بررسی اثر حلال‌های مختلف بر محتوای فنلی کل و فعالیت ضداکسایشی عصاره غلاف نخود فرنگی

مسعود قربانی[1]، علی گنجلو[2*]، ماندانا بیمکر[2]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان
۲- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان

(تاریخ دریافت: ۹۵/۰۱/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۳/۲۵)

چکیده

در پژوهش حاضر اثر حلال‌های مختلف (آب، استون، اتانول و هگزان) بر راندمان استخراج، محتوای فنلی کل و فعالیت ضداکسایشی عصاره غلاف نخود فرنگی مورد بررسی قرار گرفت. بالاترین راندمان استخراج به ترتیب مربوط به عصاره استحصال شده با حلال آب (١٦/٥٧±٠/٩٤ درصد)، اتانول (٣/٠٢±٠/٤٣ درصد)، هگزان (١/٠٧±٠/٠٢ درصد) و استون (٠/٩٨±٠/٠١ درصد) بود. محتوای فنلی کل به روش فولین-سیوکالتیو تعیین شد و نتایج نشان داد که بیشترین میزان ترکیبات فنلی کل به ترتیب مربوط به عصاره استخراج شده با اتانول (١٢/١٢±٠/١٩ میلی گرم معادل گالیک اسید بر گرم وزن نمونه خشک)، استون (١٠/٠٣±٠/١٢ میلی گرم معادل گالیک اسید بر وزن نمونه خشک)، آب (١/٦١±٠/٠٥ میلی گرم معادل گالیک اسید بر وزن نمونه خشک) و هگزان (٠/٧٢±٠/٠٥ میلی گرم معادل گالیک اسید بر وزن نمونه خشک) می‌باشد. فعالیت ضداکسایشی به دو روش دی‌فنیل پیکریل هیدرازین (DPPH) و هیدروژن پراکسید(H_2O_2) اندازه گیری شد. بیشترین میزان فعالیت ضداکسایشی اندازه گیری شده به روش دی‌فنیل پیکریل هیدرازین به ترتیب مربوط به عصاره اتانولی(٨١/٩٦±٠/١٥ درصد)، استونی (٦٥/٩٤±١/٣٣ درصد)، آبی (٤٨/٠٤±٠/١٧ درصد) و هگزانی (٤١/٥٤±٠/١٩) بود. در روش هیدروژن پراکسید نیز بالاترین فعالیت ضد اکسایشی به ترتیب برای عصاره‌های اتانولی (٧/٦٥±٠/١٢ درصد)، استونی (٣/٣٣±٠/١٣ درصد)، آبی (١/٤١±٠/٠٧ درصد) و هگزانی (١/٩٤±٠/٣٥ درصد) مشاهده شد. در نهایت می توان نتیجه گرفت عصاره اتانولی نسبت به سایر عصاره‌ها محتوای فنلی کل و فعالیت ضداکسایشی بالاتری داشت.

کلیدواژگان: ترکیبات فنلی، ضداکسایش طبیعی، غلاف نخودفرنگی، هیدروژن پراکسید، دی‌فنیل پیکریل هیدرازین

* مسئول مکاتبات: aganjloo@znu.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-27]

۱- مقدمه

نخود فرنگی[1] (*Pisum sativum* L.) از خانواده حبوبات بوده که در زبان انگلیسی نخود[2] نامیده می‌شود و به نام‌های نخود باغچه‌ای[3] و نخود سبز فرنگی[4] نیز شناخته می‌شود. این گیاه با آب و هوای سرد و معتدل سازگار شده است و در اکثر نقاط جهان کشت می‌شود. نخود فرنگی گیاهی یکساله، علفی و نیمه قائم[5] است که در صورت وجود تکیه گاه تمایل به صعود دارد. گل‌های آن معمولاً به رنگ سفید، صورتی و گاهی ارغوانی هستند [۱].

اکسیژن برای حیات موجودات هوازی ضروری است، با این حال متابولیت‌های تولید شده توسط آن تهدیدی بالقوه برای همه موجودات زنده محسوب می‌شود. در واقع اکسیژن در بدن حیوانات با کاهش پی در پی آنیون سوپراکسید ($O_2^{\cdot-}$)، هیدروژن پراکسید (H_2O_2) و رادیکال هیدروکسید ($OH^{\cdot}$) متابولیزه می‌شود. این متابولیت‌های مختلف گونه‌های اکسیژن فعال[6] نامیده می‌شوند[۲]. شواهد زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد رادیکال‌های آزاد مسئول آسیب به چربی‌ها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک سلول‌ها می‌باشند و منجر به بروز برخی ناهنجاری‌های بیماری‌زا و فیزیولوژیکی مانند التهاب و بیماری‌های قلبی می‌شوند [۳].

ضداکسایش‌ها موادی هستند که با از بین بردن اثرات گونه‌های اکسیژن‌فعال از فرایندهای اکسیداسیون در بدن انسان جلوگیری کرده و همچنین می‌توانند از بین رفتن محصولات غذایی را به تاخیر بیاندازند. ضداکسایش‌های مصنوعی نظیر بوتیلات هیدروکسی آنیزول[7]، بوتیلات هیدروکسی تولوئن[8] و ترشیو بوتیل هیدروکینون[9] توانایی جلوگیری از واکنش‌های اکسایشی را دارند. با این حال گزارشاتی مبنی بر اثرات نامطلوب این نوع از ضداکسایش‌ها بر سلامتی انسان منتشر شده است که بروز سرطان و تورم‌کبد از این جمله می‌باشند [٤].

