

مقایسه روش های استخراج با حلال و آب زیر بحرانی بر ویژگی های ضد اکسیداتیو و ضد میکروبی عصاره دارچین

سپیده سهراب پور^{۱*}، رضا اسماعیل زاده کناری^۲، زینب رفتنی امیری^۲

۱- دانش آموزانه کارشناسی ارشد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، دانشکده مهندسی و زراعی

۲- دانشیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، دانشکده مهندسی و زراعی

(تاریخ دریافت: ۹۷/۰۵/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۱/۰۹)

چکیده

در دهه اخیر استفاده از افزودنی های طبیعی جایگزین برای ترکیبات سنتزی و شیمیایی مورد استفاده در صنایع غذایی، اهمیت بسزایی داشته است. از سوی دیگر به دلیل مشارکت ترکیبات فنولی در فعالیت آنتی اکسیدانی هدف پژوهش حاضر اندازه گیری میزان کل این ترکیبات و توکوفرول کل، با استفاده از آزمون های سه گانه اندازه گیری قدرت مهار رادیکال های آزاد DPPH، توان احیاء آهن و رنگبری بتاکاروتن در عصاره دارچین استخراج شده به دو روش غرقابو آب زیر بحرانی و همچنین ارزیابی ویژگی های ضد میکروبی این عصاره ها بر روی هر دو گونه باکتری های گرم منفی و گرم مثبت است. نتایج حاصل نشان دادمقادیر ترکیبات فنولی و توکوفرولی کل حاصل از روش های استخراج مختلف، از نظر آماری باهم اختلاف معنی داری داشتند ($p < 0.05$). بطوری که عصاره حاصل از روش غرقابی حاوی ترکیبات فنولی بیشتر (30.35 ± 1.13 GAE/ml) و عصاره آب زیر بحرانی دارای ترکیبات توکوفرولی بیشتری (20.86 ± 0.5 ml/kg) بود. نتایج آزمون های آنتی اکسیدانی سه گانه انجام شده نیز نشان دهنده فعالیت ضد اکسیداتیو بالاتر عصاره روش غرقابی می باشد. قدرت رقابت آنتی اکسیدانی هر دو عصاره در آزمون های سه گانه در مقایسه با TBHQ بسیار متفاوت بود. نتایج آزمون ضد میکروبی نشان داد که کمترین غلظت عصاره روش غرقابی (500 ppm) اثر کشندگی بر کلیه میکروارگانیسم های مطالعه شده داشت، در حالی که عصاره آب زیر بحرانی در غلظت های متفاوت بر باکتری های مختلف اثر کشندگی خود را اعمال نمود. بطوری که، غلظت 500 ppm تنها قادر به از بین بردن باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس بود. بر اساس نتایج کلی حاصل از این پژوهش، عصاره های حاصل از دارچین می تواند جایگزین بسیار مناسبی برای مواد شیمیایی ضد میکروبی و آنتی اکسیدان های سنتزی در صنایع غذایی گردد.

کلید واژگان: آب زیر بحرانی، غرقابی، فعالیت ضد اکسیداتیو، فعالیت ضد میکروبی، عصاره دارچین

۱- مقدمه

استخراج باحلال و یا روشهای نوینی چون استخراج با آب زیر بحرانی اشاره نمود [۹].

هدف مطالعه پیش رو، بررسی اثر روشهای استخراج با حلال (SO) و آب زیر بحرانی (SWE^۴) بر ویژگیهای آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی عصاره هیدروالکلی دارچین می باشد. بدین منظور عصاره های استخراج شده مورد بررسی های مختلف تعیین میزان کل ترکیبات فنولی و توکوفرولی، آزمونهای سه گانه تعیین قدرت ضد اکسیداتیو به روش های مهار رادیکال آزاد DPPH، احیاء فریک FRAP^۵ و رنگبری بتاکاروتن BCB^۶ قرار گرفته اند و به منظور ارزیابی خصوصیات ضد میکروبی آنها، آزمونهای کمی و کیفی تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی بر روی هر دو گونه باکتریایی گرم مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سوبتیلیس) و گرم منفی (اشرشیاکلی و سودوموناس آنروژینوزا) انجام گرفت که نتایج، بیان کننده قدرت بالای آنتی رادیکالی و ضد میکروبی عصاره های مورد مطالعه در مقایسه با ترکیبات سنتزی و شیمیایی میباشد.

۲- مواد و روشها

۲-۱- واکنشگرها و استانداردها

۱-۱- دیفنیل-۲-۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH)^۳، ۲-۲- بی پیریدین، تری کلرواستیک اسید (TCA)^۸، واکنشگر فولین سیوکالتیو، کربنات سدیم، اسیدگالیک، ترتیاری بوتیل هیدروکسی کوئینون (TBHQ)^۷، بافر فسفات، فریسینایدپتاسیم، فریک کلراید، تولون، بتاکاروتن، لینولئیک اسید، تووین و کلروفرم از شرکت سیگما-آمریکا خریداری گردیدند. پودر دارچین مورد استفاده، از مرکز طب سنتی ساری، مازندران، ایران تهیه گردید. میکروارگانسیمهای پاتوژن مورد مطالعه شامل استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC1431)، باسیلوس سوبتیلیس (PTCC1015)،

واکنش اسیدهای چرب غیراشباع از طریق یک مکانیسم زنجیره ای با اکسیژن، منجر به فرآیند پیچیده ای می گردد که تحت عنوان اکسایش شناخته می شود و رادیکالهای آزاد تولید شده در این واکنش، منجر به کاهش کیفیت مواد غذایی می گردند [۱].

