the highest extraction yield, and chloroform extract had the highest extraction contents of phenolic and flavonoid compounds and the lowest IC_{50} for DPPH radicals. The effects of nettle extracts in three concentration levels (200, 500 and 800 ppm) and synthetic antioxidants (BHA and BHT) in two levels (100 and 200 ppm) on the stability of soybean oil were compared through the determination of peroxide value and thiobarbitoric acid index in specific periods (25 days). The results showed that different concentrations of extracts were effective in retarding the oil oxidation at 60ºC. Among the treatments, the extracts with the concentration of 800 ppm, particularly chloroform extract, had the highest antioxidant activity and were comparable with BHT, and also were more effective than BHA. Hence, the nettle leaves can be introduced as natural antioxidant source and this antioxidative effect caused by the presence of phenolic compounds in nettle leaves.

Keywords: Nettle; Extraction; Antioxidant; Phenolic compounds; Soybean oil

* Corresponding Author; Email: m.ghrekhani@yahoo.com