بررسی راه های جداسازی گاما اوریزانول از روغن ارقام سبوس برنج ایرانی

سهیلا کامیاب[1*]، مهرداد قوامی[2]، مریم قراچورلو[3]، کامبیز لاریجانی[4]

۱-کارشناس ارشد مهندسی کشاورزی-علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران
۲-دانشیار دانشکده علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم وتحقیقات تهران
۳-استادیار دانشکده علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم وتحقیقات تهران
٤-عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم وتحقیقات تهران

(تاریخ دریافت: ۸۸/۸/۳ تاریخ پذیرش: ۸۹/۲/۵)

چکیده

γ-اوریزانول یک ترکیب آنتی اکسیدانی و غیر قابل صابونی شونده موجود در روغن سبوس برنج است. این ماده ترکیبی از استرهای اسید فرولیک الکل‌های تری ترپنی و استرول های گیاهی است و از نظر خصوصیات آنتی اکسیدانی مشابه توکوفرول ها می باشد. در این پژوهش به منظور جداسازی γ-اوریزانول، چهار رقم از ارقام برنج شمال کشور شامل برنج طارم محلی، فجر، شیرودی و ندا انتخاب شدند. بعد از پایدار سازی حرارتی و شلتوک گیری، بر روی سبوس برنج حاصله از نمونه ها عملیات روغن گیری صورت گرفت. سپس به منظور جداسازی و خالص سازی γ-اوریزانول از کروماتوگرافی های ستونی و HPTLC استفاده شد و نهایتاً برای شناسایی ترکیبات اوریزانول روش GC/MS به کار برده شد. در روش دیگر از صابونی کردن روغن خام سبوس برنج برای استخراج γ- اوریزانول استفاده گردید. در ادامه فعالیت آنتی اکسیدانی γ- اوریزانول حاصله از این ارقام ، در سه غلظت ۰/۰۱ ، ۰/۰۵ و ۰/۱ ٪ روی چربی استخراجی از دمبه گوسفندی و توسط دستگاه رنیسمت مورد بررسی قرار گرفته است. در بین ارقام برنج مورد بررسی، رقم ندا از محتوای روغنی و γ- اوریزانول بالاتری نسبت به سایر ارقام برخوردار است. ضمن آنکه حداکثر قدرت آنتی اکسیدانی این ترکیب مربوط به رقم طارم محلی می باشد.

کلید واژگان: γ - اوریزانول، روغن سبوس برنج، کروماتوگرافی، صابونی کردن، فعالیت آنتی اکسیدانی

۱- مقدمه

γ- اوریزانول از جمله ترکیبات غیر صابونی موجود در روغن سبوس برنج است. از نظر ویژگی های فیزیکی این ترکیب به صورت پودری شفاف و کریستالی، سفید رنگ و یا کمی متمایل به زرد، بدون عطر و طعم خاصی است که در دمای اتاق پایدار است [۱]. γ - اوریزانول دارای نقطهٔ ذوبی از ۱۳۷/۵°C تا ۱۳۸/۵°C است و حداکثر جذب UV آن در هپتان در طول موج‌های ۲۳۱، ۲۹۰ ، ۳۱۵ نانومتر است. اوریزانول در حلال هایی از قبیل دی‌اتیل‌اتر، کلرید متیلن، استن و الکل محلول است و در حلال های غیر قطبی نظیر پترولیوم اتر و هگزان به مقدار کمی محلول و در آب نامحلول است [۲]. γ- اوریزانول برای اولین بار در سال ۱۹۵٤ توسط Kaneko و Tsuchiya از روغن سبوس برنج جدا سازی شد. در ابتدا این ماده ترکیبی منفرد به نظر می رسید اما متعاقبا روشن شد که γ- اوریزانول ترکیبی از استرهای اسید فرولیک، الکل های تری ترپنی و استرول های گیاهی می باشد و برخلاف تصور این محققین ترکیبی منفرد نمی باشد و ۳ ماده مستقل به

* مسئول مکاتبات: kamyab_2203@yahoo.com

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-11-28]

نام‌های اوریزانول A ، B و C مطرح گردید. در سال ۱۹۵۷ توسط Ohta و Shimizu اوریزانول A با عنوان سیکلوآرتنیل فرولات و اوریزانول C با عنوان ۲٤- متیلن سیکلو آرتانیل فرولات شناسایی شدند [۳]. اوریزانول B بعدها شناسایی شد که شامل مخلوطی از ۳ ترکیب اوریزانول شامل کامپستریل فرولات، سیکلوآرتانیل فرولات و β- سیتوستریل فرولات می باشد [٤].

در جدول ۱ نام، وزن مولکولی و فرمول تجربی ترکیبات γ- اوریزانول و در شکل ۱ ساختار ترکیبات اوریزانول شامل سیکلوآرتنیل فرولات، ۲٤-متیلن سیکلوآرتانیل فرولات، کامپستریل فرولات، کامپستانیل فرولات، سیکلوآرتانیل فرولات، β-سیتوستریل فرولات نشان داده شده است [٥].

جدول ۱ ترکیبات γ - اوریزانول : نام، وزن مولکولی و فرمول تجربی [٦].

نام ترکیب	MW	فرمول
کامپستریل فرولات	٥٧٦/٩	$C_{38}H_{56}O_4$
کامپستانیل فرولات	٥٧٨/٩	$C_{38}H_{58}O_4$
b- سیتوستریل فرولات	٥٩٠/٩	$C_{39}H_{58}O_4$
سیکلوآرتنیل فرولات	٦٠٢/٩	$C_{40}H_{58}O_4$
سیکلوآرتانیل فرولات	٦٠٤/٩	$C_{40}H_{60}O_4$
۲٤-متیلن سیکلوآرتانیل فرولات	٦١٦/٩	$C_{41}H_{60}O_4$

γ-اوریزانول دارای اثرات دارویی و درمانی از جمله هیپوکلسترولمی، تقویت رشد انسان، تحریک ترشحات هورمونی، تسهیل گردش خون و جلوگیری از تجمع پلاکتها می‌باشد. همچنین در بهبود اختلالات عصبی، ناراحتی های روده‌ای ـ معده‌ای و درمان علائم ناشی از یائسگی موثر است [۷]. این ماده نخستین بار در سال ۱۹٦۲ در ژاپن برای درمان گیاهی اختلالات عصبی مورد استفاده قرار گرفت [۸]. γ- اوریزانول از طریق بهبود میکروسیرکولاسیون پوست و محافظت در برابر پروکسیداسیون و در نهایت هدایت ترشحات غدد چربی قادر است از پیر شدن پوست در اثر استفاده طولانی و مستمر جلوگیری نماید [۹]. γ-اوریزانول در اثر متابولیزه شدن منجر به تولید اسید فرولیک در روده می‌شود. ضمن آنکه در ارتباط با سلولهای بدن فاقد هر گونه اثرات آلرژی زایی می‌باشد [۱۰].