مطالعات انجام گرفته بسیار زیادی در سطح جهان، خطرات ناشی از مصرف آنتی اکسیدان های سنتزی از جمله BHA^۱ و BHT^۲ را به اثبات رسانده اند و از آنجایی که این ترکیبات دارای اثرات سمی بر روی سلامتی انسان هستند، جایگزین کردن آنها با ترکیبات مشابه طبیعی و ایمن در مواد غذایی، امریست که توجه بسیاری از محققان را به خود معطوف داشته است [۲]. امروزه، تمرکز عمده محققین در این زمینه، بر استفاده از آنتی اکسیدانهای طبیعی و بدون خطر از منابع گیاهی، حیوانی، میکروبی و غذایی می باشد [۳].

از سوی دیگر، افزایش بیماریهای ایجاد شده از طریق مصرف مواد غذایی آلوده به میکروارگانسیمهای با منشأ غذایی، از دیگر چالشهای اصلی مطرح در ایمنی غذایی می باشد [۴].

دارچین با نام علمی *Cinnamomum Zylancum* از خانواده *Lauraceae* و از جنس *Cinnamomum* درختچه ای همیشه سبز [۵] می باشد که دارای تقریباً ۲۵۰ گونه مختلف میباشد [۴]. اسانس آن دارای فعالیت ضد میکروبی قوی می باشد [۶]. علاوه بر این، دارچین دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بالایی نیز میباشد [۵].

برخی محققین، وجود ترکیبات فنولی در این منابع را از جمله عوامل اثرگذار در این ویژگی ها معرفی نموده اند [۷ و ۸]. پلی فنولها علاوه بر داشتن خصوصیات آنتی اکسیدانی و آنتی رادیکالی، دارای خاصیت ضد میکروبی نیز می باشند [۲]. از آنجایی که تمام این ویژگیها بطور عمده به ساختار شیمیایی ترکیبات فنولی بستگی دارد، تلاشها باید در راستای استخراج صحیح، جداسازی و شناسایی این ترکیبات متمرکز گردد [۷]. به منظور استخراج این ترکیبات مهم زیست فعال روشهای مختلفی مورد استفاده قرار می گیرد که از آن جمله میتوان به روشهای مرسوم

3. Solvent Extraction
4. Subcritical Water Extraction
5. Ferric reducing antioxidant power
6. β - carotene bleaching assay
7. diphenyl-picrylhydrazyl
8. Trichloroacetic acid
9. Tertiary butylhydroquinone

1. Butylatedhydroxianisole
2. Butylatedhydroxitoluene

میزان ترکیبات توکوفرولی عصاره بر مبنای آلفا توکوفرول اندازه گیری گردید. در این آزمون ۱ میلی لیتر عصاره با غلظت ۱۰۰۰ ppm با ۵ میلی لیتر تولوئن، ۳/۵ محلول ۲-۲-سی پیریدین (۰/۰۷٪ وزنی حجمی در اتانول آبی ۹۵٪) و ۰/۵ میلی لیتر کلرید آهن III شش آب (۰/۲٪ وزنی حجمی در اتانول آبی ۹۵٪) مخلوط گردید و در پایان جذب نمونه در طول موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد. مقدار کل ترکیبات توکوفرولی بر اساس میلی گرم در میلی لیتر عصاره گزارش گردید [۱۳].

۲-۶- فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

در این روش به ۰/۳ میلی لیتر از عصاره ها در غلظتهای مختلف به ۲/۷ میلی لیتر محلول DPPH (۵-۶۱۰) اضافه شد و به مدت ۶۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفت. پس از پایان زمان مذکور، جذب محلولها توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر با بلانک آب مقطر قرائت گردید. آنتی اکسیدان سنتزی TBHQ در این آزمایش بعنوان شاهد مثبت مورد استفاده قرار گرفت [۱۴].

درصد مهار کنندگی رادیکالی عصاره ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\%I = \frac{A_B - A_S}{A_B} \times 100 \quad (\text{معادله ۱})$$

که در آن جذب نمونه کنترل و جذب نمونه یا استاندارد می باشد که پس از ۶۰ دقیقه اندازه گیری گردیده اند.

۲-۷- توان آنتی اکسیدانی احیاء آهن FRAP

مقدار ۲/۵ میلی لیتر عصاره با ۲/۵ میلی لیتر از محلول ۲۰ میلی مول بر لیتر بافر فسفات (pH = ۶/۶) و ۲/۵ میلی لیتر فری سیانید پتاسیم ۱٪ اضافه و انکوبه گذاری شد. سپس ۲/۵ میلی لیتر تری کلرو استیک اسید ۱۰٪ وزنی حجمی به آن اضافه و سانتیفریوژ (hermle, Z200a, آلمان) گردید. در نهایت، مقادیر جذب نمونه ها در ۷۰۰ نانومتر قرائت گردید (جذب بالاتر نشاندهنده قدرت احیای بیشتر است).

اشرشیاکلی (PTCC1399) و سودوموناس آئروژینوزا (PTCC1310) بودند و از پژوهشکده ژنتیک دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری تهیه گردیدند.

۲-۲- استخراج با حلال

۲۵ گرم از پودر دارچین آماده به نسبت ۱ به ۵ با حلال اتانول-آب ۵۰٪ مخلوط و در تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت روی همزن (fan azmagostar, ایران) با سرعت ۱۴۰ دور در دقیقه قرار داده شد. پس از صاف کردن فاز بالایی، تبخیر حلال در آون (memmert, آلمان) با دمای ۴۵ درجه سانتیگراد انجام گرفت [۱۰].

