مقایسه تاثیر روش های کربن دی اکسید فوق بحرانی و آب زیر بحرانی بر محتوای ترکیبات فنولی و خواص آنتی اکسیدانی میوه زغال اخته

فروغ گیلانی[۱]، زینب رفتنی امیری[۲*]، رضا اسماعیل زاده کناری[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع ساری
۲- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۳- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

(تاریخ دریافت: ۹۵/۰۲/۰۸ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۳/۲٤)

چکیده

میوه زغال اخته علاوه بر مصرف خوراکی، یک گیاه دارویی با جنبه های عملکردی متفاوت در طب سنتی است. در این پژوهش، خاصیت آنتی اکسیدانی و میزان کل ترکیبات فنولی عصاره میوه زغال اخته حاصل از روش های استخراج کربن دی اکسید فوق بحرانی و آب زیر بحرانی مورد ارزیابی قرار گرفت. محتوای فنول کل عصاره ها با استفاده از روش فولین سیوکالتیو تعیین شد. فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ها با آزمون های به دام اندازی رادیکالهای آزاد DPPH و سنجش قدرت احیاکنندگی بررسی گردید. عصاره میوه زغال اخته حاصل از روش کربن دی اکسید فوق بحرانی، بیشترین میزان ترکیبات فنولی با ۱۳۲/۹۷ میلی گرم اسید گالیک در گرم عصاره خشک شده و هم چنین بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی را نشان داد. فعالیت وابسته به غلظت ترکیبات فنولی در مورد اثر آنتی رادیکالی و قدرت احیا کنندگی در همه عصاره ها مشاهده شد. بدین ترتیب می توان میوه زغال اخته را به علت حضور ترکیبات فعال زیستی مانند ترکیبات فنولیک در آن، به عنوان منبع مفیدی برای تأمین آنتی اکسیدان های طبیعی معرفی نمود.

کلید واژگان: آب زیر بحرانی، زغال اخته، فعالیت آنتی اکسیدانی، کربن دی اکسید فوق بحرانی

