

تعیین محتوی، ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و شناسایی ترکیب فنولی غالب در عصاره اناریجه به روش کروماتوگرافی مایع با کارائی بالا

شهلا سلمانیان^۱، علیرضا صادقی ماهونک^{۲*}، معصومه جامسون^۳

۱- دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد

۲- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۳- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه دامغان

(تاریخ دریافت: ۹۶/۰۵/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۹/۱۱)

چکیده

گیاه اناریجه با نام علمی *Froriepia subpinnata* از جمله گیاهان بومی ایران با توزیع گسترده در مناطق جنگلی شمال کشور است. این پژوهش برای اولین بار با هدف بررسی ویژگی‌های ضدرادیکالی و آنتی‌اکسیدانی عصاره اناریجه با بهره‌گیری از روش‌های متفاوت (فولین-سیوکالته، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل، فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS و نیز قدرت احیاءکنندگی آهن) و همچنین شناسایی و اندازه‌گیری کمی اسید فنلی غالب موجود در عصاره اناریجه به روش کروماتوگرافی مایع با کارائی بالا، صورت گرفت. عصاره در تمام ارزیابی‌ها از پتانسیل آنتی-اکسیدانی قابل ملاحظه‌ای برخوردار بود ($p < 0.05$) و فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی وابسته به غلظت را نشان داد. در غلظت‌های کمتر از ۰/۰۳ درصد، عصاره استخراجی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری را نسبت به آنتی‌اکسیدان سنتزی به خود اختصاص داد؛ بطوریکه در غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر توانایی آنتی‌اکسیدانی عصاره و آنتی‌اکسیدان سنتزی به ترتیب ۰/۴۷ و ۰/۲۲ میکروگرم در میلی‌لیتر تعیین گردید. لازم به ذکر است که برای اولین بار حضور اسید کلروژنیک به عنوان اسید فنلی غالب در گیاه اناریجه شناسایی گردید. بر اساس نتایج به دست آمده، می‌توان سبزی اناریجه را به عنوان منبع غنی و جدید از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به صنعت غذا و دارو معرفی نمود.

کلید واژگان: اناریجه، ترکیبات فنلی، اسید کلروژنیک، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، کروماتوگرافی مایع با کارائی بالا.

۱- مقدمه

گیاه اناریجه متعلق به خانواده چتریان (Umbelliferae) است که از این جنس در ایران فقط یک گونه با نام علمی *Froriepia subpinnata* گزارش شده است. این گیاه بومی به طور گسترده در حاشیه مناطق جنگلی استان‌های شمالی ایران (گیلان، مازندران، گلستان) رشد می‌نماید و به عنوان سبزی خوراکی و عامل طعم دهنده در تهیه غذاهای محلی مورد استفاده بومیان این مناطق، قرار می‌گیرد [۱]. فراوان‌ترین ترکیب شناسایی شده در اسانس اناریجه با استفاده از آنالیز کروماتوگرافی گازی، هیدروکربن‌های مونوترپن (۸/۸۸/۸) گزارش شده است [۲]. علاوه بر کاربرد و ارزش غذایی، گیاه اناریجه واجد خواص بیولوژیکی فراوان از جمله فعالیت ضد سرطانی ناشی از حضور ترکیباتی از قبیل لیمونن، ترپینولن و فلاونوئیدها است [۳].

گیاهان و متابولیت‌های آن‌ها حاوی ترکیبات فعال زیستی نظیر ترکیبات فنلی (اسیدهای فنلی، فلاونوئیدها، کینون‌ها، کومارین‌ها، لیگنان‌ها، استیلبن‌ها، تانن‌ها)، ترکیبات نیتروژنی (آلکالوئیدها، آمین‌ها، بتالائین‌ها)، ویتامین‌ها (C و E) و ترپنوئیدها (مانند کاروتنوئیدها) با فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی می‌باشند [۴] که به تازگی توجه رو به رشدی در ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی برخی از این ترکیبات، بویژه فنل‌ها، جهت خنثی‌سازی یا به تاخیراندازی اثرات منفی رادیکال‌های آزاد، گزارش شده است [۵]. امروزه آنتی‌اکسیدان‌ها به طور فزاینده‌ای به منظور به تاخیر انداختن فرآیند اکسایش، به مواد غذایی اضافه می‌گردند. این ترکیبات اکسایش مواد غذایی را از طریق مهار رادیکال‌های آزاد، غیرفعالسازی پراکسیدها و گونه‌های فعال اکسیژن، احیاء یون‌های فلزی، چلات نمودن فلزات پرواکسیدان، غیرفعالسازی آنزیم‌های پرواکسایشی نظیر لیپوکسیژناز، خاموش کردن اکسیژن یگانه کنترل می‌نمایند [۶] و [۷]. مصرف و جذب آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی با کاهش خطر ابتلا به انواع سرطان، بیماری‌های قلبی-عروقی، دیابت و دیگر بیماری‌های وابسته به پیری همراه است [۸]. لذا با توجه به اثرات نامطلوب آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی بر سلامت، یافتن منابع آنتی‌اکسیدانی با منشأ طبیعی و جایگزینی آن با انواع سنتزی، به میزان زیادی مورد توجه محافل علمی قرار گرفته است. روش‌های مختلفی جهت ارزیابی فعالیت ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مطرح است که بر اساس شرایط و مکانیسم‌های واکنش، نوع

سوبسترای اکسیدشونده، اکسیدان‌ها، فناوری تشخیص و بیان نتایج، متفاوت است. مکانیسم‌های مختلف انواع روش‌های ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی مبتنی بر انتقال اتم هیدروژن، انتقال الکترون، قدرت احیاءکنندگی و شلاته‌کنندگی فلزات است [۹ و ۱۰]. بنابراین، بهتر است به منظور ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی، مجموعه‌ای از روش‌های شیمیایی و بیوشیمیایی مورد استفاده قرار گیرد.

