

اثر روش های مختلف استخراج بر میزان ترکیبات فنلی، توکوفرولی و خصوصیات آنتی اکسیدانی عصاره شوید

معصومه حسن نیا^{۱*}، پیمان آریایی^۲، اسماعیل فتاحی^۲

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت الله آملی

۲- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت الله آملی

(تاریخ دریافت: ۹۳/۹/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۴/۷/۶)

چکیده

گیاه شوید (*Anethum graveolens*) متعلق به خانواده Apiaceae منبع غنی از ترکیبات فنلی و توکوفرولی هستند که دارای فعالیت آنتی اکسیدانی می باشد. آنتی اکسیدان های موجود در رژیم غذایی به لحاظ محافظت بدن در مقابل استرس اکسیداتیو و حفظ سلامت حائز اهمیت هستند. هدف از این مطالعه بررسی تاثیر روش های مختلف استخراج (فراصوت و مایکروویو) و همچنین حلال های مختلف (آب، آب/اتانول (۵۰:۵۰) و اتانول) بر میزان ترکیبات فنلی، توکوفرولی و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره شوید برای به دست آوردن بهترین بازده استخراج جهت استفاده مناسب از عصاره انجام شده است. فعالیت آنتی اکسیدانی هر عصاره از طریق مهار رادیکال آزاد DPPH، آزمون بی رنگ شدن بتاکاروتن و شاخص پایداری اکسایشی تعیین شد. بالاترین میزان ترکیبات فنلی در تیمارهای فراصوت آب/اتانولی و تیمار فراصوت اتانولی (به ترتیب $876/02 \pm 5/53$ و $866/85 \pm 3/57$ میلی گرم/گرم) مشاهده گردید. همچنین در تمامی آزمایش های آنتی اکسیدانی بجز ترکیبات توکوفرولی، تیمار فراصوت آب-اتانولی و فراصوت-اتانولی بیشترین میزان فعالیت آنتی اکسیدانی را دارا بود و با آنتی اکسیدان سنتزی TBHQ اختلاف معنی داری نداشت. با توجه به نتایج مطالعه فوق می توان عصاره شوید (توسط روش فراصوت) جایگزین آنتی اکسیدان های سنتزی در صنایع غذایی نمود.

کلید واژگان: شوید، مهار رادیکال آزاد DPPH، ترکیبات فنلی، آزمون بی رنگ شدن بتاکاروتن

* مسئول مکاتبات: masome_hasannia@yahoo.com

۱- مقدمه

آنتی اکسیدان مولکولی است که قادر به کاهش یا جلوگیری از اکسیداسیون مولکولهای دیگر می شود. واکنش های اکسیداسیونی می تواند رادیکالهای آزاد تولید کند که شروع کننده واکنشهای زنجیره ای است و می تواند به سلولها صدمه بزند [۱]. ویژگی های سلامتی بخش آنتی اکسیدان ها و نقش آنها در پیش گیری از بیماری ها دلایل عمده ی این افزایش بوده است. در واقع آنتی اکسیدان ها از فرآیند اکسیداسیون که از عوامل بروز بیماری هایی همچون سرطان است پیش گیری کرده و از این جهت اثرات خود را بر سلامت انسانها می گذارند. علاوه بر این ترکیبات آنتی اکسیدان ها معمولا به منظور جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدها، در برخی محصولات بعنوان افزودنی اضافه شده که باعث افزایش زمان ماندگاری نیز خواهد شد [۲].

بسیاری از آنتی اکسیدان های سنتزی ممکن است برای کنترل اکسیداسیون چربی و روغن ها و جلوگیری از فساد مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرد. اما از نظر جنبه های سلامتی و همچنین عدم پذیرش آنتی اکسیدانهای مصنوعی توسط مصرف کننده ها، کاربرد آن ها را در فرآورده های غذایی محدود ساخته است [۳]. باتوجه به این شرایط، در حال حاضر مناسب ترین راهکار برای جلوگیری از مصرف آنتی اکسیدانهای مصنوعی، یافتن منابع گیاهی است که حاوی آنتی اکسیدانهای طبیعی زیاد بوده و از نظر یافت شدن در مناطق جغرافیایی و آب و هوای مختلف مشکلی نداشته باشد، یعنی به راحتی قابل دسترسی باشد [۴]. عصاره های گیاهی غنی از آنتی اکسیدان می باشند که به عنوان منبعی از مواد غذایی به کار می رود و باعث کاهش تنش اکسیداتیو و در نتیجه ممانعت یا تاخیر در بیماریهای تحلیل برنده می شود [۵]. یکی از این عصاره های گیاهی، عصاره شوید می باشد.

شوید یک گیاه یک ساله ای است که در حال حاضر این گیاه در قسمت های مختلف ایران از جمله نواحی جنوب شرق به صورت گسترده ای کاشته می شود. به طور کلی از برگها و تخم شوید به عنوان ادویه و چاشنی استفاده می شود [۶]. این گیاه در طب سنتی جهت اثرات نیرو دهنده، مقوی معده، هضم کننده غذا، ضد نفخ، ضد تشنج، رفع استفراغ و آرام کننده و افزایش ترشح شیر مادران استفاده دارویی دارد. قسمت مورد استفاده شوید میوه و

کل اندام هوایی آن است [۷، ۸] حضور فلاونوئید ها و سایر ترکیبات فنولیک در انواع عصاره های شوید گزارش شده است [۹].