در سال ۲۰۰۳، Godber و XU اقدام به خالص سازی، شناسایی و ارزیابی آنتی اکسیدان های موجود در سبوس برنج نمودند. آنتی اکسیدان های موجود در سبوس برنج شامل توکوفرول ها، توکوتری انول ها و γ - اوریزانول می باشند که اثرات آنتی اکسیدانی قابل توجهی را در مدل های اکسیداسیونی کلسترول و اسید لینولئیک نشان داده اند. در این تحقیق مشخص شده است γ- اوریزانول از فعالیت آنتی اکسیدانی بیشتری در جلوگیری از اکسیداسیون کلسترول نسبت به توکوفرول ها و توکوتری انول ها برخوردار می باشد [۱۱].

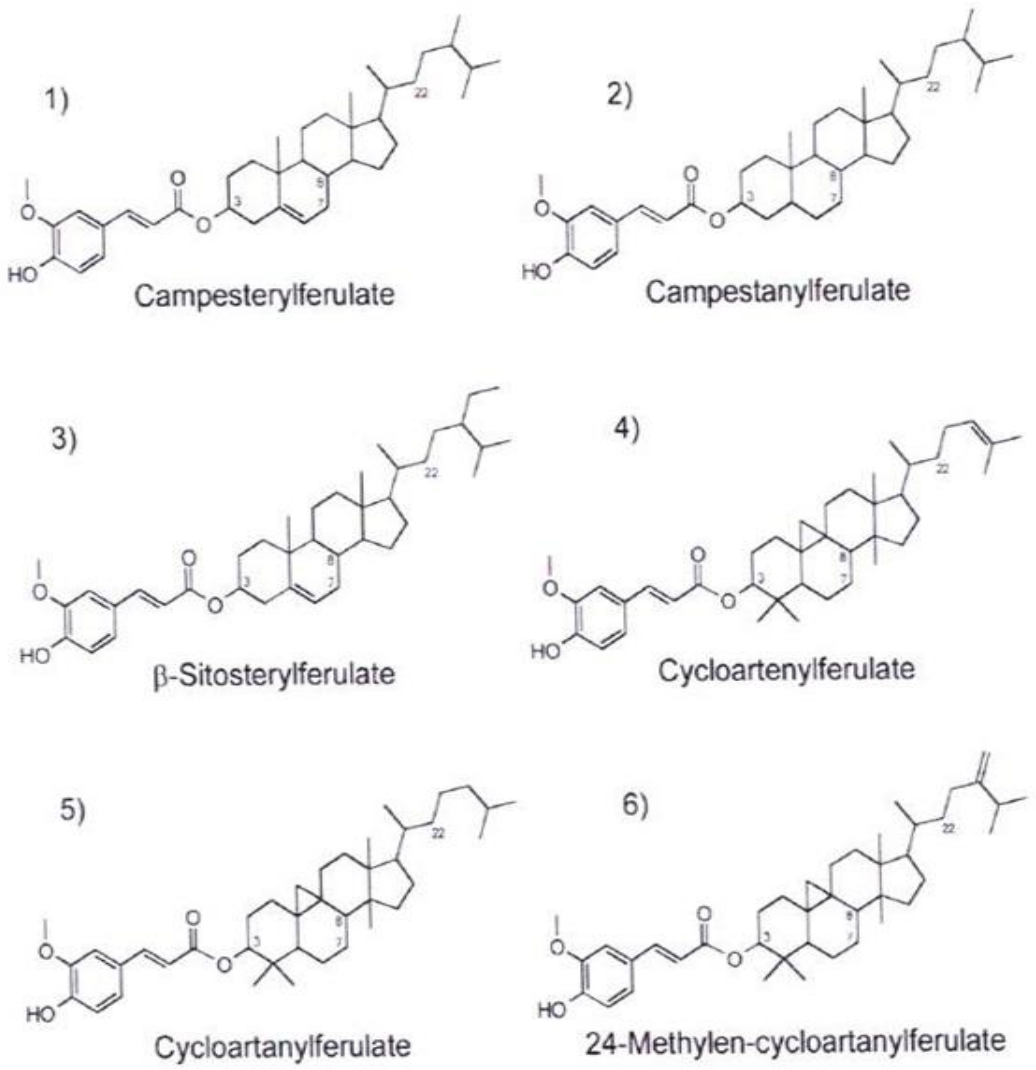
در سال ۲۰۰۵، Caudia و همکاران مقایسه ای بین فعالیت آنتی اکسیدانی γ- اوریزانول و آنتی اکسیدان های مصنوعی BHA[1] و BHT[2] انجام دادند. نتایج بدست آمده نشان داد بیشترین قدرت آنتی اکسیدانی مربوط به BHA می باشد. بعد از آن γ ـ اوریزانول و BHT قرار می گیرند که دارای اثرات آنتی اکسیدانی کم و بیش مشابهی هستند. بنابراین می توان گفت که γ- اوریزانول از پتانسیل کاربردی مطلوبی جهت پایدار سازی مواد لیپیدی برخوردار می باشد [۱۲].

مهمترین منبع استخراج γ- اوریزانول، روغن سبوس برنج می باشد. سبوس برنج از فرآورده‌های جنبی کارخانجات برنجکوبی است که حدود ٪۱۰ وزنی هر دانه شلتوک را شامل می‌شود [۱۳]. در مناطق شمال کشور مهمترین استفاده‌ای که از سبوس برنج می‌شود بهره گیری از آن به عنوان خوراک دام و طیور و تقویت باغات و مزارع است. این در حالی است که این فرآوردهٔ جنبی منبعی غنی از روغن و سایر ترکیبات دارویی و آنتی‌اکسیدانی از جمله γ- اوریزانول است. با توجه به خصوصیات جالب توجه γ- اوریزانول، استخراج، جداسازی و کاربرد آن در دنیا دارای پیشینه‌ای طولانی می‌باشد. اما متاسفانه در کشور ما تحقیقات چندانی در زمینه استخراج این ترکیب ارزشمند در مقیاس آزمایشگاهی و صنعتی صورت نپذیرفته و هنوز کشور در ابتدای راه تحقیق و توسعه از بابت استخراج چنین ریزمغذی‌هایی قرار دارد.

لذا در این تحقیق در نظر است ضمن جداسازی و استخراج γ- اوریزانول از روغن خام سبوس برنج، قدرت آنتی اکسیدانی این ترکیب نیز مورد بررسی قرار گیرد.