از آنجائی‌که فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی ناشی از حضور، میزان و نوع ترکیبات فیتوشیمیایی است؛ لذا اندازه‌گیری این ترکیبات به همراه ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی در گیاه بومی اناریجه به عنوان منبع جدید آنتی‌اکسیدانی بسیار حائز اهمیت است. با توجه به فراوانی و کاربرد اناریجه در تهیه غذاهای محلی، این مطالعه برای اولین بار با هدف بررسی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی عصاره‌استخراجی با بهره‌گیری از روش‌های متفاوت (محتوای فنل کل، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل، فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS) و نیز قدرت احیاءکنندگی آهن) و همچنین شناسایی و اندازه‌گیری کمی اسیدفنلی غالب عصاره گیاه اناریجه، به عنوان منبع در دسترس و بالقوه از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی، صورت گرفت. از آنجائی‌که ماهیت شیمیایی عصاره‌های گیاهی بسیار پیچیده است و از ترکیبات مختلف با قطبیت و عملکردهای متفاوت تشکیل شده است، لذا ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی تنها با یک روش نتایج پراکنده‌ای را ارائه می‌دهد. بنابراین استفاده از چند روش مختلف به صورت همزمان می‌تواند اطلاعات بیشتر و دقیق‌تری را در زمینه فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی فراهم نماید. از این رو در این پژوهش، از روش‌های مختلفی به منظور ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اناریجه استفاده گردید.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- آماده‌سازی نمونه گیاهی، تهیه عصاره و پودر فنلی

گیاه اناریجه (قبل از مرحله گل‌دهی) از حواشی مناطق جنگلی شهرستان گرگان، در اوایل فصل بهار جمع‌آوری شد. سبزی‌های اناریجه (بخش هوائی) بلافاصله پس از جمع‌آوری و جداسازی ناخالصی‌ها در آون با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد خشک

آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT به ترتیب در حلال‌استخراجی و متانول آماده شدند. میزان ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول عصاره با ۱ میلی‌لیتر از معرف (اسید سولفوریک ۰/۶ مولار، فسفات سدیم ۲۸ میلی‌مولار و آمونیوم مولیبدات ۴ میلی‌مولار) را در لوله اپندورف ریخته و به مدت ۱/۵ ساعت در حمام آب با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از سرد کردن، جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۹۵ نانومتر خوانده شد. در نمونه کنترل به جای عصاره از ۰/۱ میلی‌لیتر حلال مصرفی استفاده شد [۱۳].

۲-۴- قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد

DPPH

جهت بررسی توانایی ضدرادیکالی عصاره‌ها، محلول‌هایی با غلظت‌های مختلف (۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) از پودر عصاره و نیز آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT در حلال متانول آماده شدند. یک میلی‌لیتر از محلول متانولی DPPH (با غلظت یک میلی‌مولار) به ۳ میلی‌لیتر از عصاره افزوده و مخلوط حاصله به شدت هم‌زده شد. لوله‌های آزمایش به مدت ۳۰ دقیقه در محل تاریک قرار گرفتند و بعد از این مدت، میزان جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. لازم به ذکر است که در نمونه کنترل، عصاره با ۳ میلی‌لیتر متانول جایگزین شد. در نهایت درصد مهار رادیکال‌های DPPH توسط عصاره، با رابطه زیر محاسبه گردید [۱۴].

$$\left(\frac{\text{جذب کنترل} - \text{جذب نمونه}}{\text{جذب کنترل}} \right) \times 100 = \text{درصد مهار رادیکال آزاد}$$

رابطه (۱)

۲-۵- قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد

ABTS

توانایی مهار رادیکال آزاد ABTS به روش گومزایستاکا و همکاران (۲۰۰۹) انجام شد. پس از تهیه محلول‌های ۷ میلی-مولار ABTS و ۲/۴۵ میلی‌مولار پتاسیم پرسولفات، حجم ۹ میلی‌لیتر از محلول ABTS به حجم ۳ میلی‌لیتر محلول پتاسیم پرسولفات اضافه شد. محلول حاصل به مدت ۱۶ ساعت در مکان تاریک قرار گرفت. پس از طی این مدت، محلول ABTS برای رسیدن به جذب ۰/۷ در طول موج ۷۳۴ نانومتر با آب دیونیزه رقیق شد. آب دیونیزه به عنوان نمونه بلانک مورد استفاده قرار گرفت. آنگاه ۳ میلی‌لیتر محلول ABTS (با جذب اولیه ۰/۷±۰/۰۲) به داخل کووت ریخته و در دستگاه

گردیدند و توسط آسیاب به ذرات بسیار ریز تبدیل و از الک با مش ۴۰ گذرانده و تا زمان آزمایش در کیسه‌های محافظ به هوا و رطوبت در فریزر با دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جهت تهیه عصاره میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر از هر یک از حلال‌های استون، اتانول و متانول در سطح غلظتی ۸۰ درصد (حجمی: حجمی) و آب با ۱۰ گرم از پودر خشک گیاه مخلوط و کلیه عصاره‌ها (استونی، اتانولی و متانولی) به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکردار در دو سطح دمایی ۲۵ و ۵۰ درجه سانتی‌گراد به صورت جداگانه، قرار گرفتند. پس از این مرحله، بخش جامد به وسیله کاغذ صافی واتمن شماره یک جدا گردید، سپس عصاره‌های اتانولی و متانولی ابتدا توسط تبخیر کننده چرخشی تحت خلاء و عصاره استونی توسط آون تحت خلاء تغلیظ گردیدند و جهت حذف کامل حلال، کلیه عصاره‌ها با خشک کن انجمادی، خشک و به پودر تبدیل شدند. پودرهای فنلی حاصل برای آزمایشات بعدی در فریزر با دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جهت سنجش مقدار ترکیبات فنل کل از عصاره استخراجی گیاه قبل از مرحله تغلیظ و خشک کردن و جهت ارزیابی فعالیت‌های آنتی-اکسیدانی از پودر فریز درایر شده استفاده گردید [۱۱].

۲-۲- اندازه‌گیری مقدار ترکیبات فنلی کل

میزان کل ترکیبات فنلی با روش فولین-سیوکالت‌اندازه‌گیری شد [۱۲]. در این روش میزان ۲۰ میکرولیتر از محلول عصاره با ۱/۱۶۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین-سیوکالتو مخلوط شد. بعد از گذشت ۱ تا ۸ دقیقه، میزان ۳۰۰ میکرولیتر محلول کربنات سدیم (۲۰٪) به آن‌ها افزوده شد. لوله‌های آزمایش بعد از تکان دادن، درون حمام آب با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و پس از گذشت ۳۰ دقیقه جذب آن‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۰ نانومتر خوانده شد. جهت رسم منحنی استاندارد از اسید گالیک استفاده شد. میزان کل ترکیبات فنلی موجود در عصاره با استفاده از معادله به دست آمده از منحنی استاندارد ($Y = 0.0116x + 0.0669$) محاسبه و نتایج بر حسب میلی‌گرم اسید گالیک در هر گرم عصاره بیان شد.