با توجه به بومی بودن گیاه شوید در ایران، دسترسی آسان، ارزان، مصرف غذایی و دارویی این گیاه از زمانهای دور در کشور [۹] و با توجه پتانسیل ترکیبات آنتی اکسیدانی بالا در این گیاه، در این مطالعه به بررسی روشهای مختلف استخراج برای دستیابی به حداکثر استخراج ترکیبات موثره و بالطبع خصوصیات آنتی اکسیدانی می پردازیم تا جایگزین آنتی اکسیدان سنتزی در صنایع غذایی شود.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- مواد اولیه مورد نیاز

گیاه شوید از یکی از مزارع پرورش در شمال ایران در اردیبهشت ۱۳۹۳ جمع آوری شد. سپس در آون با درجه حرارت ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ دقیقه خشک شد. توسط خردکن کاملا پودر شد و تا زمان انجام آزمایش در درجه حرارت ۲۵°C نگهداری شد همچنین تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده از نوع آزمایشگاهی بوده که تمامی آنها از شرکت مرک آلمان خریداری شد

۲-۲- روش های استخراج عصاره

۲-۲-۱- استخراج با حلال (روش غرقابی)

پودر شوید به نسبت ۱ به ۵ (۲۰ گرم نمونه با ۱۰۰ میلی لیتر حلال) با اتانول، آب و اتانول-آب (۵۰٪) مخلوط و دور از نور به مدت ۴۸ ساعت در شیکر (LABTRON Ls-100) با سرعت ۱۶۰ rpm قرار داده شدند. سپس سه مرحله سانتریفوژ شده (هر بار ۱۰ دقیقه و با ۳۰۰۰ rpm) (HERMLE z200A-Germany) و در هر مرحله فاز آبی (فاز رویی) جمع آوری شد، تا دیگر رسوبی در ته لوله دیده نشود. سپس فازهای آبی جمع-آوری شده، با کاغذ واتمن شماره ۱ صاف شد. در ادامه توسط اواپراتور (حداکثر دما ۵۰ درجه سانتی گراد) (TAM 2times-Iran) حلال تبخیر و عصاره شوید در سه حلال ذکر شده بدست

۲-۵- بررسی مهار رادیکال آزاد (DPPH)

آزمایش مهار رادیکال آزاد برای اولین بار به وسیله ی blois [۱۵] و بعد از کمی اصلاح به وسیله تحقیقات بی شماری به شکل کنونی انجام می شود. بدین ترتیب که ۰/۳ میلی لیتر از هر عصاره به ۳/۷ میلی لیتر محلول DPPH متانولی (mol/l) 6×10^5 اضافه گردید و مخلوط حاصله به شدت هم زده شد. بعد از ۳۰ دقیقه تاریک خانه گذاری در دمای اتاق، جذب نوری نمونه ها در طول موج ۵۱۷ nm در مقابل شاهد خوانده شد. تمامی این مراحل در مورد TBHQ (غلظت ۱۰۰ ppm) به عنوان آنتی اکسیدان استاندارد و شاهد (محلول DPPH متانولی تهیه شده به علاوه ی حلال های مربوطه) انجام شد و در صد مهار رادیکال آزاد DPPH مطابق فرمول ۱ انجام پذیرفت.

جذب نمونه - جذب شاهد

$\times 100 = \frac{\text{جذب شاهد}}{\text{جذب نمونه}} \times 100$ درصد مهار رادیکال آزاد (DPPH): فرمول ۱

۲-۶- آزمون بی رنگ شدن بتاکاروتن - لینولئیک

اسید

این آزمایش براساس روش Amarowicz و همکاران [۱۶] با اندکی تغییر انجام گرفت. برای انجام آزمایش ابتدا یک محلول پایه از بتاکاروتن - لینولئیک اسید بدین صورت تهیه گردید: ۵ میلی گرم از بتاکاروتن در ۱۰ میلی لیتر کلروفرم حل شد، ۶۰۰ میکرو لیتر از محلول تهیه شده به مخلوط ۴۰ میلی گرم لینولئیک اسید و ۴۰۰ میلی گرم توئین ۴۰ اضافه شد. سپس با روش تبخیر در خلا کلروفرم جدا گردید و ۱۰۰ میلی لیتر آب اکسیژنه به آن اضافه و شدیداً هم زده شد. ۵ میلی لیتر از امولسیون تهیه شده فوق به لوله آزمایش منتقل و ۲۰۰ میکرو لیتر از هر عصاره (غلظت ۱۰۰۰ ppm) به لوله آزمایش اضافه گردید. تمامی این مراحل در مورد TBHQ (غلظت ۱۰۰ ppm) به عنوان آنتی اکسیدان استاندارد و شاهد (محلول بتاکاروتن تهیه شده به علاوه ی حلال های مربوطه) انجام شد. جذب نوری نمونه ها با اسپکتروفوتومتر در ۴۷۰ نانومتر در زمان صفر و همچنین بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در دمای اتاق قرائت شد. ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره به عنوان درصد بازسازی بیان می شود.

آمد. عصاره های حاصل تا زمان انجام آزمایش در دمای 18°C - نگهداری شدند [۱۰].

۲-۲- استخراج به کمک فراصوت

ابتدا نمونه ها با نسبت ۱ به ۵ با حلال های آب، اتانول، اتانول-آب (۵۰٪) مخلوط شده، سپس در حمام اولتراسوند (Starsonic35) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۵ درجه با فرکانس ۲۸-۳۴ کیلو هرتز قرار گرفت. سپس محلول ها با کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف و ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. در ادامه توسط اوپراتور (حداکثر دما ۵۰ درجه سانتی گراد) (TAM 2times- Iran) حلال تبخیر و عصاره شویید در سه حلال ذکر شده بدست آمد. عصاره های حاصل تا زمان انجام آزمایش در دمای 18°C - نگهداری شد [۱۱، ۱۲].

۲-۳- استخراج با مایکروویو

ابتدا ۱۰۰ گرم از گیاه شویید کمی آسیاب گردید، سپس با روش غوطه وری حدود یک ساعت در آب خیسانده شد (این مرحله برای خروج رطوبت اولیه در گیاه ضروری است). بعد از یک ساعت آب اضافی موجود گرفته شده و گیاه درون راکتور مایکروویو (LG 3853, Korea) قرار گرفت. در حدود ۶ دقیقه و با قدرت ۸۵۰ وات و در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد عصاره گیری انجام شد در طول فرآیند، زمان، دما، فشار و قدرت کنترل شد. پس از استخراج عصاره، تا زمان انجام آزمایش در یخچال نگهداری گردید [۱۳].