1. Butylated Hydroxy Anisole
2. Butylated Hydroxy Toluene

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-11-28]



شکل ۱ ساختار انواع ترکیبات اوریزانول [۱٤].

۲-مواد و روش ها

کلیه مواد شیمیایی مورد استفاده برای این آزمایشات ساخت شرکت آلمانی مرک [3] بوده است.

۲-۱- تهیه و آماده سازی نمونه های سبوس برنج

٤ نمونه از ژنوتیپ های برنج سفید که در مزرعه مرکز تحقیقات برنج کشور واقع در شهرستان آمل کشت داده شده‌اند تهیه شد. این ٤ رقم به طور وسیعی در مناطق شمال ایران کشت می‌شوند که شامل ارقام طارم محلی، فجر، شیرودی و ندا می‌باشند. این ارقام برنج، زود رس تا میان رس بوده و از عملکرد، کیفیت و خواص فیزیکوشیمیایی مطلوبی برخوردارند و نسبت به ورس، آفت کرم ساقه خوار، بیماریها و تنش های زنده و غیرزنده مقاوم هستند. کدگذاری نمونه های مورد آزمون به شرح جدول ۲ انجام گرفت.

ارقام شلتوک بعد از برداشت از مزرعه در دمای $-20\ ^{o}C$ نگهداری شدند. یک روز قبل از فرایند از سردخانه خارج شدند و به آنها فرصت داده شد تا با محیط هم دما شوند.

3. Merck

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-11-28]

جدول۲ کد گذاری ارقام برنج مورد آزمون

ژنوتیپ برنج سفید	کد گذاری
طارم محلی	A
فجر	B
شیرودی	C
ندا	D

نمونه برداری از هر رقم با ۳ تکرار صورت پذیرفت. به منظور پایدار سازی نمونه ها، در هر تکرار دانه‌ها در هوای گـرم آون در دمای ^{o}C ۶۰ به مدت ۴۸ ساعت خـشک شـدند. در ادامـه جهت جداسازی سبوس برنج از دو مرحله عملیـات آسـیابانی استفاده شد. در مرحله اول، توسط آسیاب Satake ، پوسـته خارجی [4] از دانه های زبر شلتوک جداسازی شد و در مرحلـه دوم با استفاده از آسـیاب McGill No.2 عملیـات سـبوس گیری از برنج قهوه ای انجام شد. سبوس برنج به دست آمـده از مرحله دوم آسیابانی، به منظور آنالیز آزمایشگاهی بسته بندی شده و در یخچال با دمای کمتـر از 15° C نگـه‌داری شـد تـا تغییرات کیفی که در نتیجه گذر زمـان و اتواکـسیداسیون روی می‌دهند به تأخیر افتد.

۲-۲-استخراج روغن خام سبوس برنج

استخراج روغن خام سبوس برنج توسط دستگاه سوکسله [5] و بر اساس استاندارد AOCS[3] با شماره 920.39 انجام گرفت. در این آزمون به ازای g ۲۵ سبوس برنج، از ml ۳۵ هگزان و ml ۱۵ اتیل استات به همراه g ۱ اسید آسکوربیک (دلیل استفاده از این ترکیب به جهت اثر احیا کنندگی اسید آسکوربیک و تاثیر آن در محافظت از ترکیب آنتی اکسیدانی γ-اوریزانول می باشد و همچنین با توجه به ماهیت اسیدی این ترکیب با هدف بالا بردن راندمان استخراج روغن از آن استفاده شده است.) به عنوان حلال استفاده شد.

۲-۳-جداسازیg-اوریزانول نیمه خالص به روش کروماتوگرافی ستونی

جداسازی γ-اوریزانول نیمه خالص بر اساس استاندارد AOCSبا شماره 985.35 یا 984.27 انجام گرفت. جهت استخراج γ-اوریزانول نیمه خالص، از یک ستون سیلیکاژلی با فشار پایین استفاده شد. قطر ستون کروماتوگرافی ۲/۵cm و ارتفاع ستون cm ۵۰ بوده و سیلیکاژل مورد استفاده از نوع سیلیکاژلG با مش۲۳۰-۷۰، ۲۵۰μm و سطح تماس m^2 ۵۰۰ بوده است. فاز متحرک مورد استفاده، ۵۰ml هگزان / اتیل استات (۷ :۳ V/V) می باشد [۱۵].

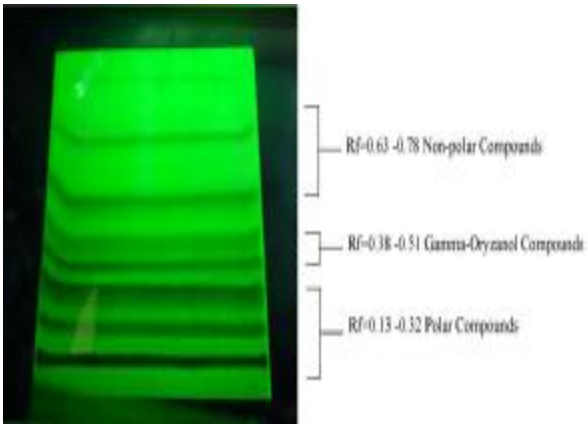
۲-٤- جداسازی γ-اوریزانول خالص به روش کروماتوگرافی HPTLC فلورسنت[6]

جداسازی γ-اوریزانول خالص بر اساس استاندارد COI/T.20/Doc.19-2001;AOCS Ch5-91انجام گرفت.HPTLC در واقع همان TLC می باشد که ذرات متشکله آن تا حد اعلا میکرونیزه شده است. استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک با کارآیی بالا امکان آنالیز اوریزانول را فراهم می کند. صفحه HPTLC مورد استفاده، فلورسنت بوده و دارای ابعاد cm۲۰×۲۰ بوده است. حلال مورد استفاده در تانک TLC، مخلوطی از ۳۵cc هگزان و cc ۱۵ اتیل استات می باشد. پس از جداسازی اجزا، صفحه HPTLC به شناساگر UV [7] انتقال داده شد. با توجه به آنکه حداکثر جذب UV توسط γ- اوریزانول در طول موج nm۳۳۰ صورت می گیرد، شناساگر UV در این طول موج تنظیم شد. در TLC میزان مسافت طی شده توسط نمونه، نسبت به مسافت طی شده توسط فاز متحرک تحت عنوان اندیس R_f [8]تعریف می شود. اندیس R_f برای تمام ترکیب موجود در طبیعت بین۱ > R_f > ۰ متغیر می باشد. این اندیس برای هر ترکیب در سیستم کروماتوگرافیک ثابت است. هرچند با تغییر عوامل محیطی نظیر نوع حلال، نوع صفحه و ... در مقدار این اندیس نیز تغییراتی ایجاد می شود. اندیس R_f برای اوریزانول در این سیستم ۰/۵۱ - ۰/۳۸ است. در عملیات جداسازی اوریزانول توسط کروماتوگرافی لایه نازک با کارآیی بالا دو ترکیب کلیدی که با اوریزانول همراه هستند جداسازی می شوند. این ترکیبات کلیدی شامل ترکیبات غیر قطبی (۰/۷۸ - ۰/۶۳= R_f) و ترکیبات قطبی (۰/۳۲ - ۰/۱۳ = R_f) می باشند. شکل۲ تصویر شماتیک صفحه HPTLC را همراه با نمونه های مذکور نشان می دهد.