*مسئول مکاتبات: Zramiri@gmail.com

۱- مقدمه

در صنایع غذایی، از ترکیبات آنتی اکسیدانی برای جلوگیری از تغییرات نامطلوب ناشی از واکنش اکسیداسیون استفاده می شود. به دلیل مضرات آنتی اکسیدان های سنتتیک مانند [1] BHT,BHA[2], TBHQ[3] که به طور رایج در غذا برای جلوگیری یا تاخیر در واکنش های اکسیداتیو استفاده می شود در طی سال های اخیر، مطالعاتی در زمینه آنتی اکسیدان های طبیعی برای جایگزینی آنها به جای انواع سنتتیک انجام می شود[۱ و۲]. میوه ها وسبزی ها، منابع غنی از ترکیبات طبیعی به نام پلی فنل ها هستند. این ترکیبات گیاهی که از آنتی اکسیدان های طبیعی به شمار می روند با داشتن فعالیت آنتی اکسیدانی قوی در برابر اکسیداسیون و آسیب سلولی ناشی از رادیکال های آزاد تولید شده که برای بدن مضر هستند محافظت می کند[۳]. استخراج یک مرحله بحرانی در دستیابی بالای ترکیبات ارزشمند مانند ترکیبات فنولیک از بافت های گیاهی است[٤]. انتخاب روش استخراج مناسب، به نوع ترکیبات مورد نظری که باید استخراج شوند، ویژگی های ساختاری ماتریس گیاهی (میوه، ساقه، دانه، برگ، ریشه و گل و ...)، کیفیت و بازده مورد نیاز برای عصاره، شرایط فرآیند(دما و فشار و ...) و سنجش اقتصادی فرآیند، بستگی دارد[٥]. از این رو گرایش به استفاده از تکنولوژی مقرون به صرفه، ایمن و بی خطر برای محیط زیست روند رو به رشد داشته تا از سمیت ناشی از حلال بر عصاره جلوگیری کند و کیفیت آن را بالا ببرد رایج ترین روش ها سیال فوق بحرانی[4] و آب زیر بحرانی[5] می باشد[٦]. کربن دی اکسید رایج ترین حلال مورد استفاده در فرآیند استخراج با سیال فوق بحرانی است[٤]. کربن دی اکسید در شرایط فوق بحرانی می تواند مانند یک گاز از میان مواد جامد عبور کند و مواد را مانند یک مایع حل کند بنابراین داشتن هر دو ویژگی حلالیت مایع و نفوذ پذیری گازی و هم چنین ویسکوزیته پایین آن در شرایط فوق بحرانی، امکان نفوذ آن به ماتریس گیاهی را فراهم می سازد[۷ و۸]. این ماده هم چنین می تواند به آسانی از مواد استخراجی، بدون باقی گذاشتن ترکیبات سمی در عصاره جدا شود[۹]. آب زیر بحرانی، آبی است که حالت مایع خود را در دمای بین ۱۰۰ درجه سانتی گراد (نقطه جوش آب) و ۳۷٤ درجه سانتی گراد (نقطه بحرانی آب) زیر فشار بحرانی ۲۲ مگاپاسکال حفظ کند[۱۰]. آب زیر بحرانی، آب داغ تحت فشار یا آب فوق داغ هم نامیده می شود[٦]. آب در دمای محیط، یک حلال قطبی با ثابت دی الکتریک ۷۹/۹ و دانسیته $1000 kg/m^3$ است. اما وقتی آب در دمای بالا حرارت داده می شود پیوند هیدروژنی بین مولکول ها شکسته می شود که موجب کاهش ثابت دی الکتریک آن از ۷۹/۹ **به** ۳۲/۵ و ۲۷ می گردد که این عامل، آن را به عنوان حلالی برای مواد هیدروفوبیک (آب گریز) مناسب می سازد[۱۰]. فرآیند آب زیر بحرانی به عنوان یک تکنولوژی نوین، به دلیل دارا بودن مزایای فراوانی مانند استفاده از حلال غیر سمی(آب)، ایمن و بی خطر بودن برای محیط زیست، ارزان بودن، مورد توجه قرار گرفته است[٦]. زغال اخته با نام علمی *Cornus mas* L. متعلق به خانواده Cornaceae، یک گیاه دارویی با جنبه های عملکردی مختلف در طب سنتی است. این میوه رشد گسترده ای در بعضی بخش های اروپا و اسیا مانند ایران دارد[۱۱ و۱۲]. میوه زغال اخته به رنگ قرمز با ۲ سانتی متر طول و ۱/۵ سانتی متر قطر، شامل یک هسته منفرد است که به صورت تازه و خشک شده مورد استفاده قرار می گیرد. زغال اخته منبع غنی از ترکیبات بیواکتیو مانند ترکیبات فنولیک و مواد معدنی است و حاوی مقادیر بالا ویتامینC (اسید اسکوربیک) همانند پرتقال می باشد[۱۱ و۱۳]. هدف از این مطالعه، استخراج ترکیبات فنولی میوه زغال اخته و بررسی خصوصیات آنتی اکسیدانی آن است و اثر نوع روش استخراج و غلظت عصاره بر بازده استخراج ترکیبات فنولیک میوه زغال اخته مورد ارزیابی قرا گرفت.

۲- مواد وروش‌ها

۲-۱- آماده سازی مواد اولیه

میوه زغال اخته به صورت تازه از بازار محلی شهرستان آمل در شهریور ۱۳۹۳ تهیه گردید. پس از تمیز نمودن میوه و خارج کردن هسته از آن، بر روی پارچه در مقابل نور آفتاب قرار گرفت

1. Butylated hydroxytoluene
2. Butylated hydroxyanisole
3. tertiary butylhydroquinone
4. Supercritical fluid
5. Subcritical water

و طی مدت ۵ روز خشک گردید سپس با آسیاب الکتریکی (مدل moulinex type 719 ساخت کشور فرانسه) پودر و درکیسه های نایلونی در فریزر ۱۸- درجه سانتی گراد نگهداری گردید. کلیه مواد شیمیایی مورد نیاز در آزمایش شامل معرف فولین سیوکالتیو، تری کلرواستیک اسید، بافر سدیم فسفات(pH=۶/۶)، فری سیانید پتاسیم و فریک کلراید از شرکت سیگما آلدریچ (St. Louis, USA) و مرک (Darmstadt, Germany)خریداری شد.