۲-۳- اندازه گیری ترکیبات فنلی کل

مقدار کل ترکیبات فنلی موجود در عصاره از طریق روش طیفسنجی با معرف فولین - سیوکالتیو مورد بررسی قرار گرفت [۱۰] و نتایج بر اساس میلی اکی والن اسید گالیک بر گرم عصاره بیان شد.

۲-۴- اندازه گیری ترکیبات توکوفرولی

مقدار کل ترکیبات توکوفرولی موجود در عصاره از طریق طیفسنجی بر اساس روش Wong و همکاران [۱۴] مورد بررسی قرار گرفت. مقدار کل ترکیبات توکوفرولی، بر مبنای میکروگرم α -توکوفرول در میلی لیتر عصاره بیان شد.

صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شد و ارزیابیها در ۳ تکرار صورت پذیرفت. از نرم افزار (Spss version 18) برای آنالیز دادهها و Excel برای رسم نمودارها استفاده گردید.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- میزان ترکیبات فنلی کل

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که روش های مختلف استخراج، نوع حلال تاثیر معنی داری ($p < 0.05$) بر میزان ترکیبات فنلی عصاره شوید داشت (نمودار ۱). بالاترین میزان ترکیبات فنلی در روش های استخراج فراصوت آب-اتانول و فراصوت-اتانول مشاهده شد (به ترتیب ۸۷۶/۰۲ و ۸۶۶/۸۵ میلی گرم در گرم وزن خشک) ($p < 0.05$). بعد از این روش، ترکیبات فنلی در روش تیمارهای استخراج آب-اتانول و فراصوت-آب بیشتر از سایر تیمارها بود ($p < 0.05$). کمترین میزان ترکیبات فنلی در روش استخراج با میکروویو مشاهده گردید

$$\%I = [1 - (As(24) - As(0)) / (Ac(24) - Ac(0))] \times 100$$

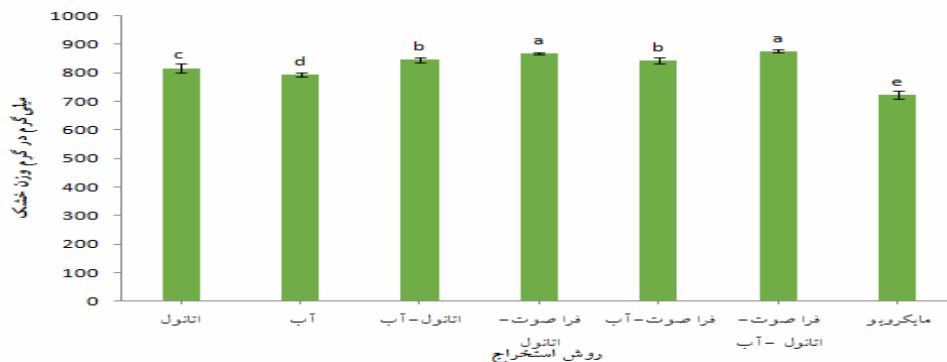
As(24): جذب نمونه بعد از ۲۴ ساعت، As(0): جذب نمونه در زمان شروع، Ac(24): جذب کنترل بعد از ۲۴ ساعت، Ac(0): جذب کنترل در زمان شروع، I%: درصد بازدارندگی

۲-۷- شاخص پایداری اکسایشی (OSI)

برای تعیین پایداری اکسایشی از دستگاه رنسیمت مدل ۷۴۳ استفاده شد. برای این منظور، عصاره های استخراجی به روش های مختلف با غلظت ۱۰۰۰ ppm در روغن سویا تهیه شد. برای هر آزمون ۳ گرم از نمونه های روغنی لازم بود. دما و سرعت جریان هوا در این دستگاه به ترتیب ۱۲۰ درجه سانتیگراد و ۱۵ لیتر بر ساعت تنظیم شد [۱۷].

۲-۸- تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده ها، با توجه به نرمال بودن داده ها و همگنی واریانس، با استفاده از روش آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) استفاده شد. برای مقایسه میانگین داده ها از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد استفاده شد. تمام دادهها به



نمودار ۱ اثر روش های مختلف استخراج بر میزان ترکیبات فنلی کل

ستون ها با حروف متفاوت نسبت به هم اختلاف معنی دار دارند. (a, b, c, ...).

بافتهای گیاهی دارند [۱۸]. استفاده از آب به عنوان حلال استخراج، یک محیط کاملاً قطبی ایجاد می کند که در آن برخی از ترکیبات فنولی با درجه قطبیت پائین به میزان کمتری استخراج می شوند. افزودن آب به حلالهای آلی با تشکیل یک محیط نسبتاً قطبی همراه بوده و بنابراین از استخراج مقادیر و انواع بیشتری از ترکیبات فنولی در این شرایط اطمینان حاصل می گردد. علاوه بر

روش فراصوت با حلال آلی توانست تفاوت قابل توجهی را نسبت روش های دیگر استخراج داشته باشد. حلالیت ترکیبات فنولی بسته به نوع حلال، درجه پلیمریزاسیون آنها و بر هم کنش آنها با سایر ترکیبات موجود در بافتهای گیاهی متفاوت است. در کل حلالهای اتانول و متانول به صورت مخلوط با آب توانایی بیشتری نسبت به حالت خالص در استخراج ترکیبات فنولی از

الکترون و الکترون آزاد می باشد [۲۲]. استفاده از رادیکال پایدار DPPH یکی از روش های معتبر، دقیق، آسان و مقرون به صرفه با تکرار پذیری بالا می باشد که جهت بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی اسانس ها و عصاره های گیاهی در شرایط آزمایشگاهی مورد استفاده قرار می گیرد [۲۳، ۲۴].

با افزایش غلظت و یا درجه هیدروکسیلاسیون ترکیبات فنلی، فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH افزایش می یابد که به عنوان فعالیت آنتی اکسیدانی تعریف می شود [۲۵]. از این رو در این آزمون، فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ها بر حسب درصد کاهش در میزان جذب محلول های DPPH در حضور عصاره های فنلی نسبت به محلول فاقد عصاره بیان می گردد [۲۶].