۲-۳- استخراج با آب زیر بحرانی

استخراج با آب زیر بحرانی در یک راکتور استیل ضد زنگ ۸ میلی لیتری انجام گرفت. در هر دوره، پودر دارچین (۱ گرم) و آب مقطر (۵ میلی لیتر) به داخل راکتور انتقال و دمای راکتور تا ۲۲۰-۱۸۰ درجه سانتیگراد افزایش یافت و در پایان پس از غوطه ور کردن در حمام آب تا دمای محیط سرد گردید [۱۱]. لازم به ذکر است که هر دو عصاره پس از استخراج تا زمان انجام آزمایشات در دمای ۱۸- درجه سانتیگراد و در ظروف پوشش داده شده با فویل آلومینیومی نگهداری گردید.

۲-۴- اندازه گیری مقدار کل ترکیبات فنولی

پس از تهیه عصاره ها، نیم میلی لیتر از عصاره با غلظت ۱۰۰۰ ppm با ۲/۵ میلی لیتر از معرف فولین سیوکالتیو ده بار رقیق شده و ۲ میلی لیتر از کربنات سدیم ۷/۵٪ مخلوط گردید و پس از ۱۵ دقیقه جذب آن در ۷۶۵ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر (analytic Jena, spekol 2000, آلمان) قرائت گردید. مقدار کل ترکیبات فنولی با استفاده از معادله خط رسم شده بر مبنای گالیک اسید و بصورت میلی گرم در میلی لیتر عصاره بیان گردید [۱۲].

۲-۵- اندازه گیری میزان توکوفرول کل

میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی در سه تکرار اضافه گردید. یک چاهک فاقد عصاره (حاوی باکتری و محیط کشت) به عنوان کنترل مثبت (کنترل رشد) و یک چاهک فاقد باکتری (حاوی محیط کشت و عصاره) به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد و جذب نمونه ها پس از اینکه پلیت ها در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند در طول موج ۶۳۰ نانومتر توسط دستگاه الیزاید (awareness technology, stat) قرائت گردید.

بر اساس اختلاف جذب نمونه ها در مقایسه با شاهد (باکتری و محیط کشت) میزان اثرگذاری عصاره بر نابودی میکروارگانیسم ها بررسی گردید. اولین خانه ای که در آن کدورتی مشاهده نشد بعنوان MIC تعیین گردید. از این چاهک ها ۵ میلی لیتر به پلیت حاوی محیط کشت نوترینت آگار انتقال داده شده و مجدداً به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شد. غلظت هایی که فاقد رشد باکتری بودند به عنوان مقادیر حداقل غلظت کشندگی گزارش گردیدند [۱۵].

۲-۱۰ - تجزیه تحلیل آماری

در پژوهش حاضر از طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار جهت ارزیابی اثر روش استخراج بر ویژگی های آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی عصاره دارچین استفاده شد. بررسی اثر معنی داری با استفاده از آزمون ANOVA و سپس مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح خطای ۵ درصد با استفاده از نرم افزار SAS 9.3 انجام گرفت.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- ترکیبات فنولی و توکوفرولی کل

مقدار ترکیبات فنول و توکوفرول کل عصاره دارچین در جدول ۱ نشان داده شده است. همانگونه که مشاهده می گردد، مقدار کل ترکیبات فنول عصاره استخراج شده به روش غرقابی از نظر آماری دارای اختلاف معنادار بوده ($P < 0.05$) و از نظر مقداری

محلول متانولی TBHQ به عنوان استاندارد مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۸- اندازه گیری میزان بتاکاروتن

محلول بتاکاروتن از طریق حل کردن ۵ میلی لیتر کلرو فرم تهیه و ۶۰۰ میکرولیتر از این محلول به ۴۰ میلی گرم اسید لینولئیک و ۳۰۰ میلی گرم تووین ۴۰ اضافه گردید و پس از حذف کلروفرم در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد تحت خلاء آب مقطر به میزان ۱۰۰ میلی لیتر به بالن اضافه گردید. جذب نمونه ها بلافاصله پس از آماده سازی با استفاده از اسپکتروفوتومتر و در طول موج ۴۷۰ نانومتر قرائت گردید. جذب نمونه های باقیمانده در تاریکی به مدت ۲۴ ساعت نیز پس از سپری شدن زمان مذکور در طول موجیکسان اندازه گیری گردیده و در پایان درصد فعالیت آنتی اکسیدانی آن با فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\%I = \left(1 - \frac{A_{24}^T - A_{24}^C}{A_{24}^T - A_{24}^C} \right) \times 100 \quad \text{معادله (۲)}$$

که در آن به ترتیب جذب عصاره در زمان صفر و پس از ۲۴ ساعت و به ترتیب جذب شاهد در زمان صفر و پس از ۲۴ ساعت می باشد [۱۲].

۲-۹- حداقل غلظت بازدارندگی (1MIC) و

کشندگی (2MBC)

هر یک از سویه های باکتریایی روز قبل از انجام تست MIC، MBC بر روی محیط کشت جامد نوترینت آگار (NA) جهت قرار گرفتن در فاز لگاریتمی کشت سطحی شدند.

یک لوپ پر از هر سویه به ۲۵ میلی لیتر محیط کشت نوترینت برات (NB) جهت تهیه سوسپانسیون غلیظ میکروبی اضافه گردید و تا هنگام برابر شدن دانسیته نوری (OD) آن با محلول نیم مک فارلند توسط محیط کشت مایع (NB) رقیق شد.