۲-۳- ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل^۱ (TAC)

در این روش محلول‌هایی با غلظت‌های مختلف (۵۰، ۱۰۰، ۳۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) از پودر عصاره و نیز

1. Total Antioxidant Capacity

۷-۲- شناسایی و اندازه‌گیری کمی اسیدفنلی

غالب

آماده سازی عصاره گیاهی جهت تعیین نوع و میزان اسیدهای فنلی موجود در عصاره استونی اناریجه به روش کواک و همکاران (۲۰۱۰) با کمی تغییرات انجام پذیرفت [۱۷]. بدین صورت که پودر خشک گیاه با نسبت ۱:۳۰ با حلال استون ۸۰٪ (وزنی: حجمی) مخلوط و به مدت ۱۲ ساعت در انکوباتور شیکردار با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از این مرحله، بخش جامد به وسیله کاغذ صافی واتمن شماره یک جدا گردید و عمل استخراج مجدد با حلال تازه به مدت ۳۰ دقیقه به کمک حمام فراصوت انجام شد. عصاره‌های حاصل از دو مرحله با هم ادغام شدند. عصاره استونی نهایی پس از انجماد (به کمک تانک ازت) با خشک‌کن انجمادی خشک و به پودر تبدیل شد. شناسایی و اندازه‌گیری ترکیبات فنلی توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (کناور-اسمارت لاین ۱۰۰۰، ستون آر پی C18 با ابعاد ۴/۶ × ۲۵۰ میلی‌متر و اندازه ذرات ۵ میکرومتر) انجام شد. میزان ۲۰ میکرولیتر از عصاره بعد از عبور از فیلتر ۰/۲ میکرون به ستون HPLC تزریق گردید. سیستم مورد استفاده در این بررسی گرا دیان و فاز متحرک شامل آب با ۰/۰۲٪ تری فلورواستیک اسید (حلال ۱) و متانول با ۰/۰۲٪ تری فلورواستیک اسید (حلال ۲)، سرعت جریان فاز متحرک در ستون ۰/۵ میلی‌لیتر در هر دقیقه، دمای ستون ۲۵ درجه سانتی‌گراد و طول موج‌های مورد بررسی ۲۸۰ و ۳۲۰ نانومتر (دتکتور PDA) بود. جهت شناسایی نوع اسیدهای فنلی از استانداردهای اسید گالیک، اسید کلروژنیک، اسید کافئیک، اسید پاراکوئماریک، اسید فرولیک، اسید جنتیسینیک، اسید سیرینجیک و اسید پروتوکاتچوئیک استفاده شد. با مقایسه زمان تأخیر و سطح زیر منحنی نمونه با نمونه‌های استاندارد، میزان اسیدهای فنلی شناسایی و میزان ترکیب فنلی غالب با رسم منحنی استاندارد تعیین گردید [۱۸].

۸-۲- تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه و تحلیل نتایج به دست آمده مربوط به اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنلی و نیز ارزیابی فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد، قدرت احیاءکنندگی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل به صورت آزمایش فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار صورت پذیرفت. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم

اسپکتروفتومتر قرار داده شد. سپس ۶۰ میکرولیتر محلول نمونه (در غلظت‌های مختلف ۰/۱۶-۰/۰۳٪) به ۲۹۴۰ میکرولیتر از محلول ABTS اضافه، مخلوط به خوبی ورتکس شد. بعد از ۳ دقیقه، جذب محلول (جذب نهایی) تعیین گردید و درصد بازدارندگی طبق رابطه زیر محاسبه شد [۱۵].

$$100 \times (\text{جذب اولیه} - \text{جذب نهایی}) / \text{درصد بازدارندگی}$$

رابطه (۲)

برای رسم منحنی استاندارد نیز محلول استوک (پایه) اسید آسکوربیک با غلظت ۰/۱ گرم بر ۱۰۰ میلی‌لیتر تهیه شد. سپس محلول استوک برای تهیه غلظت‌های ۰/۰۰۵ تا ۰/۰۶ گرم بر ۱۰۰ میلی‌لیتر رقیق شد. مراحل آزمون ABTS مشابه روش بالا انجام شد. درصد بازدارندگی برای غلظت‌های مختلف اسید آسکوربیک به عنوان نمونه استاندارد، محاسبه گردید. منحنی استاندارد درصد بازدارندگی در برابر غلظت اسید آسکوربیک (گرم بر ۱۰۰ میلی‌لیتر) رسم شد. با قراردادن مقدار درصد بازدارندگی نمونه‌ها در معادله مربوط به منحنی استاندارد اسید آسکوربیک، توانایی مهار رادیکال آزاد ABTS عصاره‌ها محاسبه شد. داده‌ها بر اساس معادل میلی‌گرم ویتامین C بر گرم وزن تر گیاه بیان گردیدند.

۶-۲- قدرت کاهندگی آهن^۲ (FRAP روش)

فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره بر اساس توانایی احیاءکنندگی آهن سه ظرفیتی به روش گومزگلن و همکاران (۲۰۰۷) همراه با تغییراتی انجام شد. برای این منظور، محلول‌هایی با غلظت‌های مختلف از عصاره‌های پودر شده در آب تهیه گردید. سپس به ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره ۳ میلی‌لیتر معرف FRAP اضافه شد. مخلوط حاصل به خوبی ورتکس گردید و به مدت ۴ دقیقه در حمام آبی با دمای ۳۷°C انکوبه شد. آنگاه جذب محلول‌ها در طول موج ۵۹۳ نانومتر نسبت به شاهد (شامل ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر همراه با ۳ میلی‌لیتر معرف FRAP)، اندازه‌گیری گردید. با قراردادن مقدار جذب نمونه‌ها در معادله مربوط به منحنی استاندارد کاتیون آهن دو ظرفیتی، توانایی احیاءکنندگی عصاره‌ها محاسبه شد. داده‌ها بر اساس معادل میلی‌مول یون آهن تولید شده بر گرم وزن تر گیاه بیان گردیدند [۱۶].

افزار SAS نسخه ۹/۱ و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ انجام شد و نمودارها با نرم افزار Excel 2010 رسم گردیدند.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- مقدار ترکیبات فنلی کل

میزان کل ترکیبات فنلی استخراج شده توسط حلال‌های استون، متانول، اتانول (۸۰ درصد) و آب بر مبنای استاندارد اسید

Table 1 Mean comparison of total phenolic contents (mg gallic acid equivalents/g extract) of different solvent extracts from Enarijeh.