۲-۲- استخراج با استفاده از کربن دی اکسید فوق بحرانی

در این روش ۱۰ گرم نمونه پودر میوه زغال اخته با نسبت ۱ به ۱۰ با حلال آب- اتانول (۵۰:۵۰) به عنوان حلال اصلاحگر مخلوط شد. عصاره گیری توسط دستگاه کربن دی اکسید فوق بحرانی (Suprex MPS/225 Multipurpose system) در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد و فشار ۱۰۰ بار به مدت ۳۰ دقیقه صورت گرفت. عصاره استخراجی صاف و بعد از جداسازی حلال تا زمان انجام آزمایشات بعدی در فریزر با دمای ۱۸- درجه سانتی گراد نگه داری گردید[۱۴].

۲-۳- استخراج با استفاده از آب زیر بحرانی

در این روش، عصاره گیری توسط استخراج کننده آب زیر نقطه بحرانی در دمای ۱۶۰ درجه سانتی گراد و فشار ۶/۸۹ مگاپاسکال و سرعت جریان ۱ میلی لیتر بر دقیقه برای مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. سپس عصاره بدست آمده تغلیظ و تا زمان انجام آزمایشات بعدی در فریزر با دمای ۱۸- درجه سانتی گراد نگه داری گردید[۱۵].

۲-۴- تعیین محتوای فنولی با روش فولین سیوکالتیو[۶]

به منظور انجام آزمایش، به ۰/۵ میلی لیتر از عصاره های استخراجی میوه زغال اخته، ۲/۵ میلی لیترمعرف فولین سیوکالتیو که ۱۰ برابر با آب مقطر رقیق شده و ۲ میلی لیتر سدیم کربنات ۷/۵ درصد اضافه نموده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده و سپس قرائت جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر(unico 2100 uv/vis) انجام گرفت. مقدارکل ترکیبات فنولی بر اساس میلی گرم اسید گالیک در گرم عصاره خشک شده بیان گردید[۱۶].

۲-۵- بررسی خاصیت آنتی رادیکالی با آزمون[۷] DPPH

در این روش به ۰/۳ میلی لیتر عصاره در غلظت های مختلف، ۲/۷ میلی لیتر از محلول متانولی ۶×۱۰^{-۵} مولار DPPH افزوده و ۶ دقیقه در مکانی تاریک نگه داری و در نهایت جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر(unico 2100 uv/vis) در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه گیری شد. آنگاه درصد مهار رادیکال های آزاد DPPH طبق فرمول زیر محاسبه شد[۱۶].

$$\text{درصد مهار رادیکال های DPPH} = \frac{\text{جذب نمونه} - \text{جذب DPPH}}{\text{جذب DPPH}} \times 100$$

۲-۶- سنجش قدرت احیا کنندگی

در این آزمون ۱ میلی لیتر از غلظت های مختلف محلول عصاره با ۲/۵ میلی لیتر بافر فسفات (۰/۲ مولار با pH = ۶/۶) و ۲/۵ میلی لیتر فری سیانید پتاسیم ۱ درصد مخلوط و در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد، ۳۰ دقیقه گرم خانه گذاری شد. سپس ۲/۵ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد به مخلوط افزوده و آن گاه ۱۰ دقیقه با دور g ۱۰۰۰ سانتریفوژ شد. در ادامه ۲/۵ میلی لیتر از محلول رویی با ۲/۵ میلی لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی لیتر فریک کلراید ۰/۱ درصد مخلوط و در انتها جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر(unico 2100 uv/vis) در طول موج ۷۰۰ نانومتر قرائت گردید[۱۷].