ضداکسایش‌های طبیعی از تمام بخش‌های گیاهان از جمله میوه، ریشه و برگ قابل استحصال‌اند و امروزه استفاده از ضداکسایش‌های طبیعی به جای ضداکسایش‌های مصنوعی پیشنهاد می‌شود. با توجه به اینکه بسیاری از گیاهان به صورت طبیعی و به منظور حفاظت از خود در برابر عوامل تهدیدکننده نظیر آسیب‌های فیزیکی و بیماری‌ها این ترکیبات را تولید می کنند، می‌توانند منبع بسیار خوبی از ترکیبات ضداکسایشی طبیعی محسوب شوند [۵]. در این بین فنل‌هایکیازمهم‌ترین ترکیبات ضداکسایش طبیعیبودهوموجب افزایش زمان نگهداری موادغذایی خام و فراوریشدهمی‌شوند [٦]. همچنین وجود ترکیباتی مانند تانن‌ها و کومارین در بخش‌های مختلف گیاه اعم از برگ، میوه، دانه، پوست و ریشه نیز گزارش شده است که اثرات بیولوژیکی مختلفی از جمله فعالیت ضداکسایشی دارند.به همین دلیل علاقه به استخراج این ترکیبات از منابع گیاهی و استفاده از آن‌ها به عنوان ضداکسایش‌های طبیعی وجود دارد. از اینرو ضایعات صنایع تبدیلی فرآورده‌های کشاورزی می‌توانند منابعی غنی از ضداکسایش‌های طبیعی محسوب شوند که عمدتاً مربوط به دانه و پوسته آنها است.این مواد فنلی و پلی‌فنلی شامل ترکیبات بسیاری اعم از اسیدهای فنولیک، آنتوسیانین‌های رنگی، فلاونوئیدهای ساده و فلاونوئیدهای پیچیده هستند که می‌توانند علاوه بر افزایش ثبات موادغذایی با جلوگیری از اکسیداسیون لیپیدها، از سلول‌ها در برابر آسیب‌های اکسایشی نیز محافظت کنند [۷].

عموما به منظور استخراج پلی فنل‌ها و ترکیبات فعال زیستی از مواد گیاهی، از آب و حلال‌های آلی(اتانول، متانول، استون و دی‌اتیل‌اتر) استفاده می‌شود که درصد استحصال به نوع حلال و روش استخراج مورد استفاده بستگی دارد [۸].

در پژوهشی به بررسی فعالیت ضداکسایشی و محتوای فنلی کل[10] پوست پسته پرداخته شد. در این مطالعه ضداکسایش‌های فنولیک پوست پسته با دو روش استخراج با حلال و استخراج به کمک امواج فراصوت و با سه حلال مختلف (آب، متانول و اتیل‌استات) بررسی شد. میزان ترکیبات فنلی کل با روش فولین–سیوکالتیو مشخص شد. مشاهدات نشان داد در غلظت ۰/۰٦ درصد، عصاره پوست پسته دارای فعالیتی مشابه بوتیلات هیدروکسی آنیزول و بوتیلات هیدروکسی تولوئن‌بود. بهترین روش برای استخراج ترکیبات فنولی استخراج با آب یا حلال اتانول گزارش شد. نتایج نشان داد که عصاره پوست پسته دارای خواص ضداکسایشی است و می توان از آن به عنوان

1. Green pea
2. Pea
3. Garden pea
4. Fieldpea
5. Semi-Erect
6. Reactive Oxygen Species (ROS)
7. *Butylated Hydroxyanisole*
8. *Butylated Hydroxytoluene*
9. *Tertiary Butylhydroquinone*
10. *Total Phenolic Content*

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-27]

جایگزین ضداکسایش‌های مصنوعی استفاده نمود [۹].

در مطالعه‌ای محتوای ترکیبات فنلی و فعالیت‌های ضداکسایشی عصاره پوست نوعی آجیل[1](*Jatropha curcas*L.)مورد بررسیقرار گرفت. عصاره با حلال‌های اتیل‌استات، اتانول و آب استخراج شده و با استفاده از روش فولین سیکالتیو محتوای فنل کل اندازه‌گیری گردید و از روش‌های دی‌فنیل پیکریل هیدرازین[2] (*DPPH*) ، ۲و۲´ آزینوبیس (۳- اتیل بنزتیازولین- ٦-سولفونیک اسید[3]) (*ABTS*) و مهار رادیکال‌های هیدروکسیل[4]، ظرفیت جذب رادیکال اکسیژن[5](*ORAC*) و چلاته‌کردن (درگیر کردن) یون‌های فلزی[6] برای اندازه‌گیری فعالیت ضداکسایشی استفاده گردید. نتایج نشان داد هر سه عصاره تهیه شده حاوی محتوای فنل کل بالایی هستند. در نهایت بیشترین فعالیت ضداکسایشی عصاره استخراج شده به ترتیب مربوط به عصاره استخراج شده با آب، اتانول و اتیل استات بود [۱۰].

در پژوهشی تاثیر روش‌های خشک‌کردن (انجمادی، هوای داغ، تحت خلاء و مادون قرمز) بر محتوای فنل کل، کارتنوئیدها و خصوصیات ضداکسایشی انبه بررسی گردید. محتوای فنل کل، کارتنوئیدها، ویتامین ث و فعالیت‌ضداکسایشی مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین محتوای فنل کل با روش خشک کردن انجمادی و کمترین آن با خشک کردن با هوای داغ حاصل شد. همچنین نمونه خشک شده به روش انجمادی نسبت به سایر روش‌ها بالاترین فعالیت ضداکسایشی را داشت [۱۱]