Sample	Temperature	
	25 °C	50 °C
Acetone extract	45.10 ± 3.55 ^a	39.97 ± 0.94 ^b
Methanol extract	45.57 ± 2.03 ^a	38.49 ± 2.83 ^b
Ethanol extract	42.21 ± 1.92 ^{ab}	38.42 ± 2.52 ^b
Water extract	19.59 ± 0.23 ^d	23.55 ± 0.8 ^e

Data are mean ± SD (n = 3). Values with different letters show a significant difference ($p < 0.05$).

گیاه حائز اهمیت است؛ لذا لزوم تعیین مقدار دقیق این اسید فنلی به روش کروماتوگرافی مطرح می‌گردد.

محتوای فنلی غلظت‌های مختلف عصاره استونی بر اساس اسید گالیک و کلروژنیک اسید نیز اندازه‌گیری شد (جدول ۲).

بر مبنای نتایج به‌دست آمده، میزان اسید کلروژنیک در بافت

Table 2. Phenolic contents of the acetonic extract in different concentrations by spectrophotometric (UV-Vis) method.

Extract (%)	Gallic acid content (mg/ml extract)	Chlorogenic acid content (mg/ml extract)
0.03	0.16 ± 0.01	0.25 ± 0.02
0.1	0.17 ± 0.01	0.27 ± 0.04
0.16	0.20 ± 0.02	0.30 ± 0.05

Data are mean ± SD (n = 3).

گزینشی عمل نمی‌کنند. استفاده از آب به عنوان حلال استخراج، یک محیط کاملاً قطبی ایجاد می‌کند که در آن برخی از ترکیبات فنلی با درجه قطبیت پائین به میزان کمتری استخراج می‌شوند. افزودن آب به حلال‌های آلی با تشکیل یک محیط نسبتاً قطبی همراه بوده و بنابراین از استخراج مقادیر و انواع بیشتری از ترکیبات فنلی در این شرایط اطمینان حاصل می‌گردد. علاوه بر این، عصاره‌ی آبی حاوی مقادیر زیادی از ناخالصی‌ها نظیر اسیدهای آلی، پروتئین‌ها و قندهای محلول می‌باشد که می‌تواند در تشخیص و تعیین مقدار ترکیبات فنولی تداخل ایجاد نمایند. اتانول، متانول و استون از رایج‌ترین حلال‌های الکلی مورد استفاده جهت استخراج ترکیبات پلی فنول گیاهی می‌باشند [۲۳]. محتوای فنل کل پارامتر مهمی از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل است و به طور گسترده جهت ارزیابی

محتوای کل ترکیبات فنل برگ‌های عصاره متانولی اناریجه ۷۵/۷±۳/۷۸ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم عصاره گزارش شده است [۱۹]. بر مبنای تحقیقات انجام شده، میزان ترکیبات فنلی موجود در بافت‌های گیاهی و نیز در گونه‌های مختلف گیاهان تابع تغییرات فصلی، مکان جغرافیایی، شرایط خاک، فاکتورهای ژنتیکی، فاز رویشی، بخش مورد استفاده گیاه، عملیات پس از برداشت و شرایط نگهداری می‌باشد [۲۰] و همچنین محتوای فنلی تحت تاثیر پیش تیمارهای نمونه (مثل روغن‌گیری و کاهش اندازه ذرات) و شرایط مورد استفاده جهت تهیه عصاره (نسبت حلال به نمونه، نوع حلال، زمان و دمای استخراج) قرار می‌گیرد [۲۲]. حلال‌های الکلی عموماً جهت استخراج فنل‌ها از منابع طبیعی مورد استفاده قرار می‌گیرند؛ بویژه مخلوط‌های الکل-آب، گرچه این حلال‌ها به صورت

عصاره‌های آنتی‌اکسیدانی مورد استفاده قرار می‌گیرد. روش فولین-سیوکالته از متداول‌ترین روش‌های اندازه‌گیری محتوای فنل کل می‌باشد. اساس کار در این روش، احیاء معرف فولین توسط ترکیبات فنلی در محیط قلیایی (احیاء یون مولبدن ۶ ظرفیتی به مولبدن ۵ ظرفیتی با پذیرش یک الکترون اهدائی توسط آنتی‌اکسیدان فنلی) است که در نتیجه، مکانیسم این روش بر مبنای انتقال الکترون همراه با قدرت احیاء‌کنندگی آنتی‌اکسیدان‌های فنلی است [۱۰].

میزان کل ترکیبات فنلی به تنهایی معیار دقیق و ثابتی جهت اثبات قدرت آنتی‌اکسیدانی بالاییک نمونه نیست، بلکه ماهیت، نوع و میزان ترکیبات فنل یک ماده گیاهی، شاخص قدرت آنتی‌اکسیدانی بالای آن است. از سوی دیگر تعیین مقدار ترکیبات فنلی توسط روش فولین-سیوکالته یک سنجش قطعی از مقدار فنل کل نیست. انواع مختلفی از ترکیبات فنلی وجود دارند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها بستگی به ساختار آن‌ها دارد. معرف فولین-سیوکالته به صورت غیراختصاصی با ترکیبات فنلی واکنش می‌دهد. علاوه بر این، بجز ترکیبات فنلی، سایر ترکیبات موجود در عصاره نظیر قندها، آمینواسیدها، اسیدهای آلی، آمین‌های آروماتیک و ویتامین‌ها نیز قادر به احیاء این معرف می‌باشند [۲۴]. با توجه به اینکه عصاره استونی گیاه در ترکیب با حلال استونی قابلیت انکسوله شدن در پلیمرهایی دارد که تنها حلال مناسب آن‌ها، استونی است (نظیر نانو فیلم‌های خوراکی) و نیز به علت سمیت عصاره متانولی در بحث غذا، ایمنی و سلامت؛ در نتیجه عصاره استونی گیاه جهت ارزیابی فعالیت-های آنتی‌اکسیدانی، مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