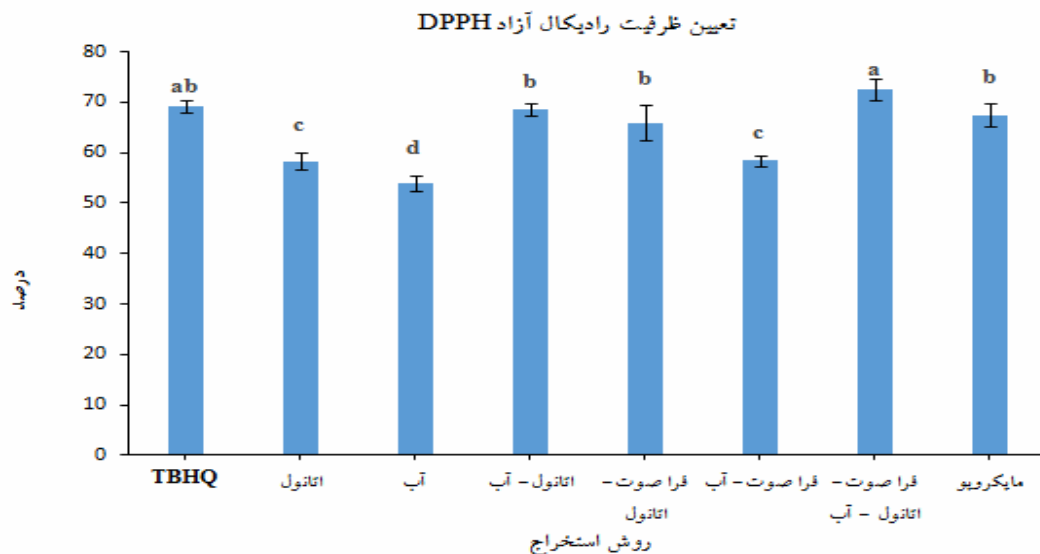
نتایج مطالعه حاضر نشان داد که روش های مختلف استخراج، نوع حلال و آنتی اکسیدان سنتزی تاثیر معنی داری ($p < 0/05$) بر میزان مهار رادیکال آزاد DPPH داشت (نمودار ۲).

این عصاره ی آبی حاوی مقادیر زیادی از ناخالصی های نظیر اسیدهای آلی، پروتئین ها و قندهای محلول می باشد که می توانند در تشخیص و تعیین مقدار ترکیبات فنولی تداخل ایجاد نمایند [۱۹] با توجه به این موارد، علت میزان بالای استخراج ترکیبات فنولی در عصاره های اتانولی نسبت به آب توجیه می شود.

پژوهش های فراوانی در زمینه استخراج ترکیبات فنلی از گیاهان مختلف انجام شده است [۲۰، ۲۱] در این پژوهش ها، تفاوت در قطبیت حلال های مورد استفاده جهت استخراج و حلالیت ترکیبات فنولی در آنها را دلیل اصلی تفاوت در مقدار ترکیبات فنولی عصاره های استخراج شده با حلال های مختلف ذکر شده است.

۲-۳- فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

عصاره های گیاهی به علت دارا بودن ترکیبات فنلی دارای فعالیت آنتی اکسیدانی و ظرفیت بالایی برای اهدای اتم هیدروژن یا



نمودار ۲ اثر روش های مختلف استخراج و آنتی اکسیدان سنتزی TBHQ بر فعالیت رادیکال آزاد DPPH

در این روش استخراج را می توان به علت بالا بودن ترکیبات فنلی در آنها دانست. افزایش غلظت ترکیبات فنلی به طور مستقیم توانایی عصاره های مختلف را در مهار رادیکال های آزاد افزایش می دهد. در غلظت های بالاتر ترکیبات فنولی، به دلیل افزایش تعداد گروه های هیدروکسیل موجود در محیط واکنش، احتمال

بر اساس نتایج این تحقیق، بیشترین میزان مهار رادیکال آزاد DPPH در تیمار استخراج فراصوت آب-اتانول مشاهده شد و میزان مهار رادیکال آزاد DPPH آن به جز با تیمار آنتی اکسیدان سنتزی TBHQ با سایر تیمارها اختلاف معنی دار نشان داد ($p < 0/05$). علت بالا بودن میزان مهار رادیکال آزاد DPPH را

سبب تجزیه هیدرو پراکسیدهای تولیدی و سبب کاهش رنگ شده و در نتیجه میزان جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر کاهش می یابد [۳۱].

نتایج مطالعه حاضر نشان داد عصاره های مختلف می تواند اکسیداسیون بتا کاروتن را کاهش دهند و قادرند رادیکال های آزاد را مهار نماید. این نتایج نشان می دهد که عصاره پتانسیل بالایی به عنوان آنتی اکسیدان طبیعی در سیستم های امولوسیونی دارند [۳۲]. همچنین روش های مختلف استخراج عصاره شوید، نوع حلال و آنتی اکسیدان سنتزی تاثیر معنی داری ($p < 0/05$) بر میزان بی رنگ شدن بتا کاروتن داشت (نمودار ۳). بیشترین میزان فعالیت آنتی اکسیدانی را روش استخراج فراصوت-اتانول از خود نشان داد (۵۵/۰۷) و به طور معنی داری بیشتر از روش های استخراج اتانول، فراصوت-آب، آب-اتانول و آب بوده است ($p < 0/05$). اما با تیمارهای استخراج مایکروویو، فراصوت-اتانول-آب و آنتی اکسیدان سنتزی TBHQ اختلاف معنی داری نشان نداد ($p > 0/05$). کمترین میزان به ترتیب در تیمارهای آب-اتانولی، آبی، اتانولی و اولترا آبی بود (به ترتیب $2/36 \pm 8/76$ ، $2/33 \pm 50/56$ ، $2/03 \pm 51/48$ و $0/7 \pm 51/43$). علت پایین تر بودن فعالیت آنتی اکسیدانی در این روش ها را می توان به دلیل پایین تر بودن ترکیبات فنلی در این روش ها دانست. با توجه به پایین بودن فعالیت آنتی اکسیدانی در روش های آبی، می توان این گونه بیان نمود که آنتی اکسیدان های قطبی در فاز آبی امولوسیون، با غلظت کمتری در فاز لیپیدی وجود دارند به طوری که سبب محافظت کمتری در برابر لینولئیک اسید امولسیون می شود. در حالی که آنتی اکسیدان های چربی دوست به علت غلظت بالاتر خود در فاز چربی، نشان داده شد که فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتری در امولسیون دارند [۳۳، ۳۴].