4. Husk
5. American Oil Chemists' Society

6. Fluorescent High Performance Thin Layer Chromatography
7. UltraViolet Indicator
8. Retention Factor

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-11-28]



شکل۲ تصویر صفحهHPTLC فلورسنت زیر لامپ UV

۲-۵- شناسایی γ-اوریزانول به روش GC/MS

شناسایی ترکیبات مختلف γ-اوریزانول به روش کروماتوگرافی GC/MS بر اساس استاندارد شماره 2001;ISO12228:1999;AOCS Ch 6-91 COI/T.20/Doc.10- انجام گرفت. حلال مورد استفاده ۱۰cc هگزان و اتیل استات (۱:٤ V/V) می باشد. لازم است قبل از تزریق γ-اوریزانول به دستگاه GC/MS عملیات مشتق سازی روی نمونه انجام شود. دلیل انجام عملیات مشتق سازی این است که ممکن است بخشی از ترکیبات اوریزانول در دمای آزمون (۲۱۰ درجه سانتی گراد) به حالت فرار در نیایند. بنابراین بایستی این ترکیبات را به مشتقات فرار تبدیل نمود. برای مشتق سازی γ-اوریزانول، میزان ۰/۱cc BSTFA[9] با فرمول شیمیایی $C_8H_{18}F_3NOSi_2$ و میزان ۰/۱cc پیریدین با فرمول شیمیاییC_5H_5N به آن اضافه شد. سپس لوله آزمون در حمام آب گرم با دمای ۳۰درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت. ترکیبات γ-اوریزانول از این طریق به مشتقات فرار TMS[10] تبدیل شده و برای آنالیز آزمایشگاهی توسط دستگاه GC/MS آماده شدند.در ادامه نمونه مشتق سازی شده به دستگاه GC/MS تزریق شد.

9. N,O-Bis(Trimethylsily)Trifluoro Acetamide
10. Trimethylsily

۲-٦- جدا سازی γ-اوریزانول به روش صابونی کردن

جداسازی γ-اوریزانول به روش صابونی کردن بر اساس استاندارد AOCS (1980) با شماره Ca 6a-40 انجام گرفت.

۲-۷-استخراج چربی از دمبه گوسفندی[11]

از آنجایی که تمام روغن های نباتی حاوی مقادیر مختلفی آنتی اکسیدان طبیعی نظیر توکوفرول ها، توکوتری انول ها و... هستند و احتمال تداخل اثرات آنتی اکسیدانی این ترکیبات با γ-اوریزانول افزوده شده به نمونه روغنی مورد آزمون وجود دارد، از این رو جهت بررسی قدرت آنتی اکسیدانی γ-اوریزانول حاصله از ارقام مختلف برنج، ترجیحاً از دمبه گوسفندی به دلیل عدم وجود و یا حضور مقادیر ناچیز آنتی اکسیدان طبیعی استفاده شد و نهایتا زمان پایداری چربی گوسفندی در برابر اکسیداسیون در حضور مقادیر مختلفγ-اوریزانول توسط دستگاه رنسیمت مورد بررسی قرار گرفته است. در این راستا به منظور استخراج چربی از دمبه گوسفندی از کشتارگاه آمل ٥ kg دمبه کشتار روز به صورت کاملاً تصادفی خریداری شد. دمبه گوسفندی بلافاصله با آب، شستشو داده شد. ضایعات آن حذف و به قطعات کوچک خرد شد. سپس در فریزر گذاشته شد تا بافت آن کمی سفت شود. سپس با چرخ گوشت، ریز شده و در فریزر نگهداری شد. جهت استخراج چربی از دمبه گوسفندی، روش ذوب کردن خشک تحت خلاء و دستگاه تبخیر کننده دوار مورد استفاده قرار گرفت. به این ترتیب که بالن حاوی ۱۰۰ g دمبه چرخ شده به روتاری متصل شد و استخراج چربی به مدت ۲ ساعت تحت شرایط خلاء، در درجه حرارت 80° C و با سرعت چرخش بالن به میزان ٦۰rpm انجام گرفت. سپس جهت تسهیل در فرآیند فیلتراسیون ۲۰۰ ml پترولیوم اتر ($40-60^{o}$ C) داخل بالن ریخته شد و محتویات بالن توسط قیف و ارلن بوخنر تحت خلاء صاف شد. در حین صاف شدن، پرس صورت گرفت. محلول صاف شده به دکانتور منتقل شد و فاز آبی جدا شد. جهت اطمینان از عدم وجود آب، به محلول بدست آمده (چربی و حلال) مقداری سولفات

11. Mutton Tallow

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-11-28]

سدیم بدون آب اضافه شد و پس از ۵ دقیقه تحت خلاء صاف شد. در ادامه به وسیله تبخیر کننده دوار تحت خلا، حلال موجود در درجه حرارت C^{o} ۸۰ - ۶۰ از چربی جدا شد. مینیمم حلال باقیمانده در چربی با گاز ازت خارج شد و چربی به ظرف شیشه‌ای تمیزی منتقل و در فریزر نگه داری شد [۱۶].

۲-۸- بررسی قدرت آنتی اکسیدانی γ-اوریزانول توسط دستگاه رنسیمت

به منظور بررسی قدرت آنتی اکسیدانی γ-اوریزانول توسط دستگاه رنسیمت از استاندارد AOCS با شماره Cd 12b-92 و استاندارد شماره ۳۷۳۴ ایران استفاده شده است. در این آزمون γ-اوریزانول بدست آمده از ٤ رقم برنج طارم محلی، فجر، شیرودی و ندا که با روش صابونی کردن بدست آمده اند در مقادیر ۰/۰۱ ، ۰/۰۵ و ۰/۱ درصد به چربی گوسفندی اضافه شدند و زمان پایداری در برابر اکسیداسیون برای ۰/۰۱ ± ۲/۵ گرم نمونه چربی توسط دستگاه رنسیمت مدل Metrohm۷٤۳ در درجه حرارت C^{o} ۱۱۰ و با جریان هوای ۲۰ لیتر بر ساعت ارزیابی شد.