۳-۲- ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل

اساس کار در این روش احیاء مولبدن ۶ ظرفیتی به مولبدن ۵ ظرفیتی در محیط اسیدی و دمای بالا است. این واکنش با تشکیل کمپلکس‌های بسیار پایدار سبز رنگ فسفو مولبدن همراه بوده که تحت تاثیر حلال مورد استفاده جهت استخراج ترکیبات فنلی قرار نمی‌گیرد [۱۳]. نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره و آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT وجود دارد ($p < 0/05$). در محدوده غلظتی ۵۰۰-۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل آنتی-اکسیدان سنتزی و عصاره استونی اناریجه به ترتیب در محدوده ۱/۲۹-۰/۲۲ و ۰/۹۱-۰/۴۷ تعیین گردید (شکل ۱). نتایج حاکی از آن بود که با افزایش غلظت عصاره، فعالیت

آنتی‌اکسیدانی کل افزایش یافت. در غلظت‌های کمتر از ۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر (۰/۰۳٪) عصاره استخراجی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری را نسبت به آنتی‌اکسیدان سنتزی به خود اختصاص داد و از این نظر قابل رقابت با آنتی‌اکسیدان سنتزی بود. این نتایج نشان می‌دهد یک غلظت بحرانی از ترکیبات فنولی برای فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل کافی است. احتمالاً در غلظت‌های بالاتر به دلیل پیدایش نوعی حالت اشباع شدگی، افزایش غلظت تاثیر معنی‌داری روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل ندارد. روش فسفومولبدنیوم روش کمی برای ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدان‌های محلول در آب و محلول در چربی (ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل) می‌باشد. ترکیبات فنلی و آنتوسیانین‌ها مسئول فعالیت آنتی‌اکسیدانی بخش آبدوست بوده در حالیکه کاروتنوئیدها و توکوفرول‌ها ترکیبات آنتی‌اکسیدانی اصلی در عصاره لیپوفیلی می‌باشند [۱۱]. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی از ترکیبات پلی‌فنلی ناشی می‌شود. بنابراین باید ارتباط و همبستگی نزدیکی بین مقدار ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی وجود داشته باشد. اما لی و همکاران (۲۰۰۵)، هیچ همبستگی معنی‌داری بین مقدار فنل کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های عناب چینی نیافتند [۲۵]. از این رو می‌توان بیان نمود که فعالیت آنتی‌اکسیدانی علاوه بر ترکیبات فنلی، می‌تواند احتمالاً به دلیل حضور ترکیبات فیتوشیمیایی دیگر همچون اسیدآسکوربیک، توکوفرول‌ها و پیگمان‌ها و نیز اثرات سینرژیستی آن‌ها باشد که در فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل شرکت می‌کنند [۲۶]. نتایج این پژوهش با نتایج سلمانیان و همکاران (۲۰۱۲) همخوانی داشت. نتایج حاصل از بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره‌های استخراجی مختلف حاصل از میوه ولیک حاکی از آن بود که عصاره استونی، بالاترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل را دارا بود [۲۷].

در تمامی غلظت‌های مورد بررسی آنتی‌اکسیدان سنتزی از بالاترین فعالیت مهارکنندگی برخوردار بود. نتایج تحقیق حاضر با نتایج سان و همکاران (۲۰۱۱) و موک و همکاران (۲۰۱۲) همخوانی داشت. این محققین گزارش نمودند که فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH عصاره‌های گیاهی وابسته به غلظت بوده و با افزایش غلظت اثر مهارکنندگی شدت یافته است [۲۹ و ۳۰]. همچنین در بررسی فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH توسط عصاره‌های استخراجی با حلال‌های مختلف از برگ سیب‌زمینی شیرین حاکی از فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتر عصاره استونی بود [۳۱].

۳-۴- فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد ABTS و قدرت احیاءکنندگی آهن (FRAP)

فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد ABTS و قدرت احیاءکنندگی آهن (FRAP) عصاره استونی اناریجه در غلظت‌های ۰/۱۶-۰/۰۳٪ مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاکی از آن بود که عصاره استونی برگ اناریجه از فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی بر اساس آزمون‌های مهار رادیکال آزاد ABTS و قدرت احیاءکنندگی آهن به روش FRAP برخوردار است (جدول ۲). اگرچه به دلیل ماهیت متفاوت مواد اولیه و شرایط استخراج، امکان مقایسه مطلق با تحقیقات دیگر وجود ندارد، اما به نظر می‌رسد فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه اناریجه بالاتر از مقادیر گزارش شده برای عصاره گل گاو زبان بر مبنای آزمون FRAP (معادل ۱۱۳ میکرومولار سولفات آهن هفت آبه بر میلی لیتر عصاره) و مشابه با نتایج مهار رادیکال آزاد ABTS (معادل ۴/۶ میلی گرم ویتامینث بر میلی لیتر عصاره) در عصاره گل گاوزبان باشد [۳۲]. بر اساس تحقیقات محققان، فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS و نیز قدرت احیاءکنندگی آهن عصاره آبی برگ پونه کوهی و رزماریدر غلظت‌های ۵ و ۲۰ درصد عصاره، کمتر از مقادیر اندازه‌گیری شده برای عصاره اناریجه در این پژوهش است [۳۳]. بر اساس گزارش فو و همکاران (۲۰۱۶)، بیشترین قدرت احیاءکنندگی در بین عصاره‌های الکلی-آبی مختلف برگ سیب‌زمینی شیرین متعلق به عصاره استونی بود [۳۱]. در بررسی قدرت احیاءکنندگی عصاره متانولی اناریجه، نبوی و همکاران (۲۰۰۸) گزارش نموده‌اند که با افزایش غلظت میزان فعالیت احیاءکنندگی عصاره نیز افزایش یافت و قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره با ویتامینث قابل مقایسه بود [۱]. نتایج حاصل از این تحقیقات با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد.

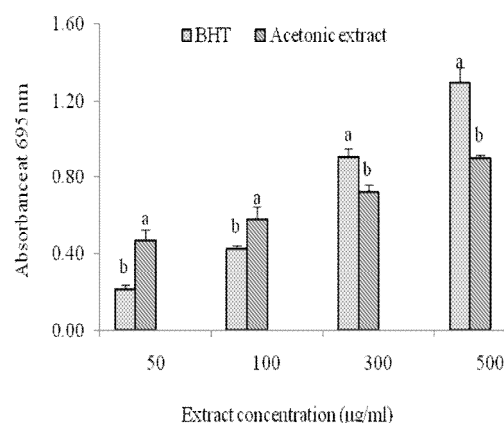


Fig 1 Total antioxidant activities of Enarijeh extract. BHT was used as positive control. Values with different letters in a concentration show a significant difference ($p < 0.05$).