مطالعات نشان می دهد که بالا بودن ترکیبات فنلی دلیل عمده بالا بودن فعالیت آنتی اکسیدانی بعضی از عصاره ها از جمله عصاره های قطبی می باشد. زیرا بر اساس شواهد موجود ارتباط مثبتی بین میزان ترکیبات فنلی و قدرت آنتی اکسیدانی گیاهان وجود دارد. از طرف دیگر به نظر می رسد که ترکیبات فنلی که به صورت گسترده در گیاهان یافت میشوند و قدرت آنتی اکسیدانی بالایی دارند بیشتر از طریق عصاره های گیاهی آنها قابل استخراج باشد [۳۴، ۳۵].

اهداء هیدروژن به رادیکال آزاد و به دنبال آن قدرت مهار کنندگی عصاره افزایش می یابد [۲۶].

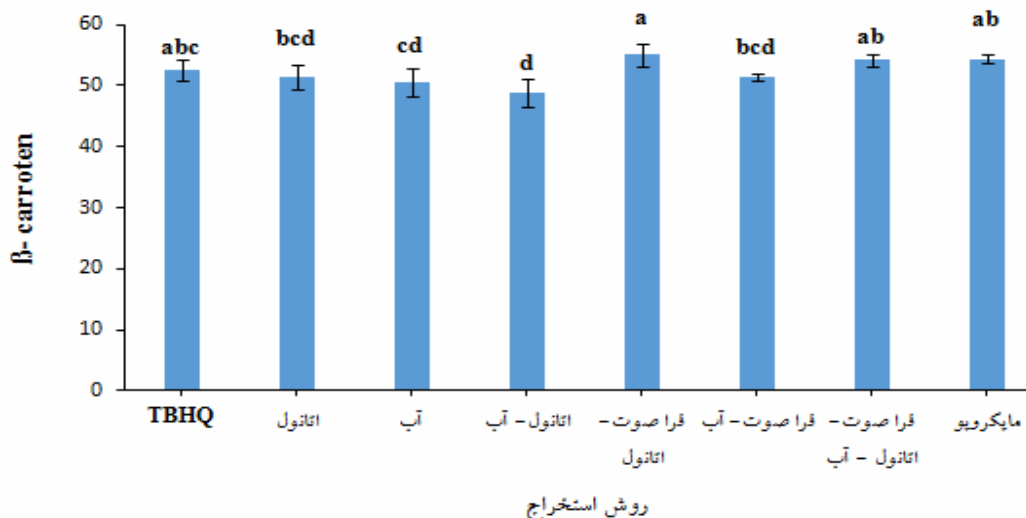
میزان مهار رادیکال آزاد DPPH در استخراج مایکروویو بالا می باشد اما میزان ترکیبات فنلی در این روش کمتر می باشد. احتمالاً نوع ترکیبات فنلی استخراج شده در این روش کارایی بالایی دارد و به خوبی می تواند سبب مهار رادیکال آزاد DPPH شود. قدرت مهار کنندگی عصاره های مختلف به میزان زیادی به تعداد و موقعیت گروه های هیدروکسیل و وزن مولکولی ترکیبات فنولی بستگی دارد. در ترکیبات فنولی با وزن مولکولی پایین تر گروه های هیدروکسیل راحت تر در دسترس قرار می گیرند [۲۷].

Pan و همکاران [۲۸] در مطالعه ای، فعالیت آنتی اکسیدانی پوست لنگان را با اتانول ۹۵٪ و دو روش سنتی و مایکروویو استخراج کردند. در هر دو روش عصاره فعالیت آنتی اکسیدانی بهتری نسبت به BHT از خود دادند. همچنین فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره حاصل از روش مایکروویو بهتر از روش سنتی بوده است که مطابق نتایج این پژوهش می باشد.

در مطالعه حاضر کمترین میزان مهار رادیکال آزاد DPPH در روش های استخراج آبی، الترا سوند آبی و اتانولی مشاهده شد (به ترتیب $1/50 \pm 53/89$ ، $0/94 \pm 58/4$ و $1/70 \pm 58/29$). علت کم میزان مهار رادیکال آزاد DPPH در این روش ها را می توان به دلیل کم بودن ترکیبات فنلی در آنها دانست. همچنین کمترین میزان مهار رادیکال آزاد DPPH برای تیمار استخراج با آب $53/89$ ٪ مشاهده شد ($p < 0/05$). در مجموع استفاده از روش استخراج های آلی برای مهار رادیکال آزاد DPPH مناسب تر از استخراج های آبی می باشد [۲۹].