ضایعات تقریبی حاصل از فراوری نخودفرنگی (شامل غلاف و دم آن) حدود ٤١-٤٠ درصد است که درصد بالایی از محصول را شامل می‌شود که در نهایت اهمیت بررسی فعالیت ضداکسایشی ترکیبات زیست فعال حاصل از این ضایعات را تقویت می‌نماید. هدف از این مطالعه بررسی تاثیر حلال‌های مختلف بر استخراج ترکیبات زیست فعال نظیر ترکیبات فنلی از غلاف نخود فرنگی و بررسی فعالیت ضداکسایشی عصاره استخراج شده است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد شیمیایی و دستگاه‌های استفاده شده

اتانول، استون، هگزان متانول، دی فنیل پیکریل هیدازین، محلول هیدروژن پراکسید ۱۰ درصد، بافر فسفات (*pH*:۷/٤)، فولین‌سیکالتیو، سدیم‌کربنات، آسیاب آزمایشگاهی، دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل *SPECORD* 250 (ساخت کشور آمریکا)، دستگاه روتاری تحت خلاء مدل *BuchiRotavapor R-205* (ساخت کشور سوئیس).

۲-۲- آماده سازی نمونه و استخراج عصاره

در این پژوهش میزان ۵۰ کیلوگرم غلاف‌های نخودفرنگی تهیه شد. نخودفرنگی‌های مورد استفاده در خرداد ماه سال ١٣٩٤ از مزارع شهرستان طارم در استان زنجان برداشت شده بودند. به منظور آماده سازی نمونه، غلاف‌ها شسته شده و سپس با استفاده از آون ۵۰°C خشک شدند. نمونه‌های خشک شده تا قبل از انجام عصاره‌گیری (روز بعد) در یخچال با دمای ٤°C نگهداری شدند. قبل از انجام عصاره‌گیری، نمونه‌ها توسط دستگاه آسیاب آزمایشگاهی به مدت ٤٠ ثانیه خرد و توسط الک‌آزمایشگاهی با مش۳۵ جدا شدند. نمونه‌های آسیاب شده تا زمان انجام آزمون در فریزر با دمای ۱۸°C- نگهداری شدند. سه گرم از نمونه آسیاب شده را با نسبت ۱ به ۲۰ با حلال مورد نظر مخلوط کرده و به مدت ٢٤ ساعت در ظروف تیره درب‌دار و فضای تاریک در دمای محیط (۲۵ °C) قرار داده تا استخراج عصاره به روش خیساندن صورت گیرد. پس از سپری شدن زمان مذکور مخلوط فوق را با کاغذ صافی واتمن شماره ٤ صاف کرده و سپس بخش مایع حاوی عصاره را با دستگاه روتاری تحت خلاء خشک شد. عصاره بدست آمده تا زمان آزمون در فریزر با دمای ۱۸°C- (حداکثر ٢٤ ساعت) نگهداری شد[۱۲]. به منظور افزایش دقت در نتایج حاصله در این پژوهش برای هر آزمون سه تکرار در نظر گرفته شد.

۲-۲-۱- اندازه گیری عملکرد عصاره گیری

عملکرد عصاره گیری با حلال‌های مختلف از طریق فرمول ۱ محاسبه گردید[۱۳].

$$\text{درصد عملکرد عصاره‌گیری} = (\frac{m_2}{m_1})\times 100$$

که m_2 وزن عصاره خشک استخراج شده و m_1 وزن نمونه آسیاب شده مورد استفاده جهت استخراج است.

1. *Barbados Nut* ؛ *Purging Nut*
2. *2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl*
3. *2,2´azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)*
4. *OH radical scavenging activity*
5. *Oxygen radical absorbance capacity*
6. *Fe2+-chelating assay*

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-27]

۲-۳- اندازه گیری میزان ترکیبات فنلی کل

محتوای فنلی کل عصاره‌ها با استفاده از روش فولین-سیکالتیو مورد بررسی قرار گرفت [۱٤]. از گالیک‌اسید به عنوان استاندارد این آزمون استفاده شد. ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محلول استاندارد گالیک اسید، با حل‌کردن ۲۵۰ میلی‌گرم گالیک اسید خشک در ۱ میلی‌لیتر حلال عصاره‌گیری تهیه و سپس با آب مقطر به حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. محلول بدست آمده در دمای ٤°C نگهداری شد و منحنی کالیبراسیون استاندارد بر اساس گالیک اسید (۰/۰۵-۰/۰۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) رسم گردید. عصاره با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره به لوله آزمایش منتقل شده، سپس ۰/۷۵ میلی‌لیتر از شناساگر فولین-سیکالتیو (که قبلا با نسبت ۱ به ۱۰ با آب دیونیزه شده رقیق شده است) اضافه شد و مخلوط گردید. به مخلوط اجازه داده شد به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق بماند. سپس ۰/۷۵ میلی‌لیتر از سدیم‌کربنات ٦٪ (وزنی-حجمی) به مخلوط اضافه شده و به آرامی بهم زده شد. پس از نگهداری مخلوط نهایی به مدت ۹۰ دقیقه در دمای اتاق میزان جذب در طول موج ۷٦۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر ثبت گردید.

۲-۳-۱- رسم منحنی استاندارد گالیک اسید

به منظور رسم منحنی استاندارد گالیک اسید جهت بیان میزان ترکیبات فنل کل به صورت میلی گرم معادل گالیک اسید در گرم نمونه خشک، ابتدا غلظت‌های ۰/۰۲۵، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/٤ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از پودر گالیک اسید تهیه شد و دقیقا به همان صورت که در بالا بیان شد محلول‌ها اضافه شده و میزان جذب در طول موج ۷٦۵ نانومتر ثبت گردید. معادله خط بدست آمده با ضریب همبستگی بالا(۰/۹۹۵) بصورت $Y=4.8538x+0.0351$ بود.