۳-۳- فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH

مهار رادیکال‌های آزاد DPPH یکی از شناخته شده‌ترین مکانیسم‌هایی است که به واسطه آن ترکیبات آنتی‌اکسیدانی می‌توانند اکسایش چربی‌ها را مهار نمایند. در این روش، نتایج بر حسب درصد کاهش در میزان جذب محلول‌های DPPH در حضور عصاره نسبت به محلول DPPH فاقد عصاره بیان می‌گردد [۲۸]. نتایج نشان داد، غلظت عصاره‌های آنتی‌اکسیدان سنتزی تاثیر معنی‌داری بر میزان مهار رادیکال‌های آزاد داشت ($p < 0.05$). در محدوده غلظت ۲۵-۲۰۰ میکروگرم میلی‌لیتر، درصد فعالیت مهارکنندگی آنتی‌اکسیدان سنتزی، ۶۷/۶-۸۵/۹۵۵ درصد و عصاره استونی، ۸۲/۳۰۵-۸۷/۷۶ درصد اندازه‌گیری شد (شکل ۲).

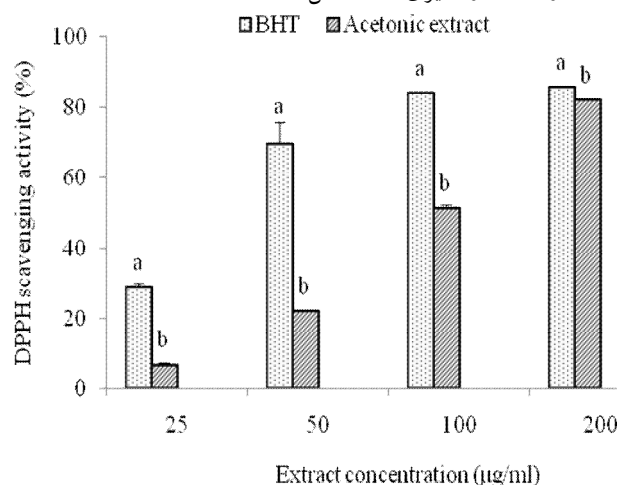


Fig 2 DPPH radical scavenging activities of Enarijeh extract. BHT was used as positive control. Values with different letters in a concentration show a significant difference ($p < 0.05$).

Table 3 Comparison of antioxidant properties of acetonic extract of Enarijeh in different concentrations.

Extract (%)	ABTS radical scavenging capacity (mg vitamin C equivalents/mL extract)	Ferric reducing ability (FRAP) ($\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ equivalents/mL extract)
0.03	2.1 ± 0.15^c	262 ± 3.74^c
0.1	4.63 ± 0.08^b	619 ± 1.7^b
0.16	5.1 ± 0.02^a	971 ± 13.7^a

Data are mean \pm SD (n = 3). Values with different letters in a column show a significant difference ($p < 0.05$).

ضد رادیکالی آن در مدل‌های مختلف آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفته است. بر مبنای نتایج محققان، اسید کلروژنیک و اسید کافئیک از فعالیت ضد رادیکالی بالاتری نسبت به سایر هیدروکسی سینامات‌ها برخوردار هستند؛ بطوریکه هر مولکول از آن‌ها قادر است حدود ۲ رادیکال پراکسی را مهار نماید. همچنین محققان گزارش نموده‌اند که اسید کلروژنیک به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قدرتمند در واکنش با رادیکال‌های آزاد، قادر به ایجاد محصولات پایدار و غیررادیکالی است [۳۹، ۴۰ و ۴۱].

Table 4 Individual phenolic acids in Enarijeh extract (mg/100g DM).

concentration	Phenolic acids	No.
0.12 ± 0.01	Gallic acid	1
401 ± 10.0	Chlorogenic acid	2
34 ± 3.2	Caffeic acid	3
0.6 ± 0.1	<i>p</i> -Coumaric acid	4
4.0 ± 0.2	Ferulic acid	5
nd	Gentisic Acid	6
nd	Syringic acid	7
nd	Protocatechuic acid	8

Values (means \pm SD); nd, not detected.

۴- نتیجه‌گیری کلی

این پژوهش برای اولین بار با هدف بررسی ویژگی‌های آنتی-اکسیدانی عصاره استخراجی از گیاه اناریجه بومی ایران با بهره-گیری از روش‌های متفاوت سنجش آنتی‌اکسیدانی شامل فولین-سیوکالته، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل، فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS و نیز قدرت احیاءکنندگی آهن، صورت گرفت. همچنین این مطالعه اولین کاربرد روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا جهت تعیین مقدار اسید کلروژنیک به عنوان فنل غالب موجود در سبزی اناریجه است. نتایج حاکی از فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضد رادیکالی بالای عصاره گیاه اناریجه به عنوان منبع در دسترس و بالقوه از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی می‌باشد. اثرات بالقوه آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی اسید کلروژنیک در مدل‌های آزمایشگاهی و آزمایشات بیولوژیکی حاکی از نقش موثر آن در

۳-۵- شناسایی و اندازه‌گیری کمی اسید فنلی

غالب

به منظور آنالیز کمی ترکیبات زیست فعال موجود در غذاها و نوشیدنی‌ها، چندین روش مورد استفاده قرار می‌گیرد؛ اما در هر صورت برای دستیابی به نتایج دقیق و صحیح، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا یکی از متداول‌ترین روش‌ها محسوب می‌گردد. جهت شناسایی اسید فنلی غالب موجود در سبزی اناریجه از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا استفاده شد. در بین انواع اسیدهای فنولی مورد بررسی شامل اسید وانیلیک، اسید گالیک، اسید کلروژنیک، اسید کافئیک، اسید پاراکوماریک، اسید فرولیک، اسید جنتیسیک، اسید سیرینجیک و اسید پروتوکاتچوئیک، تنها اسید کلروژنیک به عنوان غالب‌ترین ترکیب فنولی در عصاره استونی اناریجه شناسایی گردید (جدول ۴). اسیدهای فنولی، مشتقات هیدروکسی اسید بنزوئیک‌ها و اسید سینامیک‌ها می‌باشند. هیدروکسی اسید سینامیک‌ها به فراوانی در اغلب گیاهان یافت می‌شوند که متداول‌ترین این ترکیبات، اسید کلروژنیک، اسید کافئیک، اسید پاراکوماریک و اسید فرولیک می‌باشند. اما میزان هیدروکسی اسید بنزوئیک‌های گیاهان خوراکی به طور کلی بسیار پایین است. اختلاف این دو گروه از مشتقات در الگوهای هیدروکسیلاسیون و متوکسیلاسیون حلقه آروماتیک آن‌ها است. اکثر مطالعات مزایای سلامت بخش اسیدهای فنولی را با فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالای این ترکیبات مرتبط دانسته‌اند [۳۴ و ۳۵]. هیدروکسی اسید سینامیک‌ها از فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت به هیدروکسی اسید بنزوئیک‌ها برخوردارند و به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های شکننده زنجیره اکسایش عمل می‌نمایند. این فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا در مشتقات هیدروکسی اسید سینامیک‌ها ناشی از حضور یک زنجیره جانبی پروپنئیک است [۳۶، ۳۷ و ۳۸]. امروزه کاربرد اسید کلروژنیک در زمینه پزشکی، صنایع غذایی و صنایع شیمیایی لوازم آرایشی، رشد چشمگیری داشته است و فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ویژگی‌های