۳-۳ بی رنگ شدن بتاکاروتن - لینولئیک اسید

رادیکال های سنتزی DPPH از روش های مهم برای نشان دادن قدرت و خاصیت آنتی اکسیدانی می باشد. اما نمی توانند با سوبسترای اکسیژن بیولوژیکی ترکیب شوند. بنابر این اطلاعات دقیق و مشخصی از فعالیت مهار رادیکال ها در عصاره نمی دهند [۳۰]. به این علت است که برای تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره از روش بتا کاروتن / امولسیون اسید لینولئیک استفاده می شود [۱۰]. با آزمون بی رنگ شدن بتاکاروتن می توان به قدرت خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره ها پی برد. به این صورت که مواد ناشی از اکسیداسیون اسید لینولئیک با بتاکاروتن بر هم کنش داده،

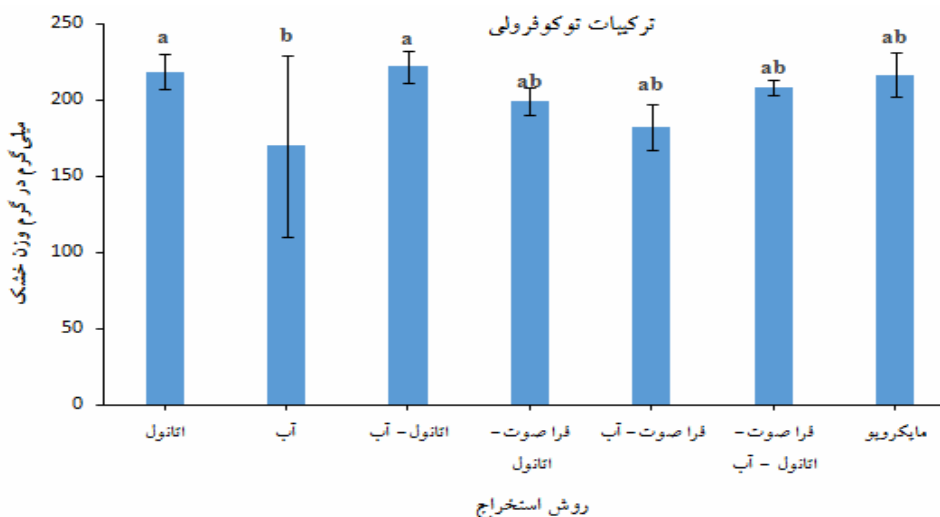


نمودار ۳ اثر روش های مختلف استخراج و آنتی اکسیدان سنتزی TBHQ بر بی رنگ شدن بتاکاروتن- لینولئیک اسید

خاصیت ویتامینی را دارد [۳۵]. در این مطالعه میزان ترکیبات توکوفرولی بر اساس آلفا توکوفرول تعیین شد. با توجه به نتایج (نمودار ۴) تیمارهای استخراج اتانول-آب و اتانول دارای اختلاف معنی دار با تیمار استخراج آب بوده است (به ترتیب ۲۲۱/۷۶، ۲۱۸/۵۷ و ۱۶۹/۸۵ میلی گرم در گرم وزن خشک) ($p < 0.05$). و بین سایر تیمارهای استخراج اختلاف معنی داری مشاهده نشد ($p > 0.05$).

۳-۴- میزان ترکیبات توکوفرولی

توکوفرولها شامل ۴ نوع ایزومر α ، β ، γ و δ می باشند. تعداد گروه های متیل متصل به بخش هتروسیلیک آنها متفاوت بوده و نامگذاری بر اساس آن صورت می گیرد. توکوفرولها محلول در چربی و روغن ها می باشند و دارای خاصیت ویتامینی و آنتی اکسیدانی می باشند. آلفا توکوفرول (α - توکوفرول) بیشترین



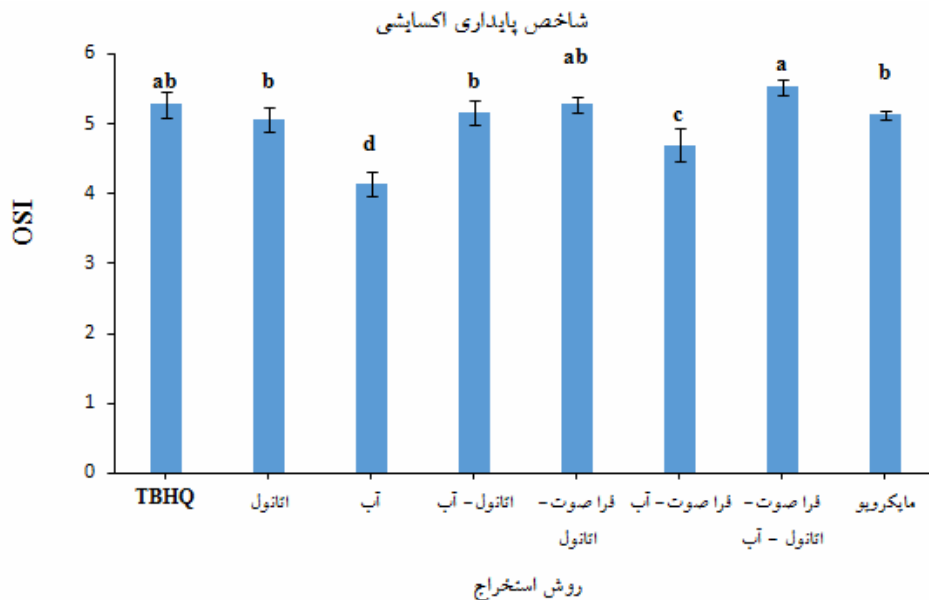
نمودار ۴ اثر روش های مختلف استخراج بر میزان ترکیبات توکوفرولی

شرایط تعریف شده و فساد ناشی از آن که باعث تولید طعم و بوی نامطلوب می گردد تعریف کرد [۳۶]. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که روش های مختلف استخراج، نوع حلال و آنتی اکسیدان سنتزی تاثیر معنی داری ($p < 0/05$) بر میزان شاخص پایداری اکسایشی داشت (نمودار ۵). مقادیر شاخص پایداری اکسایشی تیمار استخراج الترا سوند-آب-اتانول به جز با تیمارهای TBHQ و الترا سوند-اتانول به طور معنی داری ($p < 0/05$) بیشتر از مابقی تیمارها بود (به ترتیب ۵/۵۴، ۵/۲۸ و ۵/۲۸).