۲-۷- تجزیه و تحلیل آماری

بررسی اثر روش استخراج (کربن دی اکسید فوق بحرانی و آب زیر بحرانی) بر میزان ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ها در قالب طرح کاملا تصادفی در سه تکرار انجام شد. آنالیز آماری تیمارها توسط جدول آنالیز واریانس با نرم افزار SAS بررسی و مقایسه میانگین ها براساس آزمون دانکن در

6. Folin-Ciocalteu

7 . 2,2′-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical

سطح معنی داری ۵ درصد انجام گرفت. در نهایت برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده گردید.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- مقدار کل ترکیبات فنولی

مقایسه میانگین میزان ترکیبات فنولی استخراج شده از میوه زغال اخته توسط روش های مختلف کربن دی اکسید فوق بحرانی و آب زیر بحرانی در شکل ۱ نشان داده شده است. بیشترین غلظت ترکیبات فنولی به ترتیب در عصاره حاصل از روش کربن دی اکسید فوق بحرانی با مقدار ۱۳۲/۹۷ میلی گرم اسید گالیک در گرم عصاره خشک شده و سپس آب زیربحرانی با مقدار ۱۲۰/۰٤ بوده است که عصاره های استخراجی از این نظر تفاوت معنی داری در سطح ۵ درصد داشتند. یوسفبیک و همکاران(۲۰۱٤)، با مطالعه بر روی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره میوه زغال اخته، مقدار ترکیبات فنولیک استخراجی را در دامنه ۲۰/۱۳ تا ۸۸/٥٦ میلی گرم اسید گالیک بر گرم عصاره خشک شده گزارش کردند که کمتر از نتایج به دست آمده در این تحقیق بود[۱۳]. مقدار کل ترکیبات فنولیک حاصل از حلال های مختلف به علت قطبیت متفاوت هر حلال و توانایی حل کردن آن ها، متفاوت است[۱۸]. در این پژوهش به نظر می رسد که بازده فنول با افزایش قطبیت حلال افزایش یافته است. آب در شرایط زیر بحرانی، با شکسته شدن پیوند هیدروژنی بین مولکول هایش، از مقدار قطبیت آن کاسته شده و در نتیجه توانایی آن را برای حلالیت ترکیبات ناقطبی افزایش می دهد[۱ و۱۰]. کربن دی اکسید نیز در شرایط فوق بحرانی که مولکول های آن دارای مقدار قطبیت محدود است توسط استفاده توأم از کمک حلال قطبی، مقدار قطبیت آن افزایش یافته و در نتیجه توانایی استخراج کربن دی اکسید و حلالیت ترکیبات آلی قطبی بهبود می یابد. بهبود حلالیت در منطقه فوق بحرانی با بر هم کنش های مولکولی عمدتاً پیوند هیدروژنی در ارتباط است[۵ و۱۹]. بنابراین در مطالعه حاضر، مقدار بالاتر فنول حاصل از روش استخراج کربن دی اکسید فوق بحرانی نسبت به آب زیر بحرانی می تواند به علت استفاده از آب_ اتانول(۵۰:۵۰) به عنوان کمک حلال و ماهیت نیمه قطبی ترکیبات فنولی عصاره میوه زغال اخته باشد که حلالیتشان در کربن دی اکسید فوق بحرانی و ترکیب نیمه قطبی آب_ اتانول(۵۰:۵۰) به عنوان اصلاحگر بیشتر بوده است. آب و اتانول مناسب ترین حلال به کار برده شده درصنایع غذایی هستند[۵]. آب به تنهایی با کربن دی اکسید غیر قابل اختلاط است اما ترکیب آب با اتانول که یک محیط با قطبیت متوسط را ایجاد می کند با اضافه شدن به کربن دی اکسید، می تواند بازده استخراج ترکیبات قطبی را افزایش دهد. در حالی که در فرآیند آب زیر بحرانی با افزایش دما، به علت مشارکت نیروهای جاذبه آب، نزدیک به مواد ناقطبی، افزایش قابل توجه در حلالیت ترکیبات ناقطبی ایجاد می شود. در شرایط زیر بحرانی (در دمای بالا)، ثابت یونیزاسیون آب نسبت به دمای اتاق تقریباً سه برابر افزایش می یابد در نتیجه آب زیر بحرانی می تواند به عنوان یک کاتالیست اسیدی یا بازی در طول فرآیند فعالیت کند[٦]. در دماهای بالاتر ساختار ماده تحت فرآیند، متلاشی شده و کاهش میزان استخراج انتظار می رود. بنابراین دلیل دیگر پایین بودن غلظت فنول عصاره آب زیر بحرانی در مطالعه حاضر این است که احتمالا رنجی از ترکیبات فنولیک استخراجی در دمای بالا فرآیند آب زیر بحرانی تخریب شده اند. رنگسریوانگ و همکاران(۲۰۰۹)، در بررسی خود کاهش مقدار ترکیبات فنولیک در دما بالاتر فرآیند آب زیر بحرانی را، تخریب شدن این ترکیبات دانستند[۲۰]. هم چنین در پژوهشی دیگر توسط تونچیافم و همکاران(۲۰۱۳)، تجزیه ترکیبات فنولیک عصاره ضایعات پوست انبه در دماهای بالاتر فرآیند آب زیر بحرانی را دلیل کاهش بازده این ترکیبات بیان نمودند[۲۱].