- of *Stevia rebaudiana* Bert. *FoodChemical Toxicology*, 47: 2338–2343.
- [10] Shahidi, F., and Zhong, Y. 2015. Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 18: 757-781.
- [11] Arabshahi-Delouee, S., and Urooj, A. 2007. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. *Food Chemistry*, 102: 1233-1240.
- [12] Slinkard, K., and Singleton, V.L. 1977. Total phenol analysis; automation comparison with manual methods. *American Journal of Enology Viticulture*, 28: 49-55.
- [13] 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.
- [14] Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., and Nakamura, T. 1992. Antioxidative properties of xanthin on auto oxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Agricultural Food Chemistry*, 40: 945-948.
- [15] Gómez-Estaca, J., Giménez, B., Montero, P., and Gómez-Guillén, M.C. 2009. Incorporation of antioxidant borage extract into edible films based on sole skin gelatin or a commercial fish gelatin. *Journal of Food Engineering*, 92: 78–85.
- [16] Gómez-Guillén, M.C., Ihl, M., Bifani, V., Silva, A., and Montero, P. 2007. Edible films made from tuna-fish gelatin with antioxidant extracts of two different murta ecotypes leaves (*Ugni molinae* Turcz.). *Food Hydrocolloids*, 21: 1133-1143.
- [17] Kwok, C.Y., Wong, C.N.Y., Mabel, Y.C.Y., Yu, P.H.F., Au, A.L.S., Poon, C.C.W., Seto, S.W., Lam, T.Y., Kwan, Y.W., and Chan, S.W. 2010. Consumption of dried fruit of *Crataegus pinnatifida* (hawthorn) suppresses high-cholesterol diet-induced hypercholesterolemia in rats. *Journal of Functional Foods*, 2: 179-186.
- [18] Wen, D., Li, C., Di, H., Liao, Y., and Liu, H. 2005. A Universal HPLC Method for the Determination of Phenolic Acids in Compound Herbal Medicines. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 53: 6624-6629.
- جلوگیری از بیماری‌های قلبی و عروقی است. لذا لزوم تحقیقات بیشتر به منظور دستیابی به شواهد علمی مبنی بر مزایای سلامت بخش عصاره اناریجه جهت کاربرد در صنعت دارو و غذاهای عملکردی مطرح می‌گردد.
- ## ۵- منابع
- [1] Nabavi, S.M., Ebrahimzadeh, M.A., Nabavi, S.F., and Jafari, M. 2008. Free radical scavenging activity antioxidant capacity of *Eryngium caucasicum* Trautv and *Froripia subpinnata*. *Pharmacology online*, 3: 19-25.
- [2] Rustaiyan, A., Mojab, R., Kazemie-Piersara, M., Bigdeli, M., Masoudi, S.H., and Yari, M. 2001. Essential Oil of *Froriepia subpinnata* (Ledeb.) Baill. from Iran. *Journal of Essential Oil Research*, 13: 405-406.
- [3] Mousavi-Tabari, A., Nemati, F., and Peyravi-Ghadikalae, F. 2014. Evaluation of the toxic effects of *Froriepia subpinnata* on cancer cell line Hela. The 1st National Congress on Biology Natural Sciences of Iran [in Persian].
- [4] Ivanišová, E., Tokár, M., Mocko, K., Bojňanská, T., Mareček, J., and Mendelová, A. 2013. Antioxidant activity of selected plant products. *Journal of Microbiology, Biotechnology Food Sciences*, 2: 1692-1703.
- [5] Foti, M.C. 2007. Antioxidant Properties of Phenols. *Journal of Pharmacy Pharmacology*, 59: 1673-1685.
- [6] Shahidi, F., and Zhong, Y. 2007. Measurement of antioxidant activity in food biological systems. In F. Shahidi and C. T. Ho (Eds.), *Antioxidant measurement applications* (pp. 36–66). ACS symposium series 956. Washington, DC: American Chemical Society.
- [7] Choe, E., and Min, B.D. 2009. Mechanisms of antioxidants in the oxidation of food. *Comprehensive review in food science food safety*, 8: 345-358.
- [8] Sahreen, S., Rashid Khan, M., and Ali Khan, R. 2010. Evaluation of antioxidant activities of various solvent extracts of *Carissa opaca* fruits. *Food Chemistry*, 122: 1205-1211.
- [9] Shukla, Sh., Mehta, A., Bajpai, V.K., and Shukla, S. 2009. In vitro antioxidant activity total phenolic content of ethanolic leaf extract