در پلیت های میکروتیتر ۹۶ خانه ای، به ترتیب ابتدا ۲۰ میکرولیتر عصاره، ۱۶۰ میکرولیتر محیط کشت و در نهایت ۲۰

1. Minimum inhibitory concentration
2. Minimum bactericidal concentration

ای با غلظت نهایی ppm ۱۰۰۰، ۱۰ میلی گرم عصاره خشک در بالن ژوژه ۱۰ میلی لیتر به حجم رسانده شده است. در مقایسه با این روش، روش آب زیر بحرانی مقدار ترکیبات فنولی کمتری را از گیاه استخراج نمود که دلیل احتمالی این امر را می توان به تاثیر حرارت نسبتا بالای استفاده شده در این روش نسبت داد که این امر با نتیجه گزارش شده توسط ولینگیری و همکاران (۲۰۱۵) انجام شده بر روی سبوس برنج به روش سوکسله و استفاده از دمای ۷۰ درجه سانتیگراد مطابقت دارد [۱۷].

مقدار ترکیبات توکوفرولی در این مطالعه در عصاره آب زیر بحرانی بیشتر بوده (جدول ۱) و از نظر آماری دارای اختلاف معناداری با عصاره غرقابی می باشد ($P < 0/05$).

۳-۲- قدرت آنتی اکسیدانی

از آنجاییکه یک روش به تنهایی قادر به بیان ظرفیت آنتی اکسیدانی نمی باشد [۲۰]، در این مطالعه که بر روی شش غلظت ppm ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۳۰۰۰، ۴۰۰۰ و ۵۰۰۰ انجام شد، از سه روش اسپکتروفوتومتری مهار رادیکال آزاد DPPH، احیاء آهن FRAP و رنگبری بتاکاروتن BCB^۲ استفاده و نتایج با آنتی اکسیدان سنتزی TBHQ مقایسه گردید (جدول ۲).

آزمون DPPH بطور گسترده ای برای شناسایی فعالیت بازدارندگی رادیکالهای آزاد عصاره های حاصل از گیاهان مختلف و ترکیبات خالص استفاده میشود [۱۶]. بررسی قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH عصاره های غرقابی (SO) و آب زیر بحرانی (SWE) دارچین از نظر آماری دارای اختلاف معناداری بوده ($P < 0/05$) و همانگونه که در جدول ۲ نشان داده شده، قدرت مهار رادیکال عصاره SO بیشتر از عصاره SWE می باشد.

بسیار بیشتر از مقدار این ترکیبات در عصاره آب زیر بحرانی می باشد (به ترتیب ۱/۱۳، ۳۰/۳۵ میلی گرم بر میلی لیتر و ۱/۱۳، ۶/۶۳ میلی گرم بر میلی لیتر). مطالعات متعددی نشان داده اند که استخراج با حلال پرکاربردترین روش مرسوم جهت جداسازی ترکیبات زیست فعال گیاهی می باشد که هر دو محصول استخراج و فعالیت آنتی اکسیدانی به شدت وابسته به طبیعت حلال استخراج کننده، به دلیل تفاوت در قطبیت گیاهان می باشد [۱۶]. به گزارش دولت آبادی و همکاران (۱۳۹۳) بیشترین میزان استخراج به حلال اتانول ۵۰٪ نسبت داده شده است [۸] و همچنین ولینگیری و همکاران (۲۰۱۵) در مطالعه خود بر روی سبوس برنج، بیشترین میزان استخراج ترکیبات فنولی را در استفاده از حلال اتانول ۷۵٪ در ترکیب با آب گزارش نموده اند [۱۷]. به گزارش کلال و همکاران (۲۰۱۴) استفاده از حلال های قطبی به منظور استخراج ترکیبات پلی فنولی رایج می باشد که در این راستا، استفاده از آب در ترکیب حلال باعث افزایش قطبیت حلال و افزایش راندمان و کاهش زمان استخراج می گردد [۱۶]. این مقدار فنول در روش حلال در مقایسه با ترکیبات فنولی حاصل از مطالعه انجام شده توسط کلال و همکاران (۲۰۱۴) بر روی پوست سیر (۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر) بیشتر بوده و تقریبا معادل مقدار ترکیبات فنولی حاصل از استخراج با حلال اتانولی گیاه نیلوفر پیچ ($30.35 \pm 1.08 \text{ mg/ml}$) می باشد [۱۶ و ۱۸]. میزان ترکیبات حاصل از این مطالعه در مقایسه با مطالعه مشابه انجام شده توسط جمشیدی و همکاران (۱۳۹۱) بر روی دارچین کمتر بود ($55.69 \pm 1.43 \text{ mg/ml}$) [۱۹]. در حالت کلی، نتایج این مطالعه نشان داد که دارچین ماده ای با مقدار قابل توجهی از ترکیبات فنولی می باشد.

لازم به ذکر است که در انجام کلیه آزمایشات این پژوهش از عصاره در فرم مایعات استفاده شده و جهت تهیه آن از حلال استخراجی استفاده گردیده است. به عنوان مثال جهت تهیه عصاره

Table1 Comparisons of total phenolic and tocopherol compounds of SO and SWE extracts (mg/ml)

Extraction method	tocopherol	Phenol
Solvent	1.95±0.5 ^b	30.35±1.13 ^a
Subcritical water Extraction	2.86±0.5 ^a	6.63±1.13 ^b

Different letters indicate significant differences ($p < 0.5$)**Table2** The free radical scavenging capacity of SO and SWE extracts (%)

Concentration (ppm)	Solvent	Subcritical water Extraction
500	36.85±21.47 ^{Bc}	61.76±7.82 ^{Ae}
1000	44.96±21.47 ^{Bd}	84.47±7.82 ^{Aa}
2000	59.52±21.47 ^{Bc}	81.82±7.82 ^{Ab}
3000	82.44±21.47 ^{Ab}	80.03±7.82 ^{Bbc}
4000	93.78±21.47 ^{Aa}	77.43±7.82 ^{Bcd}
5000	81.27±21.47 ^{Ab}	74.77±7.82 ^{Bd}

Means ±SD followed by capital letters within each row and small letters within each column are significantly different. ($p < 0.5$)

مهار عصاره SWE در غلظتهای پائینتر بیشتر از عصاره SO در همین غلظتها می باشد. در حالیکه غلظتهای بالاتر عصاره SO از نظر قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH دارای مقادیر بالاتر و اختلاف آماری معناداری می باشد ($p < 0.05$).

