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- دانشیارگروه 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 DPPHو ABTS و نیز قدرت احیاءکنندگی آهن) و همچنین شناسایی و اندازه گیری 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 ($p<۰/۰۵$)و فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی وابسته به غلظت را نشان داد. در غلظت‌هایکمتر از ۰/۰۳ درصد، عصاره استخراجی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری را نسبت به آنتی‌اکسیدان سنتزی به خود اختصاص داد؛ بطوریکه در غلظت ۵۰میکروگرم در میلی‌لیترتوانایی 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.

*مسئول مکاتبات: Sadeghiaz@gau.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-06]

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 شده‌است. 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 (۸۸/۸٪) گزارش شده‌است [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، کومارین-ها، لیگنان‌ها، استیلبن‌ها، تانن‌ها)، ترکیبات نیتروژنی (آلکالوئیدها، آمین‌ها، بتالائین‌ها)، ویتامین‌ها (C و E) و ترپنوئیدها (مانند کاروتنوئیدها) با فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی می‌باشند [٤] که به‌تازگی توجه رو به رشدی در ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی برخی از این ترکیبات، بویژه فنل‌ها، جهت خنثی-سازی یا به تاخیراندازی اثرات منفی رادیکال‌های آزاد، گزارش شده‌است [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 [٦ 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 منشا طبیعی و جایگزینی آن با انواع سنتزی، به میزان زیادی مورد توجه محافل علمی قرارگرفته است. روش-های 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 اندازه-گیری 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 DPPHو ABTS ونیز 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 شیمیائی عصاره‌های گیاهی بسیار پیچیده است و از ترکیبات مختلف با قطبیت و عملکردهای متفاوت تشکیل شده‌است،لذاارزیابی 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 اینپژوهش،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 ٤٠ درجه سانتی‌گراد خشک

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-06]

گردیدند و توسط آسیاب به ذرات بسیار ریز تبدیل و از الک با مش ٤٠ 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 ٢٤ 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- سیوکالتهاندازه‌گیری شد [۱۲]. در این روشمیزان ۲۰ میکرولیتر از محلول عصاره با ۱/۱٦۰ میلی‌لیترآب 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 ٤٠ درجه سانتی‌گراد قرارگرفته و پس از گذشت ۳۰ دقیقه جذب آن‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷٦۰ نانومتر خوانده شد. جهت رسم منحنی استاندارد از اسید گالیک استفاده شد. میزان کل ترکیبات فنلی موجود در عصاره با استفاده از معادله به‌دست آمده از منحنی استاندارد ($Y=۰/۰٦٦۹\ x + ۰/۰۱۱٦, r^۲=۰/۹۹۸۷$) محاسبه و نتایج بر حسب میلی‌گرم اسید گالیک در هرگرم عصاره بیان شد.

۲-۳- ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل[1](روش TAC)

در این روش محلول‌هایی با غلظت‌های مختلف (۵۰، ۱۰۰، ۳۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) از پودر عصاره و نیز آنتی‌اکسیدان سنتزی BHTبه ترتیب در حلال‌استخراجی و متانول آماده شدند. میزان ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول عصاره با ۱ میلی‌لیتر از معرف (اسید سولفوریک ۰/٦ مولار، فسفات سدیم ۲۸ میلی‌مولار و آمونیوم مولیبدات ٤ 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 ٦۹۵ نانومتر خوانده شد. در نمونه کنترل به جای عصاره از ۰/۱ میلی‌لیتر حلال مصرفی استفاده شد [۱۳].

۲-٤- قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH

جهت بررسی توانایی ضدرادیکالی عصاره‌ها، محلول‌هایی با غلظت‌های مختلف (۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) از پودرعصاره‌و نیز آنتی‌اکسیدان‌سنتزی BHTدر 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 قرارگرفتند و بعد از این مدت، میزان جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. لازم به‌ذکر است که در نمونه کنترل، عصاره با ۳ میلی‌لیتر متانول جایگزین شد. در نهایت درصد مهار رادیکال‌های DPPHتوسط عصاره، با رابطه زیر محاسبه گردید [١٤].