- characterization antioxidant potential. *Food Chemistry*, 101: 549-558.
- [29] Sun, L., Zhang, J., Lu, X., Zhang, L., and Zhang, Y. 2011. Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves. *Food Chemical Toxicology*, 49: 2689-2696.
- [30] Mok, S.Y., Choi, M.J., Kim, J., Cho, E.J., and Lee, S. 2012. Antioxidant activity of the methanolic extract of the newly generated vegetable, baemuchae (*xBrassicoraphanus*). *Food Chemical Toxicology*, 50: 848-853.
- [31] Fu, Z., Tu, Z., Zhang, L., Wang, H., Wen, Q., and Huang, T. 2016. Antioxidant activities polyphenols of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) leaves extracted with solvents of various polarities. *Food Bioscience*, 15: 11-18.
- [32] Gómez-Estaca, J., Montero, P., Fernández-Martin, F., and Gómez-Guillén, M.C. 2009. Physico-chemical film forming properties of bovine-hide tuna-skin gelatin: a comparative study. *Journal of Food Engineering*, 90: 480-486.
- [33] Gómez-Estaca, J., Bravo, L., Gómez-Guillén, M. C., Alemán, A., and Montero, P. 2009. Antioxidant properties of tuna-skin bovine-hide gelatin films induced by the addition of oregano rosemary extracts. *Food Chemistry*, 112: 18-25.
- [34] Mattila, P. and Hellström, J. 2007. Phenolic acids in potatoes, vegetables, some of their products. *Journal of Food Composition Analysis*, 20: 152-160.
- [35] Bondia-Pons, I., Aura, A.M., Vuorela, S., Kolehmainen, M., Mykkänen, H. and Poutanen, K. 2009. Review rye phenolics in nutrition health. *Journal of Cereal Science*, 49: 323-336.
- [36] Natella, F., Nardini, M., Di Filici, M. and Scaccini, C. 1999. Benzoic acid cinnamic acid derivatives as antioxidants, structure-activity relation. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 47: 1453-1459.
- [37] Reasen, M.F., Lbo, A.K., Christensen, L.P., Hansen, A. and Meyer, A.S. 2001. Antioxidant effects of phenolic rye (*Secale cereale* L.) extracts, monomeric hydroxycinnamates, ferulic acid dehydrodimers on human low-density lipoproteins. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 49: 4090-4096.
- [19] Ebrahimzadeh, M.A., Nabavi, S.F., Nabavi, S.M., and Pourmorad, F. 2010. Nitric oxide radical scavenging potential of some Elburz medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, 9: 5212-5217.
- [20] Dragovic-Uzelac, v., Levaj, B., Mrkic, V., Bursak, D., and Boras, M. 2007. The content of polyphenols carotenoids in three apricot cultivars depending on stage of maturity geographical region. *Food Chemistry*, 102: 966-975.
- [21] Faller, A.L.K., and Fialho, E. 2009. The antioxidant capacity polyphenol content of organic conventional retail vegetables after domestic coking. *Food Research International*, 42: 210-215.
- [22] Spigno, G., and De Faveri, D. M. 2007. Antioxidants from grape stalks marc: influence of extraction procedure on yield, purity antioxidant power of the extracts. *Journal of Food Engineering*, 78: 793-801.
- [23] Chirinos, R., Rogez, H., Campos, D., Pedreschi, R., and Larondelle, Y. 2007. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz Pavon) tubers. *Separation Purification Technology*, 55: 217-225.
- [24] Mohsen, S.M., and Ammar, A.S.M. 2009. Total phenolic contents antioxidant activity of corn tassel extracts. *Food Chemistry*, 112: 595-598.
- [25] Li, J.W., Ding, S.D., and Ding, X.I. 2005. Comparison of antioxidant capacities of extracts from five cultivars of Chinese jujube. *Process Biochemistry*, 40: 3607-3613.
- [26] Jayaprakasha, G.K., Girennavar, B., and Patil, B.S. 2008. Radical scavenging activities of Rio Red grapefruits Sour orange fruit extracts in different in vitro model systems. *Bioresource Technology*, 99: 4484-4494.
- [27] Salmanian, S., Sadeghi-Mahoonak, A.R., Alami, M., and Ghorbani, M. 2012. Antioxidant properties of hawthorn fruit (*Crataegus elbursensis*) evaluation of its antioxidant activity in oil. [Thesis]
- [28] Ferreres, F., Sousa, C., Valento, P., Seabra, R.M., Pereira, J.A., and Rade, P.B. 2007. Tronchuda cabbage (*Brassica oleracea* L. var. costata DC) seeds: phytochemical

- activity relationship. *Food Chemistry*, 104: 132–139.
- [41] Hotta, H., Nagano, S., Ueda, M., Tsujino, Y., Koyama, J., and Osakai, T. 2002. Higher radical scavenging activities of polyphenolic antioxidants can be ascribed to chemical reactions following their oxidation. *Biochim Biophys Acta*, 1572: 123–132.
- [38] Vuorela, S., Meyer, A.S. and Heinonen, M. 2004. Impact of isolation method on the antioxidant activity of rapeseed meal phenolics. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 52: 8202–8207.
- [39] Marinova, E. M., Toneva, A., and Yanishlieva, N. 2009. Comparison of the antioxidative properties of caffeic chlorogenic acids. *Food Chemistry*, 114: 1498–1502.
- [40] Cheng, J., Dai, F., Zhou, B., Yang, L., and Liu, Z. 2007. Antioxidant activity of hydroxycinnamic acid derivatives in human low density lipoprotein: Mechanism structure-

Determination of amounts, antioxidant properties and identification of main phenolic compound in Enarijeh(*Froriepiasubpinnata*)extract by RP-HPLC method

Salmanian, Sh. ¹, Sadeghi Mahoonak, A. R. ^{2*}, Jamson, M. ³

1. Ph.D Student, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad
2. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Science & Natural Resources, University of Gorgan
3. MSc. graduated student, Department of Food Science & Technology, Damghan University

(Received: 2017/08/19 Accepted:2017/12/02)

Enarijeh(*Froriepiasubpinnata*) is an endemic plant with widespread distribution in woody region in the North of Iran. This study was conducted for the first time to evaluate antiradical antioxidant properties of Enarijeh extract using different tests (Folin-Ciocalteu, total antioxidant capacity, DPPH and ABTS free radicals scavenging as well as reducing power), identification, and measuring predominant phenolic acid in the extract using high- performance liquid chromatography. All the evaluations exhibited appreciable antioxidant potential for the extract ($p < 0.05$). It showed various degrees of efficiency in each assay in a dose-dependent manner. Total antioxidant activities of Enarijeh extract in concentrations less than 0.03% were more than BHT as a synthetic antioxidant. So that in the concentration of 50 $\mu\text{g/ml}$ the antioxidant ability of the extract BHT was 0.47 and 0.22 $\mu\text{g/ml}$, respectively. It should be pointed out that the occurrence of chlorogenic acid (5-O-caffeoylquinic acid, 5CQA) as predominant phenolic acid in Enarijeh was detected for the first time. On the basis of obtained results, Enarijeh may be introduced as a rich novel source of natural antioxidants for food drug industry.

Keywords: *Froriepia subpinnata*. Phenolic compounds, Chlorogenic acid, Antioxidant activity, HPLC.

* Corresponding Author E-Mail Address: sadeghiaz@gau.ac.ir