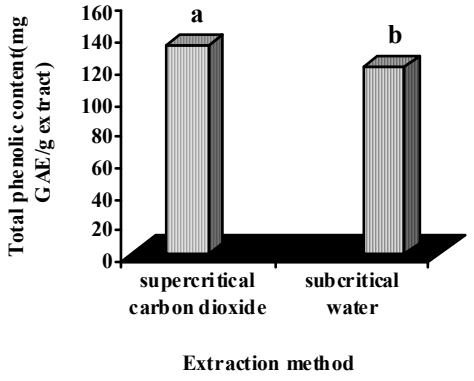

Fig 1 Total phenolic content of *Cornus mas* L. fruit extracts obtained by different extraction methods. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

۳-۲- توانایی مهار رادیکال های آزاد DPPH

DPPH یک رادیکال آزاد پایدار به رنگ ارغوانی است که در واکنش با آنتی اکسیدان به ترکیب با رنگ زرد پایدار تغییر می کند. محلول الکلی DPPH دارای یک ویژگی ماکسیمم جذب در ۵۱۷ نانومتر است که وقتی یک الکترون از آنتی اکسیدان دهنده اتم هیدروژن به DPPH اضافه گردید به علت مهار رادیکال DPPH، جذب در ۵۱۷ نانومتر از بین می رود[۲۲ و۲۳]. توانایی عصاره های حاصل از روش کربن دی اکسید فوق بحرانی و آب زیر بحرانی در مهار رادیکال های آزاد DPPH در شکل ۲ آورده شده است. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که نوع و غلظت عصاره ها تاثیر معنی داری($P < ۰/۰۵$) بر میزان مهار رادیکال های آزاد داشتند. همان طور که در شکل ۲ مشاهده می شود بیشترین و کمترین میزان مهار رادیکال آزاد DPPH به ترتیب متعلق به عصاره حاصل از روش کربن دی اکسید فوق بحرانی و آب زیر بحرانی بوده است. در واقع کربن دی اکسید با داشتن دما و فشار بحرانی پایین(۳۰٤K و ۷/٤MPa) در استخراج ترکیبات حساس به حرارت به خصوص آنتی اکسیدان ها، از تجزیه حرارتی آن ها کاسته و به این ترتیب محافظت از خواص عملکردی این ترکیبات را تضمین می کند بنابراین این ویژگی کربن دی اکسید، در استخراج این ترکیبات مفید است[۵]. به این ترتیب به نظر می رسد استحصال ترکیبات آنتی اکسیدانی بیشتری توسط روش استخراج کربن دی اکسید فوق بحرانی که دارای خاصیت ضد اکسایندگی بالا بوده اند، منجر به افزایش قدرت آنتی رادیکالی عصاره های استخراجی آن نسبت به آب زیربحرانی شده است. در این مطالعه هم چنین فعالیت وابسته به غلظت در مورد اثر آنتی رادیکالی بر روی رادیکال های آزاد DPPH در همه عصاره ها مشاهده شد. نتایج نشان داد که افزایش غلظت ترکیبات فنولی به طور مستقیم میزان توانایی عصاره های مختلف را در مهار رادیکال های آزاد افزایش داد و عصاره حاصل