((جذب کنترل–جذب نمونه) / جذب کنترل) × ۱۰۰ = درصد مهار رادیکال آزاد

رابطه (۱)

۲-۵- قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد ABTS

توانایی مهار رادیکال آزادABTS به روش گومزایستاکا و همکاران (۲۰۰۹)انجام شد. پس از تهیه محلول‌های ۷ میلی-مولار ABTSو ۲/٤۵ میلی‌مولار پتاسیم پرسولفات، حجم ۹ میلی‌لیتر از محلول ABTSبه حجم ۳ میلی لیتر محلول پتاسیم پرسولفات اضافه شد. محلول حاصل به مدت ١٦ ساعت در مکان تاریک قرار گرفت. پس از طی این مدت،محلول ABTSبرای رسیدن به جذب ۰/۷ در طول موج ۷۳٤ نانومتر با آب دیونیزه رقیق شد.آب دیونیزه به عنوان نمونه بلانک مورد استفاده قرار گرفت. آنگاه ۳ میلی لیتر محلول ABTS(با جذب اولیه۰/۰۲±۰/۷) به داخل کووت ریخته و در دستگاه

1. Total Antioxidant Capacity

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-06]

اسپکتروفتومتر قرار داده شد. سپس ٦٠ میکرولیتر محلول نمونه (در غلظت‌های مختلف ٠/١٦-٠/٠٣٪) به ٢٩٤٠ میکرولیتر از محلول ABTSاضافه،مخلوط به خوبی ورتکس شد. بعد از ٣ دقیقه، جذب محلول (جذب نهایی) تعیین گردید و درصد بازدارندگی طبق رابطه زیر محاسبه شد [١٥].

درصد بازدارندگی=(جذب اولیه -جذب نهایی/جذب اولیه) ×١٠٠

رابطه (٢)

برای رسم منحنی استاندارد نیز محلول استوک (پایه) اسید آسکوربیک با غلظت ٠/١ گرم بر ١٠٠ میلی‌لیتر تهیه شد. سپس محلول استوک برای تهیه غلظت‌های ٠/٠٠٥ تا ٠/٠٦ گرم بر ١٠٠ میلی‌لیتر رقیق شد. مراحل آزمون ABTSمشابه روش بالاانجام شد. درصد بازداری برای غلظت‌های مختلف اسید آسکوربیک به عنوان نمونه استاندارد، محاسبه گردید. منحنی استاندارد درصد بازدارندگی در برابر غلظت اسیدآسکوربیک (گرم بر ١٠٠ میلی‌لیتر) رسم شد. با قراردادن مقدار درصدبازدارندگی نمونه‌ها در معادله مربوط به منحنی استاندارد اسیدآسکوربیک، توانایی مهار رادیکال آزادABTSعصاره‌ها محاسبه شد. داده‌ها بر اساس معادل میلی‌گرم ویتامین Cبر گرم وزن تر گیاه بیان گردیدند.

٢-٦- قدرت کاهندگی آهن[2](روش FRAP)

فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره بر اساس توانایی احیاءکنندگی آهن سه ظرفیتی به روش گومزگلن و همکاران (٢٠٠٧)همراه با تغییراتی انجام شد. برای این منظور، محلول‌هایی با غلظت‌های مختلف از عصاره‌های پودر شده در آب تهیه گردید. سپس به ١٠٠ میکرولیتر از عصاره ٣ میلی‌لیتر معرف FRAPاضافه شد. مخلوط حاصل به خوبی ورتکس گردید و به مدت ٤ دقیقه در حمام آبی با دمای ٣٧°C انکوبه شد. آنگاه جذب محلول‌ها در طول موج ٥٩٣ نانومتر نسبت به شاهد (شامل ١٠٠ میکرولیتر آب مقطر همراه با ٣ میلی‌لیتر معرفFRAP)، 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 [١٦].