از جمله دیگر روشهای استفاده شده برای تعیین ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره ها، تعیین توان احیاء آهن است که در این روش توانایی عصاره ها برای احیاء آهن سه ظرفیتی و تبدیل آن به آهن دو ظرفیتی سنجیده میشود [۲۲].

مطابق جدول ۳، اختلاف معناداری از نظر آماری بین توان احیاء آهن عصاره های غرقابی (SO) و آب زیر بحرانی (SWE) و آنتی اکسیدان سنتزی TBHQ وجود داشت ($p < 0.05$). توان احیاء آهن عصاره ها وابسته به غلظت نبود و آنتی اکسیدان سنتزی TBHQ و غلظتهای ۵۰۰ و ۱۰۰۰ ppm عصاره SO، در مقایسه با غلظتهای دیگر همین عصاره و نیز کلیه غلظتهای عصاره SWE قدرت احیاء بالاتری از خود نشان دادند و اختلاف معناداری از نظر آماری بین آنها وجود داشت ($p < 0.05$) ولی بین کلیه غلظتهای عصاره SWE با همه اختلاف آماری معناداری مشاهده نگردید که این امر با توجه به مقادیر کم ترکیبات فنولی (موجود در آن دور از انتظار نمی باشد).

بر اساس مطالعات بسیار زیاد انجام گرفته در این زمینه، آنتی اکسیدانها می توانند مقدار DPPH را در طی انتقال هیدروژن به فرم غیررادیکالی (DPPH-H) احیا کنند و منجر به کاهش جذب در ۵۱۵ نانومتر گردند که علت این کاهش جذب را میتوان به واکنش بین ترکیبات فیتوشیمیایی و DPPH نسبت داد که از نظر علمی نشان دهنده قدرت آنتی اکسیدانی می باشد [۱۷].

مطابق داده های ارائه شده در جدول ۲، بالاترین قدرت مهار رادیکال آزاد به غلظت ۴۰۰۰ ppm عصاره غرقابی (SO) و ۱۰۰۰ ppm عصاره آب زیر بحرانی (SWE) اختصاص دارد. همانگونه که مشاهده می شود در اکثر موارد، افزایش غلظت بطور عمده افزایش قدرت مهار رادیکال را در پیدایش ته و در حالت کلی هر دو عصاره در تمام غلظتهای مورد بررسی، فعالیت مهار رادیکال آزاد خوبی با درجات مختلف نشان دادند که در مقایسه با نتایج کار ولینگیری و همکاران (۲۰۱۵) مقادیر بدست آمده بسیار بیشتر (۲۶٪) و نیز در برخی غلظتها بیشتر یا برابر با نتایج کار سلیمانان و همکاران (۱۳۹۲) بر روی میوه ولیک (۹۳/۴۱-۱۷/۳۳٪) می باشد که این امر را می توان در رابطه با مقادیر بالای ترکیبات فنولی عصاره دارچین دانست [۱۷ و ۲۱].

مقایسه غلظتهای مشترک عصاره های مختلف نشان داد که قدرت

Table 3 Iron (II) chelating activity of US and SFE extracts (%)

Subcritical water Extraction	Solvent	Concentration (ppm)
0.38±0.009 ^{Bb}	1.72±0.10 ^{Aa}	500
0.365±0.009 ^{Bb}	1.68± 0.10 ^{Aa}	1000
0.365±0.009 ^{Bb}	1.49± 0.10 ^{Aa}	2000
0.364±0.009 ^{Bb}	1.48± 0.10 ^{Aa}	3000
0.371± 0.009 ^{Bb}	1.49± 0.10 ^{Aa}	4000
0.37± 0.009 ^{Bb}	1.6± 0.10 ^{Aa}	5000
1.66± 0.009 ^a	1.66± 0.10 ^{Aa}	TBHQ (100)

Means ±SD followed by capital letters within each row and small letters within each column are significantly different. (p<0.5)

امولسیون می‌باشد. سرعت رنگبری بتاکاروتن نمی‌تواند در حضور آنتی‌اکسیدانها کاهش یابد [۲۳]. مطابق جدول ۴، از این اصل در ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره دارچین و آنتی‌اکسیدان سنتزی TBHQ استفاده گردیده است. ترتیب کاهش قدرت آنتی‌اکسیدانی بر اساس این جدول به ترتیب زیر می‌باشد:

SO > SWE > TBHQ

Table 4 β-carotene-linoleic acid bleaching activity of SO and SWE extracts (%)

Subcritical water Extraction	Solvent	Concentration (ppm)
95.82±6.26 ^{Aa}	88.7±10.18 ^{Bb}	500
84.83±6.26 ^{Ab}	84.22± 10.18 ^{Ab}	1000
85.59±6.26 ^{Bb}	96.06± 10.18 ^a	2000
81.42±6.26 ^{Bbc}	82.78± 10.18 ^{Abc}	3000
78.95±6.26 ^{Bc}	84.60± 10.18 ^{Ac}	4000
78.62±6.26 ^{Ac}	62.75± 10.18 ^{Bbc}	5000
78.01±6.26 ^c	78.01± 10.18 ^c	TBHQ (100)