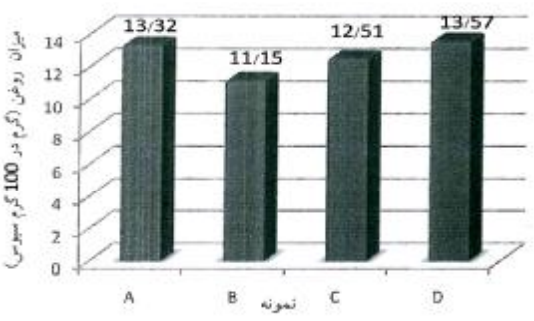
۲-۹-آنالیز آماری

نرم افزار SPSS 3[12] به منظور تجزیه و تحلیل آماری داده ها مورد استفاده قرار گرفت. نتایج تجزیه واریانس در قالب یک طرح کاملا تصادفی بر روی هر یک از صفات تحت بررسی، مورد ارزیابی قرار گرفت. گوناگونی در هر صفت تحت تاثیر دو عامل واریته و خطای عملیاتی است. با رسم منحنی هیستوگرام و آزمون دانکن اختلاف آماری معنی دار بین داده ها مورد بررسی قرار گرفت. P-Value کمتر از ۰/۰۵ به عنوان معنی دار بودن رابطه در نظر گرفته شده است.

۳- نتایج و بحث

نمودار ۱ میزان روغن موجود در نمونه های سبوس برنج مورد آزمون یعنی ارقام طارم محلی (A)، فجر (B)، شیرودی (C) و ندا (D) را نشان می دهد.

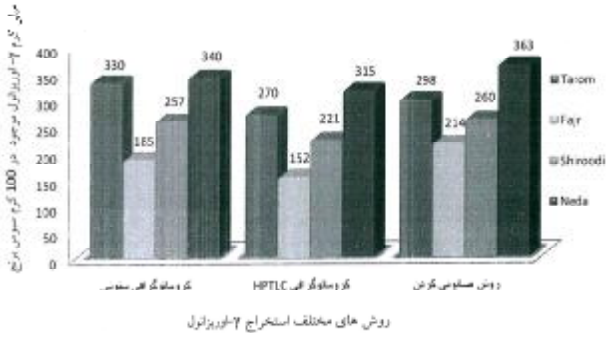
12. Statistical Package for Social Science



نمودار ۱ میزان روغن نمونه های سبوس برنج

میزان روغن سبوس برنج، معمولاً بین ۲۵-۹ گرم روغن در ۱۰۰ گرم سبوس برنج می باشد که به فاکتورهایی همچون روش آسیاب برنج، کهنه یا تازه بودن سبوس، روش پایدار کردن سبوس، روش استخراج روغن، شرایط کشت و رشد، نوع حلال و واریته برنج بستگی دارد [۱۷]. نتایج این پژوهش نشان می دهد که رقم برنج ندا با ۱۳/۵۷ گرم روغن در ۱۰۰ گرم سبوس برنج دارای بیشترین محتوای روغنی می باشد. بعد از آن به ترتیب ارقام طارم محلی، شیرودی و نهایتا برنج فجر قرار می گیرند. نتایج آنالیز آماری نشان می دهد به جز ارقام طارم محلی و ندا بین بقیه ارقام از نظر آماری اختلاف معنی دار وجود دارد (P< ۰/۰۵). با توجه به این نتایج می توان نتیجه گرفت که ارقام برنج شمال از پتانسیل بسیار خوبی جهت استحصال روغن برخوردار می باشند.

نمودار ۲ میزان γ-اوریزانول استخراجی از ارقام مختلف سبوس برنج شامل طارم محلی، فجر، شیرودی و ندا را به روش های کروماتوگرافی ستونی، کروماتوگرافی HPTLC و روش صابونی کردن نشان می دهد.



نمودار۲ مقایسه میزان γ-اوریزانول استخراجی از ارقام مختلف سبوس برنج به روش های کروماتوگرافی ستونی، کروماتوگرافی HPTLC و روش صابونی کردن

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-11-28]

همان طور که نتایج نشان می دهد بیشترین میزان γ- اوریزانول نیمه خالص که به روش کروماتوگرافی ستونی استحصال شده است مربوط به رقم برنج ندا با ۳٤۰ میلی گرم γ- اوریزانول در ۱۰۰ گرم سبوس برنج می باشد. بعد از برنج ندا به ترتیب نمونه های برنج طارم محلی، شیرودی و در آخر برنج فجر قرار می گیرند. نتایج آنالیز آماری نشان می دهد به جز ارقام طارم محلی و ندا بین بقیه ارقام از نظر آماری اختلاف معنی دار وجود دارد (P< ۰/۰۵). محتوای γ- اوریزانول نیمه خالص به دست آمده تا حد زیادی به روش استخراج روغن در مرحلهٔ قبل، بستگی دارد. زیرا ترکیب آنتی اکسیدانی γ- اوریزانول بسیار حساس می باشد. به همین جهت در روش استخراج روغن خام سعی شده است تا حد امکان عملیات استخراج در مدت زمان کوتاه تری انجام گیرد و بلافاصله از روغن استخراجی برای استحصال γ- اوریزانول استفاده شود.

از جمله دیگر عوامل مؤثر در محتوای استخراج γ- اوریزانول نیمه خالص می توان به ابعاد ستون کروماتوگرافی (ارتفاع و قطر ستون)، نوع جاذب مصرفی، سرعت جریان فاز شستشو، قدرت شستشوی حلال، حجم شستشو، عدم وجود حباب در ستون سیلیکاژلی، عدم ترک خوردن سطح ستون، تراز بودن سطح ستون، بدون تغییر ماندن آن در هنگام عملیات و خطاهای فردی می باشد. بنابراین بایستی هنگام کار با ستون کروماتوگرافی دقت فراوانی نمود و خطای آزمایش کننده را به حداقل ممکن رساند [۱۸].