2. Ferric Reducing Antioxidant Power

٢-٧- 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 (٢٠١٠)با کمی تغییرات انجام پذیرفت[١٧]. بدین صورت که پودر خشک گیاه با نسبت ١:٣٠ با حلال استون ٨٠٪ (وزنی: حجمی) مخلوط و به مدت ١٢ ساعت در انکوباتور شیکردار با دمای ٢٥ 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 ٣٠ 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 ١٠٠٠، ستون آر پی C18 با ابعاد ٤/٦ × ٢٥٠ میلی‌متر و اندازه ذرات ٥ میکرومتر) انجام شد. میزان ٢٠ میکرولیتر از عصاره بعد از عبور از فیلتر ٠/٢ میکرون به ستون HPLC تزریق گردید. سیستم مورد استفاده در این بررسی گرادیان و فاز متحرک شامل آب با ٠/٠٢٪ تری فلورواستیک اسید (حلال ١) و متانول با ٠/٠٢٪ تری فلورواستیک اسید (حلال٢)، سرعت جریان فاز متحرک در ستون ٠/٥ میلی‌لیتر در هر دقیقه، دمای ستون ٢٥ درجه‌سانتی‌گراد و طول موج‌های مورد بررسی ٢٨٠ و٣٢٠ نانومتر (دتکتورPDA) بود. جهت شناسایی نوع اسیدهای فنلی از استانداردهای اسید گالیک، اسید کلروژنیک، اسید کافئیک، اسید پاراکوماریک، اسید فرولیک، اسید جنتیسیک، 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[١٨].

٢-٨- 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

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-06]

افزار SASنسخه ۹/۱ و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ ٪ انجام شد و نمودارها با نرم افزار Excel 2010رسم 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 گالیکگزارش گردید (جدول ۱). نتایج آنالیز واریانس مقایسه میانگین‌های ترکیبات فنلی استخراجی نشان داد، دمای مورد استفاده جهت استخراج، تأثیر معنی‌داری ($p<$ ۰/۰۵) بر مقدار ترکیبات فنلی عصاره‌ها دارد؛درحالی‌که اثر نوع حلال‌های الکلی بر میزان استخراج ترکیبات فنلی در هر دو سطح دمایی، تقریبا مشابه است و تنها نسبت به حلال آبی این اختلاف معنی‌دار بود.همچنین افزایش دما منجر به افت میزان کل این ترکیبات گردید که احتمالا ناشی از حضور ترکیبات حساس به حرارت است.

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

Sample	Temperature	
	25 ºC	50 ºC
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^{c}

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

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

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).

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 ترکیباتفنلیموجود 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 نگهداریمی‌باشد[۲۰ و ۲۱].همچنین محتوای فنلیتحت 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 عموما جهت استخراج فنل‌هاازمنابعطبیعی مورد استفاده قرار می‌گیرند؛ بویژه مخلوط‌های الکل-آب، گرچه این حلال‌ها به صورت 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 تشکیلیک 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 قندهایمحلول می-باشد که می‌توانند در تشخیص و تعیین مقدار ترکیبات فنولی تداخل ایجاد نمایند. اتانول، متانول و استون از رایج ترین حلال های 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

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-06]

عصاره‌های آنتی‌اکسیدانی مورد استفاده قرار می‌گیرد. روش فولین-سیوکالته از متداول‌ترین روش‌های اندازه گیریمحتوای فنل کل می‌باشد. اساس کار در این روش، احیاء معرف فولین توسط ترکیبات فنلی در محیط قلیایی (احیاء یون مولیبدن ٦ ظرفیتی به مولیبدن ٥ 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 [١٠].

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-سیوکالتهیک سنجش قطعی از مقدار فنل کل نیست. انواع مختلفی از ترکیبات فنلی وجود دارند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌هابستگی به ساختار آن‌هادارد. معرففولین-سیوکالته به صورت غیراختصاصی با ترکیبات فنلی واکنش می‌دهد. علاه براین، بجز ترکیبات فنلی، سایر ترکیبات موجود در عصاره نظیر قندها، آمینواسیدها، اسیدهای آلی، آمین‌های آروماتیک و ویتامین‌ها نیز قادر به احیاء این معرف می‌باشند[٢٤].با توجه به اینکه عصاره استونی گیاه در ترکیب با حلال استونی قابلیت انکپسوله 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 آنتی اکسیدانی، مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