Means ±SD followed by capital letters within each row and small letters within each column are significantly different. (p<0.5)

با توجه به مطالعه ال-باروتنی و همکاران (۲۰۱۰) که بر روی دارچین انجام گرفته و نتایج قدرت رنگبری بتاکاروتن عصاره دارچین در آن (۸۲/۳٪)، در پژوهش پیشرو غلظت های ppm ۵۰۰۰ عصاره SO و غلظت های ۳۰۰۰، ۴۰۰۰ و ۵۰۰۰ عصاره SWE کمتر و در سایر غلظتهای هر دو روش بیشتر از این مقدار بود [۲۳].

همچنین در این مطالعه گزارش شده که BHT بعنوانیک آنتی‌اکسیدان سنتزی در مقایسه با عصاره گیاهی پونه کوهی، قدرت رنگبری بیشتری داشت که این نتیجه با آنچه در این مطالعه مشاهده گردیده همخوانی و مطابقت نداشت و آنتی‌اکسیدان سنتزی استفاده شده در این پژوهش قدرت ضعیف تری در مقایسه با عصاره گیاهی دارچین داشت.

همانگونه که مشاهده می‌گردد کلیه غلظتهای عصاره SO در مقایسه با غلظتهای مشابه عصاره SWE از نظر آماری دارای اختلاف معناداری بوده (p<۰/۰۵) و توان احیاء آهن عصاره SO در تمامی غلظتها بالاتر از غلظتهای مشابه عصاره SWE می‌باشد (جدول ۳).

روشکار بتاکاروتن بر پایه رنگبری بتاکاروتن به دلیل واکنش آن با رادیکالهای تشکیل شده در طی اکسیداسیون لینولئیک اسید در

نتایج آنالیز واریانس حاکی از آن بود که عصاره غرقابی (SO) در غلظت ppm ۲۰۰۰ و عصاره آب زیر بحرانی (SWE) در غلظت ppm ۵۰۰ از نظر قدرت رنگبری اختلاف معناداری بایکدیگر نداشتند و فعالیت آنتی‌اکسیدانی چشمگیری را نشان دادند و در حالت کلی قدرت رنگبری بتاکاروتن هر دو عصاره به استثنای غلظت ppm ۵۰۰ عصاره غرقابی در مقایسه با آنتی‌اکسیدان سنتزی بیشتر بود و در غلظت های ppm ۴۰۰۰ و ۵۰۰۰ عصاره آب زیر بحرانی اختلاف آماری با TBHQ معنادار نبود (P<۰/۰۵).

استدلال، ناچیز بودن فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره آب زیر بحرانی در مقایسه با عصاره غرقابی قابل توجه می باشد.

۳-۳- حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی

ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی عصاره دارچین از نظر کمی و کیفی با استفاده از آزمونهای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی نشان داد که تمامی عصاره ها فعالیت ضدباکتریایی چشمگیری علیه باکتریها دارند (جدول ۵).

نتایج مقایسه غلظتهای مشابه دو عصاره نشاندهنده وجود اختلاف معنادار آماری بین دو روش بوده ($P < 0/05$) و در حالت کلی عصاره SO در مقایسه با SWE قدرت رنگبری بالاتری از خود نشان داد. به استثنای غلظت ۵۰۰ ppm و ۵۰۰۰ که قدرت رنگبری عصاره SWE که قدرت رنگبری بالاتری در مقایسه با از عصاره SO از خود نشان داد و غلظت ۱۰۰۰ ppm که قدرت رنگبری هر دو عصاره در این غلظت فاقد اختلاف معنادار آماری می باشد ($P < 0/05$). مطالعات متعددی نشان داده اند که هر چه میزان ترکیبات فنولی و توکوفرولی عصاره بیشتر باشد قدرت آنتی اکسیدانی آن نیز بیشتر خواهد بود [۲۴۸]. لذا، بر اساس این

Table 5 Antimicrobial (MIC, MBC) activity of the SO and SWE extracts.

Extraction (ppm)		Gram Reaction	Type
Subcritical water extraction	Solvent extraction		
500	500	+	<i>Staphylococcus aureus</i> PTCC1431
500	500	+	<i>Bacillus subtilis</i> PTCC1015
500	500	-	<i>Escherichia coli</i> PTCC1399
500	500	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PTCC1310

به گزارش یوبین و همکاران اسانسهای گیاهی دارچین فعالیت ضدباکتریایی قوی علیه باکتریهای عامل فساد مواد غذایی و پاتوژن اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس نشان داده است [۴]. بررسی ویژگیهای ضد میکروبی عصاره حاصل از پوست سیر در مطالعه کالال و همکاران (۲۰۱۴) خاصیت ضد باکتریایی مناسبی علیه باکتریهای گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس تنجنسیس و باسیلوس سوتیبلیس در مقایسه با گرم منفی ها نشان داده است [۱۶]. علاوه بر این خاصیت ضد میکروبی عصاره های دارچین توسط محققین متعددی گزارش گردیده است [۴ و ۶ و ۲۵ و ۲۶].

۴- نتیجه گیری کلی

هدف از انجام این پژوهش بررسی اثر عصاره دارچین استخراج شده با حلال و آب زیر بحرانی بر ویژگیهای ضد میکروبی و

کلیه میکروارگانیسم های مورد بررسی در این آزمون در کمترین غلظت مورد استفاده از عصاره دارچین بازدارنده و لذا حداقل غلظت بازدارنده هر دو عصاره غرقابی (SO) و آب زیر بحرانی (SWE) برای تمامی میکروارگانیسم های مورد بررسی هر دو گونه باکتریایی گرم مثبت و گرم منفی غلظت ۵۰۰ ppm تعیین گردید.