۲-٤- اندازه‌گیری فعالیت ضداکسایشی به روش *DPPH*

بررسی فعالیت به دام اندازی رادیکال‌های آزاد *DPPH* یکی از روش‌های تعیین میزان فعالیت ضداکسایشی است که در این روش رنگ ارغوانی رادیکال‌های آزاد *DPPH* در طول موج۵۱۷نانومتر،توسط ترکیبات ضد اکسایش کاهش یافته و به رنگ زرد تبدیل می‌شود. درجه بی‌رنگ شدن این ترکیب بیانگر قدرت به دام اندازی رادیکال‌های آزاد توسط ترکیبات ضد اکسایش مربوطه می‌باشد. برای انجام این آزمایش ابتدا ۰/۲ میلی لیتر از نمونه استخراج شده با متانول رقیق شده (غلظت نهایی ۰/۰۱ گرم بر میلی‌لیتر) و ۲ میلی‌لیتر محلول *DPPH* (۰/۵ میلی‌مولار) به آن اضافه شد. پس از ۳۰ دقیقه قرار گرفتن مخلوط در محیط تاریک میزان جذب توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری گردید. درصد رادیکال‌های به دام انداخته شده *DPPH* با استفاده از فرمول ۲ محاسبه شد [۱۵].

$$\text{درصد مهار رادیکال آزاد } DPPH = \left(\frac{A_i - A_t}{A_t}\right)\times 100$$

در این رابطه A_i میزان جذب نمونه (حاوی نمونه و رادیکال *DPPH*) و A_t میزان جذب محلول *DPPH*خالص است.

۲-۵- اندازه گیری فعالیت ضداکسایشی به روش هیدروژن پراکسید

توانایی به دام انداختن پراکسید هیدروژن توسط عصاره‌های گیاهی با استفاده از روش ارائه شده توسط راچ[1] و همکاران (۱۹۸۹) اندازه‌گیری شد. محلول پراکسید هیدروژن (٤۰ میلی‌مولار) در بافر فسفات (۵۰ میلی‌مولار، *pH* ۷/٤) تهیه گردید. عصاره با غلظت۰/۰۱ گرم بر میلی‌لیتر به پراکسید هیدروژن‌اضافه شد و پس از ۱۰ دقیقه میزان جذب در طول‌موج ۲۳۰ نانومتر در مقایسه با نمونه شاهدی که حاوی بافر فسفات بدون پراکسید هیدروژن‌است، قرائت گردید. درصد به دام اندازی پراکسید هیدروژن از طریق فرمول ۳ بدست آمد[۱٦]:

$$\text{درصد پراکسید هیدروژن به دام انداخته شده} = \left(\frac{A_i - A_t}{A_t}\right)\times 100$$

میزان جذب A_t میزان جذب نمونه شاهد و A_i در این رابطه نمونه مورد آزمایش است.

۲-٦- تجزیه و تحلیل آماری

نمونه برداری از ۵۰ کیلوگرم غلاف نخود فرنگی جهت انجام فرایند استخراج به صورت کاملا تصادفی و با سه تکرار انجام شد. پس از جمع آوری داده‌ها اطلاعات با استفاده از نرم افزار Minitab v.16 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. آنالیز واریانس به روش مدل خطی تعمیم یافته[2] و مقایسه میانگین‌ها

1. *Ruch* et al.
2. Generalized linear model

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-27]

به روش توکی در سطح اطمینان ۵ درصد انجام شد.تمام داده‌ها به صورت میانگین±انحراف معیارگزارش شده است.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- اثر نوع حلال بر عملکرد استخراج

فرایندهای مختلفی نظیر آسیاب کردن، الک کردن و همگن کردن و همچنین روش استخراج، طبیعت شیمیایی نمونه و ترکیبات موثره بر عملکرد استخراج ترکیبات زیست فعال از گیاهان موثر می‌باشد. همچنین عملکرد استخراج بسته به نوع حلال (قطبیت و pH)، دما و زمان استخراج متفاوت است [۱۷].در این پژوهش به جزء نوع حلال جهت استخراج ترکیبات موثره، سایر شرایط استخراج ازجمله دما، زمان، مراحل آماده سازی(خشک کردن، آسیاب کردن و اندازه ذرات نمونه) ثابت در نظر گرفته شد.براساس جدول ۱ بالاترین درصد عملکرد استخراج به ترتیب مربوط به حلال آب (۱۶/۵۷±۰/۹۴ درصد)، اتانول (۳/۰۲±۰/۴۳ درصد)، هگزان (۱/۰۷±۰/۰۲ درصد) و استون (۰/۹۸±۰/۰۱ درصد) بود.براساس نتایج پژوهش‌های مختلف رابطه مستقیمی بین قطبیت حلال مورد استفاده جهت استخراج و عملکرد عصاره گیری وجود دارد بدین صورت که هرچه قطبیت حلال افزایش یابد راندمان استخراج عصاره نیز افزایش می‌یابد[۱۸]. در پژوهش حاضر میزان ترکیبات استخراج شده توسط حلال استون از ترکیبات استخراج شده با حلال هگزان کمتر است که می‌توان آن را به ترکیبات روغنی و غیر قطبی استخراج شده توسط هگزان نسبت داد. تجزیه و تحلیل داده‌ها به روش توکی نشان داد اثر حلال‌های هگزان و استون با یکدیگر تفاوت معنی دار ندارند (p>۰/۰۵) و به ترتیب بیشترین اثر مربوط به حلال‌های آب، اتانول و در انتها استون و هگزان است.