٣-٢- ظرفیت آنتی اکسیدانی کل

اساس کار در این روش احیاء مولیبدن ٦ ظرفیتی به مولیبدن ٥ ظرفیتی در محیط اسیدی و دمای بالا است. این واکنش با تشکیل کمپلکس‌های بسیار پایدار سبز رنگ فسفو مولیبدن همراه بوده که تحت تاثیر حلال مورد استفاده جهت استخراج ترکیبات فنلی قرار نمی‌گیرد [١٣].نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره وآنتی‌اکسیدان سنتزیBHTوجود دارد ($p<$ ٠/٠٥). در محدوده غلظتی ٥٠٠-٥٠ میکروگرم در میلی‌لیتر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل آنتی-اکسیدان سنتزی و عصاره استونی اناریجه به ترتیب در محدوده١/٢٩- ٠/٢٢ و ٠/٩١- ٠/٤٧ تعیین گردید (شکل ١).نتایج حاکی از آن بود که با افزایش غلظت عصاره، فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل افزایشیافت.در غلظت‌هایکمتر از ٣٠٠ میکروگرم در میلی‌لیتر(٠/٠٣٪) 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 فسفومولیبدنیوم 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 [١١]. 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 (٢٠٠٥)، هیچ همبستگی معنی‌داری بین مقدار فنل کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های عناب چینی نیافتند[٢٥]. از این رو می‌توان بیان نمود که فعالیت آنتی‌اکسیدانی علاوه بر ترکیبات فنلی، می‌تواند احتمالا به دلیل حضور ترکیبات فیتوشیمیایی دیگر همچون اسیدآسکوربیک، توکوفرول‌ها و پیگمان‌ها و نیز اثرات سینرژیستی آن‌ها باشد که در فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل شرکت می‌کنند [٢٦]. نتایج این پژوهش با نتایج سلمانیان و همکاران (٢٠١٢) 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 [٢٧].

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-06]

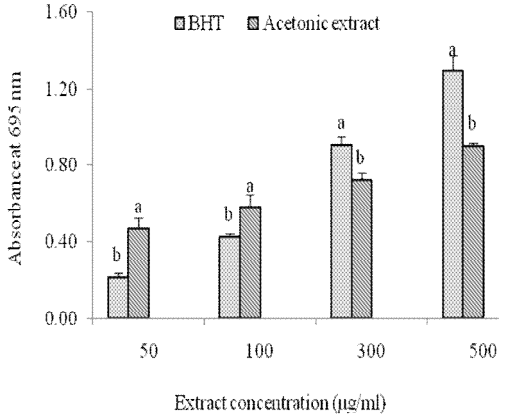

Fig 1 Total antioxidant activities of Enarijeh extract. BHT was used as positive control. Values with different letters in a concentration show a significant difference ($p< 0.05$).

۳-۳- فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH

مهار رادیکال‌های آزاد DPPH یکی از شناخته شده‌ترین مکانیسم‌هایی است که به واسطه آن ترکیبات آنتی‌اکسیدانی می-توانند اکسایش چربی‌ها را مهار نمایند. در این روش، نتایج بر حسب درصد کاهش در میزان جذب محلول‌هایDPPHدر حضور عصاره نسبت به محلول DPPH فاقد عصاره بیان می-گردد [۲۸]. نتایج نشان داد، غلظت عصارهو آنتی‌اکسیدان‌سنتزی تاثیر معنی‌داری بر میزان مهار رادیکال‌های آزاد داشت($p<$۰/۰۵). در محدوده غلظت ۲۰۰- ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر، درصد فعالیت مهارکنندگی آنتی‌اکسیدان سنتزی، ۸۵/۹۵۵- ۲۸/۹۳۵ درصد و عصاره استونی، ۸۲/۳۰۵- ۶/۷۶ درصد اندازه گیری شد (شکل ۲).

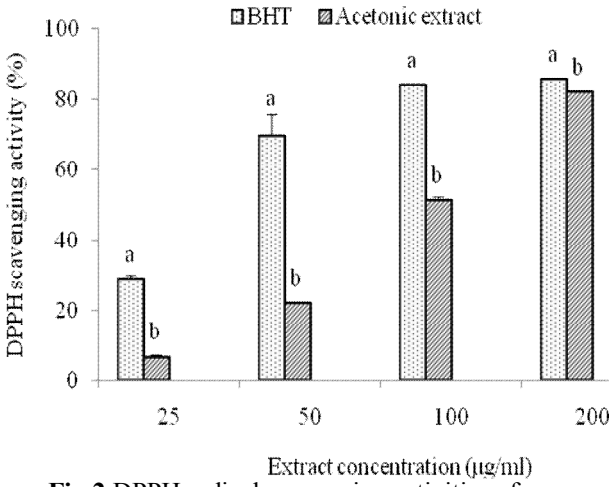

Fig 2 DPPH radical scavenging activities of Enarijeh extract. BHT was used as positive control. Values with different letters in a concentration show a significant difference ($p< 0.05$).