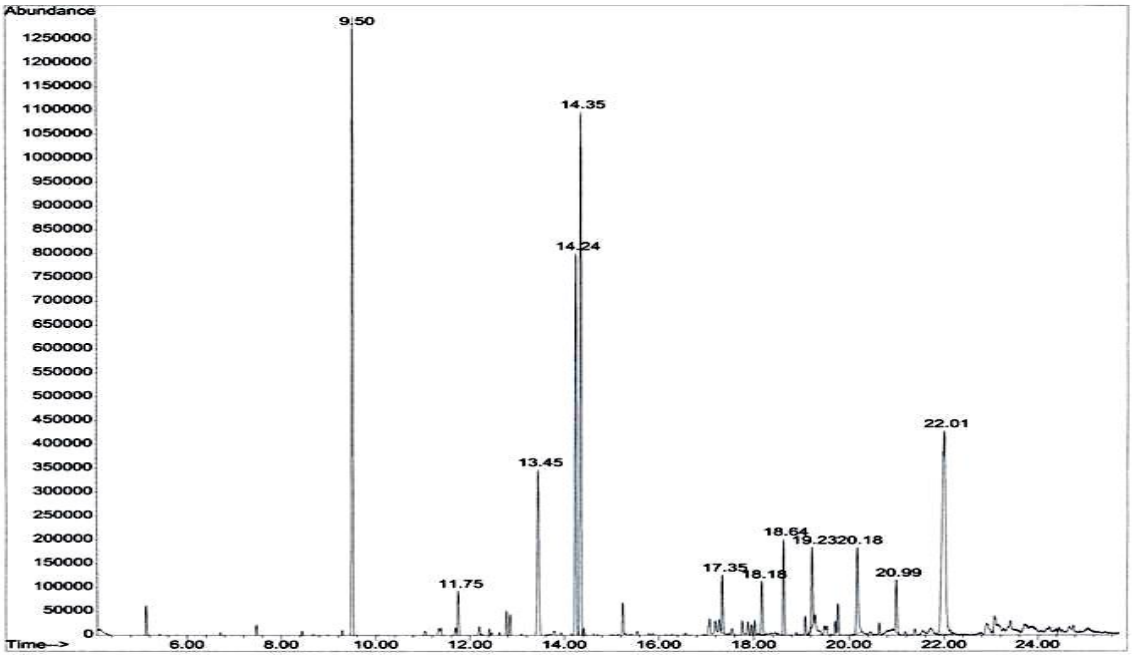
در خالص سازی γ- اوریزانول به روش کروماتوگرافی HPTLC رقم برنج ندا با ۳۱۵ میلی گرم γ- اوریزانول در ۱۰۰ گرم سبوس برنج دارای بیشترین محتوای γ- اوریزانول می باشد. بعد از آن به ترتیب ارقام برنج طارم محلی، شیرودی و فجر قرار می گیرند. نتایج آنالیز آماری نشان می دهد که تمامی ارقام مورد آزمون از نظر محتوای γ- اوریزانول خالص دارای اختلاف آماری معنی دار با یکدیگر می باشند (P< ۰/۰۵). عوامل مختلفی در میزان γ- اوریزانول به دست آمده تأثیرگذارند که مهمترین این عوامل تازگی نمونه روغنی مورد آزمون می باشد. از دیگر عوامل مؤثر می توان به نوع حلال، نوع فاز ثابت، دما، رطوبت و سایر شرایط محیطی اشاره نمود. طی تحقیقی که در سال ۲۰۰٦ روی دانه های قهوه ای برنج تایلندی که تنها مرحله شلتوک گیری را طی کرده بودند، انجام گرفت مشخص شد میزان γ- اوریزانول موجود در ۱۰۰ گرم دانه برنج قهوه ای بین g ۱۰۰ دانه/mg ۷۱/۳-۹/۲ متغیر می باشد. در این تحقیق از کروماتوگرافی ستونی و کروماتوگرافی HPLC[13] در حضور استاندارد γ- اوریزانول، به منظور جداسازی و خالص سازی این ترکیب استفاده شده است [۱۹].

در روش استخراج γ- اوریزانول به روش صابونی کردن از بین ارقام برنج مورد بررسی، برنج ندا با ۳٦۳ میلی گرم γ- اوریزانول در ۱۰۰ گرم سبوس برنج، دارای بیشترین مقدار γ- اوریزانول می باشد و بعد از آن به ترتیب نمونه های برنج طارم محلی، شیرودی و فجر قرار می گیرند. نتایج آنالیز آماری نشان می دهد که تمامی ارقام مورد آزمون از نظر درصد γ- اوریزانول دارای اختلاف آماری معنی دار با یکدیگر می باشند (P< ۰/۰۵). طبق تحقیقی که در سال ۱۹۸٦ صورت گرفته مشخص شده است که درصد γ- اوریزانول موجود در روغن خام سبوس برنج به میزان ۲/۹-۰/۹٦ ٪ می باشد که در آن از روش HPLC جهت اندازه گیری میزان γ- اوریزانول روغن خام سبوس برنج استفاده شده است [۲۰]. با توجه به میلی گرم γ-اوریزانول موجود در نمونه های سبوس برنج مورد آزمون مشخص می شود که این ارقام برنج دارای مقدار مطلوبی γ- اوریزانول بوده و نتیجتاً روغن حاصله از قابلیت آنتی اکسیدانی بالایی نیز برخوردار خواهد بود.

در روش صابونی کردن عوامل مختلفی باعث افت میزان γ- اوریزانول می شود که مهمترین عامل، شکسته شدن پیوند استری بین اسید فرولیک و استرول های گیاهی و الکل های تری ترپنی می باشد که در نتیجه تجزیه این پیوند، اوریزانول به دو فراکسیون تبدیل می شود که بخشی از آن وارد فاز آبی شده و قابل بازیافت نخواهد بود. با افزایش pH به حدود ۹، مهاجرت ترکیبات غیر قابل صابونی به فاز اتری افزایش می یابد و راندمان بازیافت اوریزانول به حداکثر خود می رسد [۲۱]. نمودار۳ کروماتوگرام شناسایی ترکیبات γ-اوریزانول را توسط دستگاه GC/MS نشان می دهد.

13. High Performance Liquid Chromatography

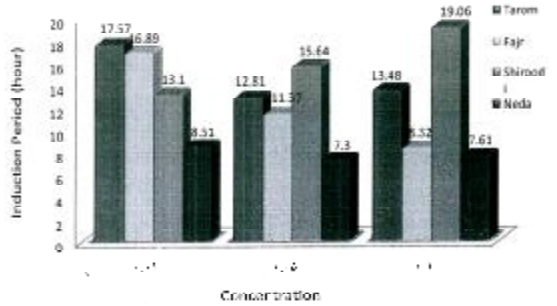
[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-11-28]



نمودار۳ کروماتوگرام شناسایی ترکیبات γ-اوریزانول موجود در روغن سبوس برنج توسط GC/MS شامل سیکلوآرتانیل فرولات، سیکلوآرتنیل فرولات، ۲٤- متیلن سیکلو آرتانیل فرولات در دقیقه ۵۰ : ۹ ؛ Δ7-استیگماستنیل فرولات، استیگماستریل فرولات،Δ7-سیتوستنیل فرولات در دقیقه ۲٤ : ۱٤ و کامپستریل فرولات، کامپستانیل فرولات، β- سیتوستریل فرولات در دقیقه ۳۵ : ۱٤

در نتیجه این کروماتوگرام ۱۳ پیک به دست آمده است که پیک های دقایق ۵۰ : ۹، ۲٤: ۱٤، ۳۵ : ۱٤ ترکیبات مختلف اوریزانول را شناسایی کرده اند. ۳ ترکیب سیکلوآرتانیل فرولات، ۲٤-متیلن سیکلوآرتانیل فرولات و کامپستریل فرولات جزء ترکیبات اصلی γ- اوریزانول هستند که در این آزمون نیز شناسایی شده اند.