از آب زیر بحرانی با کمترین غلظت فنول با مقدار ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر، کمترین فعالیت مهارکنندگی را به خود اختصاص داد. در واقع توانایی خنثی سازی رادیکال های آزاد ترکیبات فنولی به دلیل داشتن گروه هیدروکسیل است که در غلظت های بالاتر این ترکیبات، به دلیل افزایش تعداد گروه های هیدروکسیل موجود در محیط واکنش، احتمال اهدای هیدروژن به رادیکال آزاد DPPH و به دنبال آن قدرت مهار کنندگی عصاره افزایش می یابد[۲٤]. ایوانوویچ و همکاران(۲۰۰۹)، در نتایج مطالعه خود گزارش کردند که با افزایش غلظت عصاره رزماری حاصل از روش کربن دی اکسید فوق بحرانی از ۰/۰۱۰ به ۱ میلی گرم در میلی لیتر، تاثیر بازداری روی رادیکال آزاد DPPH از ۳۰ به ۱۰۰ درصد افزایش یافت[۲۵]. IC_{50}، به غلظتی از عصاره اطلاق می شود که در آن ٪۵۰ از رادیکال آزاد DPPH موجود در محیط واکنش مهار شوند[۲٦]. بنابراین هر چه این غلظت کمتر باشد نشان دهنده این است که عصاره مورد نظر فعالیت ضد رادیکالی بیشتری دارد. نتایج حاکی از شکل ۳ نشان می دهد که کمترین و بیشترین IC_{50} به ترتیب با مقدار ۰/۹۸ و ۱/۷۷ میلی گرم بر میلی لیتر متعلق به عصاره های استخراجی با روش کربن دی اکسید فوق بحرانی و آب زیر بحرانی بوده است به این ترتیب پایین بودن IC_{50} عصاره حاصل از کربن دی اکسید فوق بحرانی بدین معنا است که مقادیر کمتری از این عصاره قادر به مهار یا خنثی کردن ۵۰ درصد رادیکال های DPPH بوده است. دو و همکاران(۲۰۱٤)، با مطالعه بر روی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره گیاه لیمنوفیلا آروماتیکا[8] گزارش کردند که بین مقدار ترکیبات فنولیک و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ارتباط مستقیم وجود داشت که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد[۲۷].

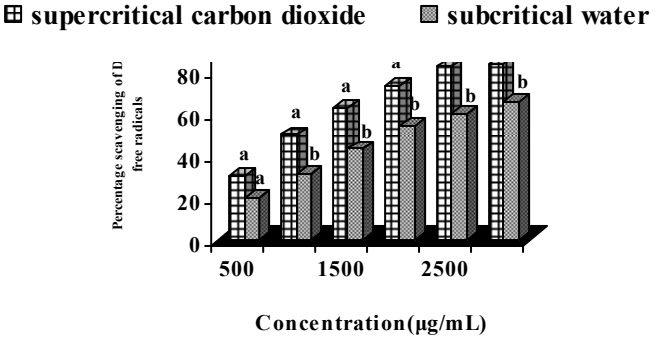

Fig 2 Scavenging activity of *Cornus mas* L. fruit extracts on DPPH Free radicals. Different letters in

8. Limnophila aromatica

each concentration indicate significant differences ($P < 0.05$).