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 DPPHعصاره‌های 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 حلال-های مختلف از برگ سیب‌زمینی شیرین حاکی از فعالیت آنتی-اکسیدانی بالاتر عصاره استونی بود [۳۱].

۳-٤- فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد ABTSو قدرت احیاءکنندگی آهن (FRAP)

فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد ABTSو قدرت احیاءکنندگی آهن (FRAP) عصاره استونی اناریجه در غلظت‌های ۰/۱٦-۰/۰۳٪ مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاکی از آن بود که عصاره استونی برگ اناریجه از فعالیت آنتی اکسیدانی بالایی بر اساس آزمون‌های مهار رادیکال آزاد ABTSو 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 به‌نظر 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 برمیلی لیتر عصاره) و مشابه با نتایج مهار رادیکال آزاد ABTS(معادل ٤/٦ میلی‌گرم 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 (۲۰۱٦)، 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 ویتامین ث قابل مقایسه بود [۱]. نتایج حاصل از این تحقیقات با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-06]

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) (μmol $FeSO_4.7H2O$ 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 ± SD (n = 3). Values with different letters in a column show a significant difference (p< 0.05).

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 کارائی بالا یکی از متداول‌ترین روش‌ها محسوب می‌گردد. جهت شناسایی اسید فنلی غالب موجود در سبزی اناریجه از کروماتوگرافی مایع با کارائی 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 (جدول٤). اسیدهای فنولی، مشتقات هیدروکسی اسید بنزوئیک‌ها و اسید سینامیک‌هامی‌باشند. 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 سلامت‌بخش اسیدهای فنولی را با فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالای این ترکیبات مرتبط دانسته‌اند[٣٤ و ٣٥]. 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 پروپنوئیک است [٣٦، ٣٧ و ٣٨]. امروزه کاربرد اسید کلروژنیک در زمینه پزشکی،صنایع غذایی و صنایع شیمیایی لوازم آرایشی، رشد چشمگیری داشته است و فعالیت آنتی اکسیدانی و ویژگی‌های ضدرادیکالی 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[٣٩، ٤٠ و ٤١].

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	*p*-Coumaric acid	4
4.0 ± 0.2	Ferulic acid	5
nd	Gentisic Acid	6
nd	Syringic acid	7
nd	Protocatechuic acid	8

Values (means ± SD); nd, not detected.

٤- 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 کارائی بالا جهت تعیین مقدار اسید کروژنیک به عنوان فنل غالب موجود در سبزی اناریجه است. نتایج حاکی از فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضدرادیکالی بالای عصاره گیاه اناریجه به عنوان منبع در دسترس و بالقوه از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی می‌باشد. اثرات بالقوه آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی اسید کلروژنیک در مدل‌های آزمایشگاهی و آزمایشات بیولوژیکی حاکی از نقش موثر آن در

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-06]

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 عملگر 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, SH., 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-Ghadikalaee, 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, MC. 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 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, VL. 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.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-06]

[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*) evalution of its antioxidant activity in oil. [Thesis]

[28] Ferreres, F., Sousa, C., Valento, P., Seabra, R.M., Pereira, J.A., andRade, P.B. 2007. Tronchuda cabbage (*Brassica oleracea* L. var. costata DC) seeds: phytochemical characterization antioxidant potential. *FoodChemistry*, 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-Martín, 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.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-06]

[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-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.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-06]

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 Enarijehextract using different tests (Folin-Ciocalteu, total antioxidant capacity, DPPH and ABTS free radicals scavenging as well as reducing power), identification, and measuringpredominant phenolic acid in the extractusing 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 asa synthetic antioxidant. So that in theconcentration of 50 µg/ml the antioxidant ability of the extract BHT was 0.47 and 0.22 µg/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, Enarijehmay 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

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-06]