بعد از استخراج γ- اوریزانول، جهت بررسی قدرت آنتی اکسیدانی این ترکیب و مقایسه ارقام مختلف برنج طارم محلی، فجر، شیرودی و ندا از این نظر با یکدیگر از دستگاه رنیسمت استفاده شده است. به این منظور از دمبه گوسفندی به دلیل عدم حضور ترکیبات آنتی اکسیدانی استفاده شد و γ- اوریزانول در غلظت های مختلف ۰/۰۱ ، ۰/۰۵ و ۰/۱ ٪ به چربی گوسفندی افزوده شد تا به این ترتیب مشخص شود که حداکثر قدرت آنتی اکسیدانی این ترکیب در چه غلظتی می باشد. نمودار ٤ مقایسه زمان پایداری چربی گوسفندی حاوی غلظتهای ۰/۰۱ ، ۰/۰۵ ، ۰/۱ ٪ γ- اوریزانول حاصله از سبوس برنج ارقام طارم محلی،فجر، شیرودی و ندا را در برابر اکسیداسیون در دمای $110\ ^{o}C$ نشان می دهد.



نمودار ٤ مقایسه زمان پایداری در برابر اکسیداسیون چربی گوسفندی حاوی غلظت های مختلف اوریزانول در دمای ۱۱۰°C

همان طور که ملاحظه می گردد زمان مقاومت چربی گوسفندی بدون حضور آنتی اکسیدان، ۱/۱۷ ساعت می باشد اما با افزودن اوریزانول حاصله از ارقام مختلف برنج مورد آزمون مقاومت چربی گوسفندی نسبت به اکسیداسیون افزایش می یابد. مقایسه نتایج این آزمون نشان می دهد که بیشترین قدرت آنتی اکسیدانی در بین ارقام مورد آزمون مربوط به نمونه

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-11-28]

طارم محلی می باشد زیرا در کمترین غلظت مصرفی یعنی غلظت ۰/۰۱ درصد قادر به افزایش زمان مقاومت چربی در برابر اکسیداسیون به مدت ۱۷/۵۷ ساعت شده است.

٤- نتیجه گیری

γ ـ اوریزانول از جمله ترکیبات غیر صابونی شونده مهم موجود در روغن سبوس برنج است که به دلیل دارا بودن ترکیبات فنولیک از خاصیت آنتی اکسیدانی و خواص دارویی فراوانی برخوردار می‌باشد. در این پژوهش از روش های مختلف کروماتوگرافی به منظور جداسازی و شناسایی ترکیبات γ- اوریزانول از روغن خام سبوس برنج استفاده شده است. ترکیباتγ- اوریزانول شناسایی شده با این روش شامل Δ7- استیگماستنیل فرولات، استیگماستریل فرولات،Δ7 سیتوستنیل فرولات، کامپستریل فرولات، کامپستانیل فرولات، β- سیتوستریل فرولات، سیکلو آرتنیل فرولات، سیکلو آرتانیل فرولات، ٢٤-متیلن سیکلو آرتانیل فرولات می باشد. این روش در مقیاس صنعتی به دلیل گران بودن چندان مناسب نیست. در حالی که استفاده از روش دوم یعنی صابونی کردن روغن خام سبوس برنج و استخراج γ- اوریزانول از Soap Stock روغن خام سبوس برنج به عنوان روشی کاربردی تر مطرح می شود. راندمان استحصال اوریزانول با روش صابونی کردن ٧٦/٥٪ بوده است. با این روش کنسانتره ای حاوی ١٦/٣٪ اوریزانول بدست آمده است. γ-اوریزانول حاصله از روش صابونی کردن روغن خام سبوس برنج در مقایسه با روش اول که در آن از کروماتوگرافی ستونی، HPTLC و GC/MS به منظور جداسازی، خالص سازی و شناسایی ترکیبات γ-اوریزانول استفاده شد از خلوص بالاتری نسبت به کروماتوگرافی ستونی و راندمان بالاتری نسبت به کروماتوگرافیHPTLC برخوردار است. جهت بررسی قدرت آنتی اکسیدانیγ- اوریزانول، از γ- اوریزانول حاصله از Soap Stock روغن خام سبوس برنج استفاده شد. نتایج این تحقیق نشان داد در بین ارقام برنج مورد آزمون، γ- اوریزانول استخراجی از رقم برنج طارم محلی دارای بیشترین قدرت آنتی اکسیدانی می باشد زیرا در کمترین غلظت مصرفی یعنی غلظت ۰/۰۱ درصد قادر به افزایش زمان مقاومت چربی گوسفندی در برابر اکسیداسیون به مدت ۱۷/۵۷ ساعت شده است.

٥- منابع

[1] Tamagawa, M., Otaki, Y., Takahashi,T., Otaka,T., Kimura, S., 1992, Carcinogenicity Study of γ-Oryzanol in B6C3F1 Mice, Fd. Chem. Toxic.,Vol. 30, pp.49-56.

[2]Tsuchiya, T., and Kaneko, R., 1954, Separation of Oryzanol, J. Soc. Chem.Ind.Japan, Vol.57, pp. 526.

[3] Shimizu, M. and Ohta, G., 1957, Studies on the Constituents of Rice Bran Oil: II. Structure of Oryzanol-A, Pharm. Bulletin (Tokyo), Journal of American Oil Chemist Society,Vol. 5, pp. 40-44.

[4] Sayre, P., Robert, N., 1988, Rice Bran as a Source of Edible Oil and Higher Value Chemicals, Western Regional Research Center, ARS, USDA., pp.54-65.

[5]Diack,M., Saska,M., 1994, Separation of Vitamin E and gamma-Oryzanol from Rice Bran by Normal-Phase Chromatography, Journal of American Oil Chemist Society,Vol. 71, pp.1211-1217.