Table 1 Effect of different solvents on extraction yield

Solvent	Polarity Index	Extraction yield (%)
Water	9	16.57^{a}±0.94
Acetone	5.1	0.98^{c}±0.01
Ethanol	5.2	3.02^{b}±0.43
Hexane	0.001	1.07^{c}±0.02

Different superscriptswithin the columnrepresent significant difference at $p< 0.05$.

از طرفی افزایش حلالیت پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌ها در ترکیبات قطبی بیشتر است و بدین ترتیب می‌توان اثر افزایش راندمان در سیالات با قطبیت بالاتر را در توانایی این حلال‌ها جهت استحصال ترکیبات قطبی(مانند کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها) دانست[۱۷, ۱۸].

هگزان حلالی غیر قطبی است و در استخراج ترکیبات غیرقطبی مانند چربی‌ها و کارتنوئیدها بسیار موثر است. در پژوهشی که هایجین و همکاران در سال ۲۰۱۲ به بررسی اثر حلال‌های مختلف(هگزان، اتیل استات، استون، متانول و مخلوط آب- متانول) بر فعالیت ضداکسایشی و محتوای ترکیبات موثره فلفل‌های شیرین پرداختند مشخص شد که حلال‌های غیرقطبی(چربی دوست) برای استخراج کارتنوئیدها بسیار مناسب هستند. نتایج نشان داد که بیشترین میزان کارتنوئیدها با حلال هگزان استخراج شده است و عصاره‌های هگزانی فاقد ترکیبات فلاوونوئیدی هستند. بالاترین راندمان استخراج با حلال اتانول و کمترین راندمان استخراج با استون حاصل شد[۱۹].

۳-۲- اثر نوع حلال بر محتوای ترکیبات فنلی کل

میانگین محتوای ترکیبات فنلی کل عصاره‌های استخراج شده با حلال‌های آب، استون، اتانول و هگزان در جدول ۲ ارائه شده است. گستره‌ی داده‌ها از ۰/۷۲±۰/۰۵ تا ۱۲/۱۲±۰/۱۹ میلی گرم معادل گالیک اسید بر گرم وزن نمونه خشک متغیر است. بیشترین میزان ترکیبات فنلی کل به ترتیب مربوط به عصاره استخراج شده با اتانول (۱۲/۱۲±۰/۱۹ میلی گرم معادل گالیک اسید بر گرم وزن نمونه خشک)، استون (۱۰/۰۳±۰/۱۲ میلی گرم معادل گالیک اسید بر وزن نمونه خشک)، آب (۱/۶۱±۰/۰۵ میلی گرم معادل گالیک اسید بر وزن نمونه خشک) و هگزان (۰/۷۲±۰/۰۵ میلی گرم معادل گالیک اسید بر وزن نمونه خشک) بود. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها حاکی از معنی دار بودن اثر حلال‌های مختلف بر میزان ترکیبات فنلی کل است(p<۰/۰۵) که بیشترین اثر به ترتیب مربوط به حلال‌های اتانول، استون، آب و هگزان است.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-27]

Table 2 Effect of different solvents on total phenolic compounds (TPC).

Solvent	TPC (mg GAE/g $_{\text{dry sample}}$)
Water	1.61^{c}±0.05
Acetone	10.03^{b}±0.12
Ethanol	12.12^{a}±0.19
Hexane	0.72^{d}±0.05

Different superscripts within the column represent significant difference at $p< 0.05$.

ترکیبات فنلی عمدتاً در دیواره سلولی سلول‌های گیاهی قرار دارند در حالیکه لیگنین و سایر ترکیبات (استرهای فرولیک اسید و فلاوونوئیدها) در واکوئل‌ها تجمع یافته‌اند. علاوه بر این، ترکیباتی با ساختارهای دارای گروه‌های عملگر هیدروکسیل(*OH*-) و کربوکسیل(*COOH*-) مانند فنولیک اسیدها، لیگنان‌ها و فلاوونوئیدها به راحتی توسط حلال‌های قطبی قابل استخراج هستند[۲۰].

نتایج بدست آمده با نتایج ویجکون و همکاران مطابقت دارد. در این پژوهش میزان محتوای فنل کل عصاره متانولی (۳۶۱/۲±۱۷/۱ میلی گرم معادل گالیک اسید در ۱۰۰ گرم نمونه) بیشتر از عصاره استونی (۱۴۲/۸±۱۴/۵ میلی گرم معادل گالیک اسید در ۱۰۰ گرم نمونه) و آبی (۹۰/۷±۱/۷ میلی گرم معادل گالیک اسید در ۱۰۰ گرم نمونه) بود. طبق گزارش ارائه شده میزان محتوای فنلی کل احتمالا تحت تاثیر قطبیت و ویسکوزیته حلال است[۲۱].

همچنین در پژوهشی دیگر، بای و همکاران در سال ۲۰۱۲ به بررسی اثر حلال‌های مختلف (هگزان، اتیل استات، استون، متانول و مخلوط آب- متانول) بر فعالیت ضداکسایشی و محتوای ترکیبات موثره فلفل‌های شیرین پرداختند. نتایج نشان داد حلال‌های غیرقطبی (چربی دوست) برای استخراج کارتنوئیدها بسیار مناسب هستند به صورتی که بیشترین میزان کارتنوئید مربوط به حلال هگزان بود و عصاره‌های هگزانی فاقد ترکیبات فلاوونوئیدی بودند[۱۹].

۳-۳- اثر نوع حلال بر فعالیت بازدارندگی رادیکال آزاد *DPPH*

این روش به علت سادگی و حساسیت بالا در شناسایی ترکیبات فعال در غلظت‌های پایین به صورت گسترده برای اندازه‌گیری فعالیت ضداکسایشی مورد استفاده قرار می‌گیرد [۲۱].