ترکیبات توکوفرولی قطبیت پایین دارند، استفاده از ترکیبات قطبی سبب می شود که ترکیبات توکوفرولی با درجه قطبیت پائین به میزان کمتری استخراج شوند. اما با توجه به مناسب بودن روش استخراج فرا صوت برای ترکیبات با قطبیت پایین می توان دلیل بالا بودن ترکیبات توکوفرولی در این روش دانست.

۳-۵- شاخص پایداری اکسایشی (OSI)

طی فرآیند های حرارتی در صورت پایدار نبودن روغن در این دماها محصولات اولیه و ثانویه اکسایشی نظیر آلدئیدهای کوتاه زنجیر، هیدروپراکسیدها و مشتقات کتونی تولید می گردند. پایداری اکسایشی را می توان مقاومت روغن ها و چربی ها تحت



نمودار ۵ اثر روش های مختلف استخراج و آنتی اکسیدان سنتزی TBHQ بر شاخص پایداری اکسایشی

میزان ترکیبات فنلی با شاخص پایداری اکسایشی در ارتباط مستقیم است. در این مطالعه ترکیبات فنلی خاصیت آنتی اکسیدانی قوی از خود نشان دادند. در مجموع عصاره شوید به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی در همه آزمایش های آنتی اکسیدانی بود. همچنین نتایج آزمایش های مهار رادیکال آزاد DPPH و شاخص پایداری اکسایشی با هم، هم خوانی داشت. در هر دو مورد بهترین نتیجه تیمار فرا صوت آب-اتانول بود. و همچنین هر دو روش اختلاف معنی داری با آنتی اکسیدان سنتزی TBHQ نداشت ($p > 0/05$).

علت بالا بودن شاخص پایداری اکسایشی را در این روش استخراج می توان به علت قطبی بودن حلال و همچنین بالا بودن ترکیبات فنلی دانست که مانند سایر روش های ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی در ارتباط با میزان ترکیبات فنلی می باشد. همچنین شاخص پایداری اکسایشی در تیمار استخراج آب به طور معنی داری ($p < 0/05$) کمتر از مابقی تیمارها بود (۴/۱۴). علت این امر را می توان به علت ایجاد یک محیط کاملاً قطبی توسط آب که منجر به پایین آمدن میزان ترکیبات فنلی می شود و

۴- نتیجه گیری نهایی

روش فراصوت یک روش ارزان، ساده و موثر بوده و افزایش بازده عصاره گیری و افزایش سرعت واکنش مهم ترین محاسن این روش به شمار می رود. برای استخراج ترکیبات فنلی و توکوفرلی عصاره شوید از این روش استفاده شد و با روش استخراج مایکروویو و حلال های مختلف استخراج مقایسه شد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ترکیبات فنلی، توکوفرلی و روش های مختلف آزمون آنتی اکسیدانی تحت تاثیر روش های مختلف استخراج و نوع حلال بوده است. با توجه به نتایج در بین روش های مختلف استخراج بهترین روش استخراج روش فراصوت آب- اتانولی بود. عصاره شوید سرشار از ترکیبات توکوفرولی و فنلی می باشد و فعالیت آنتی اکسیدانی مناسبی را از خود نشان داد و همچنین فعالیت آنتی اکسیدانی مشابهی با آنتی اکسیدان سنتزی TBHQ داشت و می تواند در صنایع غذایی، پزشکی، دارویی و آرایشی-بهداشتی مورد استفاده قرار گیرد و جایگزین مناسبی برای آنتی اکسیدان های سنتزی شود.

۵- منابع

- [6] Burits M, 2000, Bucar F. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research*. 14: 328-323.
- [7] Zargari, A., 1991, Medicinal plants, Volume 5 Tehran University Press, 528- 531.
- [8] Mozafarian VA (1996). Dictionary of Iranian Plant Names. Farhang Mosavar, Tehran.
- [9] Akhondzadeh. S. 2010. Dill. Encyclopedia of Iranian medical plants. Institute of medicinal plants. Jahad Jahade-Daneshgahi. 1: 30
- [10] Esmailzadeh Kenari. R, Mohsenzadeh. F, Amiri. Z. 2014. Antioxidant activity and total phenolic compounds of Dezful sesame cake extracts obtained by classical and ultrasound-assisted extraction methods. *Food science & nutrition*, doi: 10.1002/fsn3.118.
- [11] Martino. E, Ramaiola. I, Urbano. M. 2006. Microwave-assisted extraction of coumarin and related compounds from *Melilotus officinalis* (L.) Pallas Alternative to Soxhlet and ultrasound-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*. 1125:147-151.
- [12] Albu. S, Joyce. E, Paniwnyk. L, Lorimer. P, Mason. J. 2004. Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. *Ultrasonics Sonochemistry*. 11: 261-265.
- [13] Aberoomand Azar. P, Mottaghianpuor. Z, Sharifan. A, Larijani. K, 2012, Studies on the Effect of Extraction Method on Chemical Composition and Antimicrobial Activity of *Carum copticum* Essential Oil, *Food Technology & Nutrition*, 7 (2), 75-84.
- [14] Wang, S. Y, Galletta. G. J. 2002. Compositional change in *Colletotrichum* (Anthracnose) infected strawberry fruit. *Acta Horticulturae*. 567: 815-819.
- [15] Blois. M.S. 1958. Antioxidants determination by the use of a stable free radical. *Nature*. 4617: 1199-1200.
- [16] Amarowicz. R, Pegg. R. B, Rahimi-Moghaddam. P, Barl. B, Weil. J. A. 2004. Freeradical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*. 84, 551-562.
- [17] Farhoosh, R. 2007. The effect of operational parameters of the Rancimat method on the determination of the oxidative
- [1] Karmali. M. A. 1989. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev*. 2:15-38.
- [2] Shi. J, Nawaz. H, Pohorly. J, Mittal. G. 2005. Extraction of Polyphenolics from Plant Material for Functional Foods-Engineering and Technology. *Food Reviews International*, 21: 1-12.
- [3] Park. T.D, Adams. D.A, Zhou. K, Harris. M, Yu. L. 2000. Fatty acid composition and oxidative stability of cold-pressed edible seed oils. *Journal of Food Science*. 68: 41240-1243.
- [4] Wannurul. Z. 2009. Extraction of antioxidant and compounds from red, pitaya using soxhlet extraction method. Thesis of Faculty of Chemical & Natural Resources Engineering Universiti Malaysia Pahang.
- [5] Sathishkumar. R, Lakshmi. P. T. V, Annamalai. A. 2009. Effect of drying treatment on the content of antioxidants in *Encostemma littorale blume*. *Research Journal of Medicinal Plant*. 3(3): 93-101.