نتایج حاصل از این آزمون نشان داد هر دو عصاره در غلظت ۵۰۰ ppm اثر مهار کنندگی روی تمامی باکتریهای مورد آزمون داشتند.

بر اساس گزارش کالال و همکاران (۲۰۱۴)، مکانیسم های مختلفی از جمله بازدارنده آنزیمهای برون سلولی میکروبی، بازدارنده رشد از طریق حذف سویستر اوپا بازدارندگی اکسیداسیون سفیریلایسیون، دلایل اصلی توجه فعالیت ضد میکروبی ترکیبات فنولی شناسایی گردیده اند.

- [6] Fei LU., Yi-Cheng, D., Xing-qianYE., Yu-ting, D., 2011, Antibacterial effect of cinnamon oil combined with thyme or clove oil, *Agricultural Sciences in China*. 10 (9): 1482-1487.
- [7] Herrero M, Plaza M, Cifuentes A, and Ibanez E., 2012, Extraction techniques for the determination of phenolic compounds in food.
- [8] Dolatabadi, M., RaftaniAmiri, Z., EsmailzadehKenari, R., 2014, Comparison of total phenols and antioxidant properties of walnut (*Juglansregia L.*) green husk of three regions of northern Iran (Shahrood, Bandar Gaz and Hzargarib), *JFSt*. No 45, Vol 11.
- [9] HammiaKhaoula, M., Jdey, A., Abdelly, Ch., Majdoub, H., Ksouri, R., 2015, Optimization of ultrasound-assisted extraction of antioxidant compounds from Tunisian *Zizyphus lotus* fruits using response surface Methodology. *Food Chemistry* 184 (2015) 80–89.
- [10] AtayeSalehi, E., EsmailzadehKenari, R., NasiriTakami, T., 2013, Investigation the effect of pimppinellaaffinisledob on canola oil during storage, *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, No. 10, Vol 2: 176-181. (Persian)
- [11] Garcia-Mendoza, M., Paula, J., Paviani, L., Cabral, F., Martinez-Correa, H., 2015, Extracts from mango peel by-product obtained by supercritical CO₂ and pressurized solvent processes. *LWT - Food Science and Technology*. 1e7.
- [12] Delfanian, M., EsmailzadehKenari, R., Sahari, M. A., 2015, Antioxidative effect of loquat (*Eriobotrya japonica Lindl.*) fruit skin extract in soybean oil, *Food Science & Nutrition*; (1): 74–80.
- [13] Wong, M. L., Timms, R. E., Goh, E. M., 1988, Colorimetric determination of total tocopherols in palm oil, olein and stearin, *JAOCs*, 65 (2): 258-261.
- [14] EsmailzadehKenari, Reza., Mohsenzadeh, F., RaftaniAmiri, Z., 2014, Antioxidant activity and total phenolic compounds of Dezful sesame cake extracts obtained by classical and ultrasound-assisted extraction methods, *Food Science & Nutrition* 2(4): 426–435.
- [15] Wendlin, I., Gasser, R., Emil, R., 1997, A Macrodilution well method for Minimum Inhibitory Concentration and Minimum

ضداکسایشی می‌باشد که نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که عصاره دارچین قدرت آنتی اکسیدانی بالایی در مقایسه با آنتی اکسیدانهای سنتزی داشته و قادر به بازسازی و مهار رشد باکتریهای پاتوژن مختلف در غلظت های استفاده شده می‌باشد که هر دو ویژگی مذکور مرتبط با میزان ترکیبات فنولی مناسب موجود در این گیاه می‌باشد. میزان ترکیبات فنولی استحصالی در عصاره SWE کمتر از عصاره SO بود که دلیل احتمالی آن استفاده از حرارت در این روش و آسیب حرارتی ناشی از آن بر این ترکیبات می‌باشد. لذا، بر اساس نتایج بدست آمده در این مطالعه، و با تاکید بر این اصل که تمایل مصرف کنندگان به پرهیز از مصرف محصولات با نگهدارنده های شیمیایی که با افزایش مقاومت به آنتی بیوتیکها همراه است رو به افزایش است، میتوان عصاره دارچین را بعنوان جایگزینی مناسب و ایمن برای آنتی اکسیدانهای سنتتیک و نگهدارنده‌های میکروبی شیمیایی در صنعت غذا معرفی نمود. لازم به ذکر می‌باشد که به منظور استفاده از عصاره مورد مطالعه در صنعت غذا در کارخانجات تولید محصولات غذایی، مطالعات بیشتری مورد نیاز می‌باشد.

۵- منابع

- [1] Ladikos, D., and Lougovois, V., 1990, Lipid oxidation in muscle foods. *Food Chemistry*. 35: 295-314.
- [2] Moure, A., Cruzy, J. M., Franco, D., Dominguez, J. M., Sineiro, J., Dominguez, H., Nunez, M. J., and Parajo, J. C., 2001, Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*. 72: 145-171.
- [3] Halliwell, B., Aeschbach, R., Loliger, J. Arouma, O. I., 1995, the characterization of antioxidants. *Food Chemistry and Toxicology*. 33: 601-617.
- [4] Yunbin, Zh., Xiaoyu, L., Yifei, W., Pingping, J., SiewYoung, Q., 2015, Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, *Food Control*; 05.032.
- [5] Vaibhavi, J., Rakesh, P., Pankaj, Kh., Neeraj, P., Sunil, G., Anupriya, P., Sonu, Sh., 2010, *Cinnamon: a pharmacological review*. ScienSage Publication ISSN: 0976-9595.

- antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (aTEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay, *Food Chemistry*, 129:139–148.
- [23] El-Baroty, G. S., Abd El-Baky, H. H., Farag, R. S., Saleh, M. A., 2010, Characterization of antioxidant and antimicrobial compounds of cinnamon and ginger essential oils, *African Journal of Biochemistry Research* Vol. 4(6), pp. 167-174.
- [24] Saviz, A., EsmailzadehKenari, R., KhalilzadehKelagar, M.A., 2015, Investigation of Cultivate Zone and Ultrasound on Antioxidant, Activity of Fenugreek Leaf Extract, *J. Appl. Environ. Biol. Sci.*, 4(11S) 174-181.
- [25] Deans, S.G., Ritchie, G., 1987, Antibacterial properties of plant essential oils, *International Journal of food Microbiology*, 5: 165-180.
- [26] Hilli, P., Evans, C.S., and Veness, R.G., 1997, Antimicrobial action of essential oils: the effect of dimethylsulphoxide on the activity of cinnamon oil, *Lettes in applied Microbiology*. 24: 269-275.
- [27] Tavakoli, J., HadadKhodaparast, H., EsmailzadehKenari, R., Amin Lari, M., Sharif, A., 2013, Investigation antioxidant power of P.khinjuk oil as a new food source in Iran, *Iranian Food Science and Technology Research Journal* Vol. 9, No. 1, p. 61-67. (Persian)
- [28] Leal, P.F., Maia, N.B., Carmello, Q.A.C., Catharino, R.R., Eberlin, M.N., Angela, M., Meireles A., 2008, Sweet Basil (*ocimumbasilicum*) extracts obtained by supercritical fluid extraction (SFE): Global yields, Chemical composition, Antioxidant activity, and Estimation of the cost of Manufacturing. *Food Bioprocess Technology*, 1, 326-338.
- Bactocidal Concentration Determination of Antimicrobials *Borrelia burgdorferi* in vitro, *Journal of Spirochetes and Tick-borne Disease*, Vol. 4, NO. 1/2.
- [16] Kallel, F., Drissa, D., Chaaria, F., Belghitha, L., Bouaziza, Raoudha, F., Ghorbela, R., EllouzChaabouni, S., 2014, Garlic (*Allium sativum* L.) husk waste as a potential source of phenolic compounds: Influence of extracting solvents on its antimicrobial and antioxidant properties. *Industrial Crops and Products* 62: 34–41.
- [17] Vellingiri, V., Pemiah, B., 2015, Antioxidant property of solvent extract and acid/alkali hydrolysates from rice hulls, *Food Bioscience*. 11: 85–91.
- [18] Hossain, A., Shah, M., Dawood, M., 2011, A study on the total phenols content and antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of endemic plant *Merremia borbonensis*, *Arabian Journal of Chemistry*.
- [19] Jamshidi, M., Barzegar, M., Sahari, M. A., 2013, Effect of gamma irradiation on the antioxidant and antimicrobial activities of cinnamon powder, *Iranian Journal of Nutrition Science & Food Technology*, Vol: 17, No (4), pages: 73-82 (Persian).
- [20] Gonzez-Centeno, M.R., Comas-Serra, F., Femenia, A., Rossell, C., Simal, S., 2014, Effect of power ultrasound application on aqueous extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity from grape pomace (*Vitis vinifera* L.): Experimental kinetics and modeling, *Ultrasonics Sonochemistry*.
- [21] Salmanian, S., SadeghiMahoonak, A., Alami, M., Ghorbani, M., 2013, Determination of antiradical and antioxidant activities and flavonoid content in hawthorn fruit (*Crataegus bursensis*). *Iranian Journal of Nutrition Science & Food Technology*. 8(1): 177-185. (Persian)
- [22] Lars, M., Kati, F., Bohm, V., 2011, Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing

Investigation the effect of antioxidant and antibacterial properties of cinnamon extract of solvent and subcritical water extraction

Sohrabpour, S. ^{1*}, EsmacilzadehKenari, R. ¹, RaftaniAmiri, Z. ¹

1. Department of Food Science and Technology, Faculty of Agricultural Engineering, Sari Agricultural Sciences and Natural Researchers University

(Received: 2018/08/19 Accepted:2019/01/29)

Essential of replacing natural compounds with synthetic ones has become more important. Participation of phenolic compounds in natural plant sources in antioxidant and antimicrobial activities caused to determine not only total phenolic and tocopherol compounds, but also antiradical capacity via three various methods such as free radical scavenging DPPH, ferric reducing power FRAP and beta carotene bleaching power of maceration (SO) and subcritical water extraction (SWE) methods of cinnamon extract further than antimicrobial properties of it on both gram negative and positive bacterium. Results proved various amounts with significant difference of total phenolic and tocopherol compounds of two various extraction methods. While SO-extract contained higher phenolic compounds, higher total tocopherol compounds were measured in SWE-extract. Results of all three antioxidant assays indicated that both extracts proved different antioxidant power comparing with TBHQ. The lowest concentration of SO-extract (500ppm) had a bactericide effect on all investigated bacterium in this work. Whereas, 500 ppm of SWE-extract was able to effect only *Staphylococcus aureus* as a gram positive bacteria, but not others.

Keywords: Maceration, Subcritical water extraction, Antimicrobial activity, Antioxidant activity

* Corresponding Author E-Mail Address: sepidesohrabpour@gmail.com