همانطور که در جدول۳ نشان داده شده است میانگین گستره‌ی داده‌ها از ۴۱/۵۴±۰/۱۹ درصد تا ۸۱/۹۶±۰/۱۵ درصد متغیر است. بالاترین فعالیت ضداکسایشی به ترتیب مربوط به اتانول(۸۱/۹۶±۰/۱۵ درصد)، استون(۶۵/۹۴±۱/۳۳ درصد)، آب(۴۸/۰۴±۰/۱۷ درصد) و هگزان(۴۱/۵۴±۰/۱۹) بود.

Table 3 Effect of different solvents on scavenging activity of DPPH radicals.

Solvent	Scavenging activity (%)
Water	48.04^{c} ±0.17
Acetone	65.94^{b} ±1.33
Ethanol	81.96^{a} ±0.15
Hexane	41.54^{d} ±0.19

Different superscripts within the column represent significant difference at $p< 0.05$.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها نشان داد اثر حلال‌های مختلف بر میزان فعالیت عصاره‌ها بر باز دارندگی فعالیت رادیکال DPPH معنی دار است($p<۰/۰۵$) به صورتی که بیشترین فعالیت بازدارندگی به ترتیب مربوط به عصاره‌های اتانولی، استونی، آبی و هگزانی است. نتایج حاکی از آنست که نوع حلال‌مورد استفاده در این پژوهش در انتخاب و استخراج ترکیبات موثره دارای فعالیت ضداکسایشی بسیار موثر بوده و اثرات متفاوتی دارند. دو و همکاران در سال ۲۰۱۳ اثر حلال های مختلف بر فعالیت ضداکسایشی عصاره بدست آمده از گیاه لیمنوفیلا آروماتیکا را بررسی کردند. در این پژوهش عصاره اتانولی، سپس استونی و در نهایت عصاره آبی بیشترین فعالیت بازدارندگی رادیکال *DPPH* را از خود نشان دادند[۱۷].

ضریب همبستگی بالایی بین داده‌های مربوط به محتوای

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-27]

ترکیبات فنلی کل و فعالیت بازدارندگی رادیکال‌های DPPHوجود داشت(R^2=۰/۹۷). همانطور که مطالعات صورت گرفته نشان داده‌اند همبستگی بالایی میان میزان ترکیبات فنلی و فعالیت ضداکسایشی آن‌ها وجود دارد و در این بین اتانول به دلیل توانایی بیشتر در استخراج ترکیبات فنلی به عنوان موثرترین حلال جهت استخراج این ترکیبات معرفی می‌شود؛ البته نوع حلالی که بالاترین درصد ترکیبات فنلی را استخراج می‌کند همیشه معلولی از نوع و ماهیت نمونه است و به نوع ترکیبات موثره موجود در نمونه و قطبیت آن نیز بستگی دارد [۳, ۲۲].

۳-٤- تاثیر نوع حلال بر فعالیت ضداکسایشی به روش هیدروژن پراکسید

فعالیت ضداکسایشی عصاره‌های غلاف نخودفرنگی در مهار رادیکال‌های حاصل از هیدروژن پراکسید مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که در جدول ٤ نشان داده شده است میانگین گستره‌ی داده‌ها از ۱/٤۱±۰/۰۷ درصد تا ۷/٦٥±۰/۱۲ درصد متغیر است. نتایج نشان می‌دهند که بیشترین فعالیت ضداکسایشی در این روش به ترتیب مربوط به عصاره‌های اتانولی (۷/٦٥±۰/۱۲ درصد)، استونی (۳/۳۳±۰/۱۳ درصد)، آبی (۱/٤۱±۰/۰۷ درصد) و هگزانی(۱/۹٤±۰/۳٥ درصد) است.

Table 3 Effect of different solvents on scavenging activity of hydrogen peroxide (H_2O_2).

Solvent	Scavenging activity (%)
Water	1.41^{c}±0.07
Acetone	3.33^{b}±0.13
Ethanol	7.56^{a}±0.12
Hexane	1.41^{c}±0.07

Different superscripts within the column represent significant difference at $p< 0.05$.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها نشان داد اثر حلال‌های مختلف بر فعالیت ضداکسایشی به روش هیدروژن پراکسید معنی دار است (p<۰/۰٥) و بیشترین فعالیت ضداکسایشی به ترتیب مربوط به عصاره‌های اتانولی، استونی، هگزانی و آبی است. ضریبهمبستگی بین داده‌های مربوط به محتوای ترکیبات فنلی کل و فعالیت ب ضداکسایشیبهروشهیدروژنپراکسید ۸٥/۲ درصدبود. دلیل کاهش ضریب همبستگی در روش هیدروژن پراکسید با محتوای فنلی کل را در مقایسه با روش DPPH می‌توان به تفاوت مکانیسم این دو روش در اندازه‌گیری فعالیت ضداکسایشی نسبت داد.

سوارز و همکاران در سال ۲۰۱۳ در بررسی اثر حلال‌های مختلف بر محتوای ترکیبات شیمیائی گیاهی و فعالیت ضداکسایشی عصاره‌های برگی پرداختند. در این پژوهش در بررسی فعالیت ضداکسایشی به روش هیدروژن پراکسید بیشترین فعالیت ضداکسایشی به ترتیب مربوط به عصاره اتانولی، متانولی و سپس آبی بود که عصاره‌های آبی و متانولی اختلاف معنی دار نداشتند ولی فعالیت ضداکسایشی عصاره اتانولی اختلاف بسیار زیادی با بقیه عصاره‌ها داشت[۲۲].

در پژوهش اسماعیلی و همکاران در سال ۲۰۱٥ به بررسی محتوای فنلی و فلاوونوئیدی عصاره‌های مختلف شبدر قرمز پرداختند. در بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی با روش هیدروژن پراکسید عصاره اتانولی اثر آنتی اکسیدانی بسیار بیشتری از عصاره هگزانی بود [۲۳].