[6]Kahlon, T.S., Saunders, R.M., Chow, F.I.,Chiu, M.M., and Betschart, A.A., 1990, Influence of Rice Bran, Oat Bran, and Wheat Bran on Cholesterol and Triglycerides in Hamsters, Cereal Chemistry,Vol. 67, pp.439

[7]Caudia J.,Massima C., Maria C., Luisella P., 2005, Antioxidant Activity of Gamma-Oryzanol Mechanism of Action and its Effect on Oxidative Stability of Pharmaceutical.,International Journal of Pharmaceutics,Vol.299.Issue 1-2, pp.146-154.

[8]Oguni, C., Sota, K., Takayama, T. and Inagaki, Y., 1962, Clinical Effects of γ-Oryzanol on Vegetative Neurosis, Clin Gynecol Obstet.,Vol. 16, pp. 57.

[9]Haqua,M.H., Haqua,A.U.,1999, Compositions for the Prevention and Treatment of Warts, Skin Blemishes and Other Viral-Induced Tumors,USA,Patent No.05945116, pp. 23-34.

[10]Kahlon, T.S., Saunders, R.M., Chow, F.I.,Chiu, M.M., and Betschart, A.A., 1990, Influence of Rice Bran, Oat Bran, and Wheat Bran on Cholesterol and Triglycerides in Hamsters, Cereal Chemistry,Vol. 67, pp.439

[11]Xu, Z., Hua, N., Godber, J.S., 2003, Antioxidant activity tocopherols, tocotrienols, and gamma –oryzanol components from rice bran against cholesterol oxidation accelerated by 2,2′-

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-11-28]

[18]Huck, C., Wolfgang, S., Surapote, W., Heimo , S., Gunther, B., 2005, Simultaneous determination of Carotinoids, Tocopherols, and γ-oryzanol on crude rice bran oil by liquid chromarography coupled to diode array mass spectrometric detection employing silica C30 stationary phases, Institute of Analytical Chemistry and Radio Chemistry, JSS Journal, Vol. 28, pp. 1712-1718.

[19]Boonsit, P., Karladee, D., Phongpiachan,P., 2006, Gamma Oryzanol Content in Purple Rice Thailand Local Genotypes, Prosperity and Poverty in a Globalized World – Challenges for Agricultural Research, Chiang Mai University, Agronomy Department, Agriculture Faculty, Thailand. , International Journal of Pharmaceutics, Vol.15, pp.357-479.

[20]Tamagawa, M., Otaki, Y., Takahashi,T., Otaka,T., Kimura, S., 1992, Carcinogenicity Study of γ-Oryzanol in B6C3F1 Mice, Fd. Chem. Toxic.,Vol. 30, pp.49-56.

[21]Huck, C., Wolfgang, S., Surapote, W., Heimo , S., Gunther, B., 2005, Simultaneous determination of Carotinoids, Tocopherols, and γ-oryzanol on crude rice bran oil by liquid chromarography coupled to diode array mass spectrometric detection employing silica C30 stationary phases, Institute of Analytical Chemistry and Radio Chemistry, JSS Journal, Vol. 28, pp. 1712-1718.

azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride, J.Agric, Food Chem. Vol. 49, pp.123-129.

[12]Caudia J.,Massima C., Maria C., Luisella P., 2005, Antioxidant Activity of Gamma-Oryzanol Mechanism of Action and its Effect on Oxidative Stability of Pharmaceutical.,International Journal of Pharmaceutics,Vol.299.Issue 1-2, pp.146-154.

[13]Kahlon, T.S., Saunders, R.M., Chow, F.I.,Chiu, M.M., and Betschart, A.A., 1990, Influence of Rice Bran, Oat Bran, and Wheat Bran on Cholesterol and Triglycerides in Hamsters, Cereal Chemistry,Vol. 67, pp.439

[14]Diack,M., Saska,M., 1994, Separation of Vitamin E and gamma-Oryzanol from Rice Bran by Normal-Phase Chromatography, Journal of American Oil Chemist Society,Vol. 71, pp.1211-1217.

[15]XU, Z., Godber, S., 1999, purification and Identification of Components of γ-oryzanol in Rice bran oil, Agricultural and Food Chemistry Journal, Vol. 47, pp. 2724-2728.

[16]Gharachorlo,M.,Ghavami,M.,Aberomand, P., 2007, Qualitative Evaluation of Tallow Fractions, Journal of Food Technology & Nutrition,No.3, pp. 2-15.

[17]Boonsit, P., Karladee, D., Phongpiachan,P., 2006, Gamma Oryzanol Content in Purple Rice Thailand Local Genotypes, Prosperity and Poverty in a Globalized World – Challenges for Agricultural Research, Chiang Mai University, Agronomy Department, Agriculture Faculty, Thailand. , International Journal of Pharmaceutics, Vol.15, pp.357-479.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-11-28]

Evaluation of methods for the separation of gamma oryzanol from Iranian rice rran oil varieties

Kamyab, S. [1*],Ghavami, M. [2],Gharachorlo, M. [3],Larijani, K. [4]

1- M.Sc. Graduate in Food Science &Technology, Faculty of Agriculture,Food Science Department,Islamic Azad University,Sciences & Research Campus of Tehran.
2- Ph.D.,Associat Prof in Food Science &Technology, Faculty of Agriculture,Food Science Department,Islamic Azad University,Sciences & Research Campus of Tehran.
3- Ph.D.,Assistant Prof in Food Science &Technology, Faculty of Agriculture,Food Science Department,Islamic Azad University,Sciences & Research Campus of Tehran.
4- Ph.D.,Lecturer in Islamic Azad University,Sciences & Research Campus of Tehran.
(Received: 88/8/3 Accepted:89/2/5)

γ-oryzanol is an unsaponifiable component of rice bran oil, composed of several kinds and has antioxidant activity similar to tocopherols. In order to separate γ-oryzanol, four varieties of rice from north part of Iran have been selected. These varieties include "local Tarom", "Fajr", "Shirudi" and "Neda". rice bran oil was subjected to oil extraction after thermal stabilization. Column and HPTLC chromatography followed by GC/MS were employed for separation, purification and identification of γ-oryzanol. The antioxidant activity of the isolated concentrates were determined 0.01, 0.05 and 0.1 percent on tallow, a substrate suitable to evaluate antioxidant activity due to the lack of natural antioxidants. The results indicated that "Neda" variety had the highest content of oil and γ-oryzanol but the obtained γ-oryzanol from "local Tarom"variety showed the highest antioxidant activity.

Keywords: γ-oryzanol, Rice bran oil, Chromatography, Saponification, Antioxidant activity.

*Corresponding Author E-Mail address: kamyab_2203@yahoo.com

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-11-28]