- [27] Jung. C. H, Seog. H.M, Choi IW, Park MW and Cho HY, 2006. Antioxidant properties of various solvent extracts from wild ginseng leaves. LWT. 39: 266-274.
- [28] Pan. Y, Wang. K, Huang. S, Wang. H, Mu. X, He. C, Ji. X, Zhang. J, Huang. F. 2008. Antioxidant activity of microwave-assisted extract of longan (*Dimocarpus Longan* Lour.) peel. Food Chemistry. 106(3): 1264-1270.
- [29] Kim. D. O, Lee. K. W, Lee. H. J, Lee. C. Y. 2002. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. Food Chemistry. 50: 3713-3717.
- [30] Dorman. H. J, Kosar. D. M, Kahlos. K, Holm. Y, Hiltunen. R. 2003. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties and cultivars. J Agric Food Chem. 51: 4563-4569.
- [31] Mohdaly. A. A. A, Iryna. S, Mohamed. F. R, Mohamed. A. S, Mahmoud. A. 2011. Antioxidant potential of sesame (*Sesamum indicum*) cake extract in stabilization of sunflower and soybean oils. Ind. Crops Prod. 34: 952-959.
- [32] Maurya. S, Singh. D. 2010. Quantitative analysis of total phenolic content in *Adhatoda vasica* Nees extracts. Int. J. Pharmtech Res. 2: 2403-2406.
- [33] Turkmen. N, Sari. F, Velioglu. Y.S. 2006. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. Food Chemistry. 99(4): 835-841.
- [34] hatchawan. C, Soottawat. B, Jakul. H, Nattiga. S. 2008. Antioxidant components and properties of five long-grained rice bran extracts from commercial available cultivars in Thailand. Food Chem. 111 (3): 636-641.
- [35] Demurin. Y. 1986. Phenotypic Variability and Correlation between Tocopherol Content and Some Biochemical Characters in Sunflower Seeds (in Russian). Sci. Tech Bull. VNIIMK, Krasnodar. 93:21-24.
- [36] Esmailzadeh kenari, R.; (2008); Study of stabilizing canola oil and using it for deep frying; Phd thesis; Ferdowsi agriculture university.
- stability measures and shelf-life prediction of soybean oil. Journal of the American Oil Chemists Society. 84(3): 205-209.
- [18] Suzuki. M, Watanabe. T, Miura. A, Harashima. E, Nakagawa. Y, Tsuji. K. 2002. An extraction solvent optimum for analyzing polyphenol contents by Folin-Denis assay. Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi. 49: 507-511.
- [19] Chirinos. R, Rogez. H, Campos. D, Pedreschi. R, Larondelle. Y. 2007. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz and Pavon). Separation and Purification Technology, 55: 217-225.
- [20] Negi. P, Jayaprakasha, S. 2003. Antioxidant and antibacterial activities of *Punica granatum* peel extracts. Journal of food science 68(4): 1473-1477.
- [21] Shon. M. Y, Kim. T. H, Sung. N. J. 2003. Antioxidants and free radical scavenging activity of *Phellinus baumii* extracts. Food Chemistry. 82: 593-597.
- [22] Demirci. B, Kosar. M, Demirci. F. 2007. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of *Chaerophyllum libanoticum* Boiss. et Kotschy. J Agric Food Chem. 105: 1512-1517.
- [23] Dordevic. S, Petrovic. S. 2007. Antimicrobial, anti-inflammatory, anti-ulcer and antioxidant activities of *Carlina acanthifolia* root essential oil. Journal of Ethnopharmacology. 109: 458-463.
- [24] Zou. T, Wang. D, Guo. H, Zhu. Y, Luo. X, Liu. F. 2012. Optimization of microwave-assisted extraction of anthocyanins from mulberry and identification of anthocyanins in extract using HPLC-ESI-MS. J Food Sci. 77(1):C46-50.
- [25] 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 and antioxidant potential. Food Chemistry. 101: 549-558.
- [26] Sanchez-Moreno. C, Larrauri. J. A, Saura-Calixto. F. 1999. Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. Food Research International. 32:407-412.

The effect of extraction methods on phenolic and tocopherol content and antioxidant properties of dill extracts (*Anethum graveolens*)

Hasannia, M. ^{1*}, Ariaii, P. ², Fattahi, E. ²

1. Student of Food Science, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University

2. Assistant. Prof., Dept. of Food Science and Technology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University

(Received: 93/9/11 Accepted: 94/7/6)

Dill (*Anethum graveolens*) is a plant belonging to the Apiaceae family rich sources for tocopherol and phenolic content, including antioxidant activity. These diet antioxidants are important as they protect human body against oxidative stress and therefore maintain appropriate health. The propose of this study evaluate the effect of extraction methods (ultrasound and Microwave) and solvents (ethanol, ethanol/water (50:50), and water) on tocopherol and phenolic content and antioxidant properties of dill extracts are to determine the most suitable extraction method for optimal use of this product. The antioxidant activities of each extract are evaluated with the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), β -carotene bleaching and oxidative stability index (OSI). In all antioxidant assays the ultrasound water/ethanol and ultrasound-ethanol had highest antioxidant activity and they didn't have significant difference with synthetic antioxidant TBHQ. According to the result dill extract with the method of ultrasound ethanol/water and ultrasound- ethanol can be replace with synthetic antioxidant in food industries.

Keywords: Dill, DPPH, Phenolic content, β -carotene bleaching

* Corosponding Author E-Mail Address: masome_hasannia@yahoo.com