جان و همکاران در سال ۲۰۱۳ به بررسی اثر حلال‌های مختلف بر فعالیت ضداکسایشی، محتوای فنلی کل و فلاوونوئیدی عصاره میوه نوعی گیاه[1] پرداختند. بیشترین فعالیت مهارکنندگی فعالیت رادیکال‌های هیدروژن پراکسید به ترتیب مربوط به عصاره آبی، بوتانولی و متانولی بود و کمترین فعالیت مربوط به عصاره هگزانی بود[٢٤]. خان و همکاران در سال ۲۰۱۲ به بررسی محتوای فنلی کل و فعالیت ضداکسایشی عصاره استخراج شده با حلال‌های مختلف از شیر تیغک(شیر کنگر) پرداختند. نتایج نشان داد که اثر ضداکسایشی عصاره استحصال شده با هگزان نسبت به حلال‌قطبی متانول بسیار کمتر است[۲٥].

٤- نتیجه گیری

در این پژوهش با توجه به اهمیت نوع حلال بر عملکرد

1. *Monotheca Buxifolia*

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-27]

استخراج و ترکیبات زیست فعال استخراج شده از نمونه از چهار حلال آب، استون، اتانول و هگزان جهت استخراج ترکیبات موثره استفاده شد درحالیکه سایر شرایط استخراج از جمله مراحل آماده سازی نمونه، دما، زمان و نسبت نمونه جامد به حلال ثابت در نظر گرفته شد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که عملکرد استخراج، میزان ترکیبات فنلی کل و فعالیت ضداکسایشی تحت تاثیر نوع حلال بوده است. براساس نتایج بدست آمده اثر حلال‌های اتانول و استون در استخراج ترکیبات فنلی از آب و هگزان بیشتر بود. با توجه به شاخص قطبیت اتانول و استون (به ترتیب ۵/۲ و ۵/۱) می‌توان اینگونه نتیجه گیری کرد که ترکیبات ضداکسایش موجود در غلاف نخود قرنگی توسط حلال‌هایی با قطبیت متوسط نظیر اتانول و استون بهتر از حلال‌های با قطبیت بالا نظیر آب (شاخص قطبیت معدل ۹) و یا حلالی نظیر هگزان با شاخص قطبیت نزدیک صفر استخراج می‌شوند. توانایی ترکیبات ضداکسایشی استخراج شده در مهار رادیکال‌های حاصل از هیدروژن پراکسید در مقایسه با روش *DPPH* ضعیف بود که علت این امر را می‌توان به ماهیت ترکیبات استحصال شده و توانایی این ترکیبات در مهار رادیکال‌های هیدروکسیل ایجاد شده توسط هیدروژن پراکسید نسبت داد. بطور کلی بهترین عصاره از لحاظ فعالیت ضداکسایشی، عصاره اتانولی معرفی می‌شود که با توجه به فعالیت ضداکسایشی بالای این عصاره می‌توان از آن به عنوان یک نگهدارنده طبیعی در صنایع روغن و سایر مواد غذایی استفاده کرد.

۵- منابع

[1] Elzebroek, T. and Wind, K. 2008.Guide to cultivated plants. CAB International, Oxfordshire, UK.

[2] Pouillot, A., Polla, L. L., Tacchini, P., Neequaye, A., Polla, A. and Polla. B. 2011.Natural antioxidants and their effects on the skin, in formulating, packaging, and marketing of natural cosmetic products.Eds:N. dayan and L. Kromidas, John wiley &Sons, Inc.Canada.

[3] Alothman, M., Bhat, R. and Karim, A.A. 2009.Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents.*Food Chemistry*, 115, 785–788.

[4] Ito, N., Hirose, M., Fukishima, S., Isuada, H., Shirai, T. and Tatematsu, M.1986.Studies on antioxidants: their anticarcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenesis.*Food and Chemical Toxicology*, 24, 1099–1102.

[5] Khoddami, A., Wilkes, M.A. and Roberts, T.H. 2013.Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds.*Molecules*, 18, 2328–2375.

[6] Naczk, M.A., Zadernowski, R. and Shahidi, F. 2005.Antioxidant Capacity of Phenolics from Canola Hulls as Affected by Different Solvents. In Phenolic Compounds in Foods and Natural Health Products;Shahidi, F., Ho, C.T., Eds; Oxford University Press: New York, NY, USA. 57–66.

[7] Lapornik, B., Prosek, M. and Golc, W.A. 2005.Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time.*Journal of Food Engineering*, 71, 214–222.

[8] Wijekoon, M.M.J.O., Bhat, R. and Karim, A.A. 2011.Effect of extraction solvents on the phenolic compounds and antioxidant activities of bunga kantan (Etlingera elatior Jack.) inflorescence.*Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 615–619.

[9] Goli, A.H., Barzegar, M. and Sahari, M.A. 2005.Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts.*Food Chemistry*, 92, 521–525.

[10] Fu, R., Zhang, Y., Guo, Y., Liu, F. and Chen, F. 2014.Determination of phenolic contents and antioxidant activities of extracts of Jatropha curcas L. seed shell, a by-product, a new source of natural antioxidant.*Industrial Crops and Products*, 58, 265–270.

[11] Sogi, D.S., Siddiq, M. and Dolan, K.D. 2014.Total phenolics, carotenoids and antioxidant properties of Tommy Atkin mango cubes as affected by drying techniques.*LWT - Food Science and Technology*,1-5.

[12] Razali, N., Mat-Junit, S., Abdul-Muthalib, A.F., Subramaniam, S. and Abdul-Aziz, A. 2012.Effects of various solvents on the extraction of antioxidant phenolics from the leaves, seeds, veins and skins of *Tamarindus indica* L.*Food Chemistry*, 131, 441-448.

[13] Zhu, K.X., Lian, C.X., Guo, X.N., Peng, W. and Zhou, H.M. 2011.Antioxidant

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-27]

activities and total phenolic contents of various extracts from defatted wheat germ.*Food Chemistry*, 126, 1122–1126.

[14] Amin, I., Zamaliah, M.M. and Chin, W.F. 2004.Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables.*Food Chemistry*, 87, 581–586.

[15] Manzocco, L., Anese, M. and Nicoli, M.C. 1998.Antioxidant properties of tea extracts as affected by processing.*Lebens-mittel-Wissenschaft Und-Technologie*, 31**,** 694–698.

16. Ruch, R.J., Cheng, S.J. and Klaunig, J.E. 1989.Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea.*Carcinogensis*10, 1003–1008.

[17] Do, Q.D., Angkawijaya, A.E., Tran-Nguyen, P.L., Huynh, L.H., Soetaredjo, F.E., Ismadji, S. and Yi-Hsu, J. 2013.Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoids content, and antioxidant activity of Limnophila aromatica.*Journal of Food and Drug Analysis*, 22(3), 1-7.

[18] Pham, H.N.T., Nguyen, V.T., Vuong, Q.V., Bowyer, M.C. and Scarlett, C.J. 2015.Effect of extraction solvents and drying methods on the physicochemical and antioxidant properties of *Helicteres hirsuta* Lour. Leaves.*Technologies*, 3, 285-301.

[19] Bae, H., Jayaprakasha, G.K., Crosby, K., Jifon, J.L. and Patil, B.S. 2012.Influence of Extraction Solvents on Antioxidant Activity and the Content of Bioactive Compounds in Non-pungent Peppers.*Plant Foods for Human Nutrition*, 67, 120–128.

[20] Wong, J.Y., Matanjun, P., Ooi, Y.B.H. and Chia, K.F. 2014.Evaluation of antioxidant activities in relation to total phenolics and flavonoids content of selected malaysian wild edible plants by multivariate analysis.*International Journal of Food Properties*, 17, 1763–1778.

[21] Jeevani Osadee Wijekoon, M.M., Bhat, R. and Karim, A.A. 2011.Effect of extraction solvents on the phenolic compounds and antioxidant activities of bunga kantan (Etlingera elatior Jack.) inflorescence.*Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 615–619.

[22] Soares, M.O., Alves, R.C., Pires, P.C., Oliveira, M.B.P.P. and Vinha, A.F. 2013.Angolan Cymbopogon citratus used for therapeutic benefits: Nutritional composition and influence of solvents in phytochemicals content and antioxidant activity of leaf extracts.*Food and Chemical Toxicology*, 60, 413–418.

[23] Esmaeili, A.K., Taha, R.M., Mohajer, S. and Banisalam, B. 2015.Antioxidant activity and total phenolic and flavonoid content of various solvent extracts from *in vivo* and *in vitro*grown *Trifolium pratense* L. (Red Clover).*BioMed Research International*, 2015, 1-11.

[24] Jan, S., Khan, M.R., Rashid, U. and Bokhari, J. 2013.Assessment of Antioxidant Potential, Total Phenolics and Flavonoids of Different Solvent Fractions of Monotheca Buxifolia Fruit.*Osong Public Health and Research Perspectives*, 4(5), 246-254.

[25] Khan, R.A., Khan, M.R., Sahreen, S. and Ahmed, M. 2012.Evaluation of phenolic contents and antioxidant activity of various solvent extracts of *Sonchus asper* L. Hill.*Chemistry Central Journal*, 6(12), 1-7.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-27]

Evaluation the effect of different solvents on total phenolic content and antioxidant activity of pea (*Pisum sativum* L.) pod extract

Ghorbani, M. [1], Ganjloo, A. [2*], Bimakr, M. [2]

1. M.Sc in Food Science and Technology, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Zanjan
2. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Zanjan
3. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Zanjan

(**Received: 2016/04/10 Accepted: 2016/06/14**)

In this study, the effect of different solvents (water, acetone, ethanol and hexane) on extraction yield, total phenolic content and antioxidant activity of peapod extract were investigated. The maximum extraction yield was obtained by using water (16.57±0.94%), ethanol (3.02±0.43%), hexane (1.07±0.02%) and acetone (0.98±0.01%), respectively. Total phenolic content was determined using Folin–Ciocalteu method. The maximum total phenolic content was obtained using ethanol (12.12±0.19 mgGAE/g) followed by acetone (10.03±0.12 mgGAE/g), water (1.61±0.05 mgGAE/g) and hexane (0.72±0.05 mgGAE/g). Antioxidant activity of extract was determined using *Diphenyl Picrylhydrazyl* (DPPH) and Hydrogen peroxide (H_2O_2) assays.The maximum antioxidant activity determined using DPPH method was obtained by using ethanol (81.96±0.15%), acetone (65.94±1.33%), water (48.04±0.17%) and hexane (41.54±0.19%), respectively.The maximum antioxidant activity determined using H_2O_2 method was obtained by using ethanol (7.65±0.12%) followed by acetone (3.33±0.13%), water (1.41±0.07%) and hexane (1.94±0.35%). Finally, it could be concluded that ethanolic extract compared to other solventshad the highest total phenolic content and antioxidant activity.

Keywords: Phenolic content, Natural antioxidant, Peapod, Hydrogen peroxide, *Diphenyl Picrylhydrazyl*

* Corresponding Author E-Mail Address: aganjloo@yahoo.com

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-27]