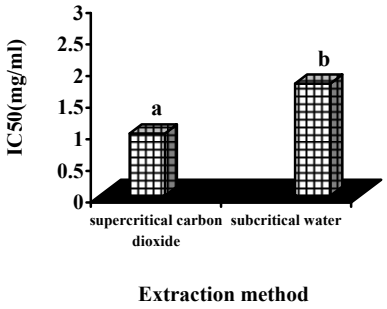

Fig 3 Comparison of IC_{50} (mg/ml) of *Cornus mas* L. fruit extracts obtained by different extraction techniques.
Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

۳-۳- سنجش قدرت احیا کنندگی

مقایسه میانگین میزان جذب غلظت های مختلف عصاره های حاصل از روش کربن دی اکسید فوق بحرانی و آب زیر بحرانی به عنوان شاخصی از قدرت احیا کنندگی در طول موج ۷۰۰ نانومتر در شکل ٤ نشان داده شده است. افزایش جذب نشان دهنده افزایش قدرت احیاکنندگی است. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که عصاره های مختلف در غلظت های بالاتر ترکیبات فنولیک از نظر قدرت احیا کنندگی، تفاوت آماری معنی دار ($P < ۰/۰۵$) با یکدیگر داشتند. آزمون قدرت احیاکنندگی معمولا برای اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیبات هیدروفیل مورد استفاده قرار می گیرد[١٦]. در این مطالعه نیز عصاره هیدروالکلی حاصل از روش کربن دی اکسید فوق بحرانی به کمک اصلاحگر آب_ اتانول(۵۰:۵۰)، قدرت احیاکنندگی بیشتری نسبت به عصاره حاصل از آب زیر بحرانی نشان داد که علت چنین روندی را می توان به کاهش ثابت دی الکتریک آب در شرایط زیر بحرانی نسبت داد که موجب افزایش حلالیت ترکیبات هیدروفوب و در نتیجه استخراج اجزایی با قدرت احیاکنندگی پایین شده است. در این پژوهش به تناسب مقدار فنول، قدرت احیاکنندگی افزایش یافته است. توانایی احیا کنندگی Fe^{3+} به اهدای هیدروژن از ترکیبات فنولیک نسبت داده می شود[۲۸]. پتانسیل اکسایش-کاهش(ردوکس[9]) ترکیبات فنولیک به عنوان عوامل احیا، نقش مهمی در تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی ایفا می کند به دلیل این که گروه هیدروکسیل این ترکیبات قادر به اهدای یک اتم هیدروژن یا یک الکترون به رادیکال آزاد است و به این ترتیب اکسیژن منفرد را کاهش می دهد و اکسایش را به تأخیر می اندازد[۲۹ و۳۰]. به علاوه تعداد و موقعیت گروه هیدروکسیل ترکیبات فنولیک نیز در فعالیت آنتی اکسیدانی آن ها نقش دارد[۲۹]. اگونلانا و همکاران(۲۰۰۸)، با بررسی قدرت احیاکنندگی عصاره متانولیک پوست ساقه درخت موریندا لوسیدا[10]، گزارش کردند که بین مقدار ترکیبات فنولی با قدرت احیا کنندگی عصاره ارتباط مستقیم وجود دارد که با نتایج این پژوهش مطابقت داشت[۳۱]. در پژوهش انجام گرفته توسط یوسفبیک و همکاران(٢٠١٤)، بر روی فعالیت آنتی اکسیدانی میوه زغال اخته بیان نمودند که با کاهش مقدار ترکیبات فنولیک، فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره میوه زغال اخته در هر دو آزمون (مهار کنندگی رادیکال DPPH و قدرت احیاکنندگی) کاهش یافت که با نتایج این مطالعه مطابقت دارد[۱۳]. در این پژوهش، اگرچه نتایج سنجش قدرت احیاکنندگی، داده های حاصل از آزمون مهار کنندگی رادیکال DPPHرا تا حدود زیادی تایید نموده است و عصاره های میوه زغال اخته در هر دو آزمون عملکرد آنتی اکسیدانی مشابهی نشان دادند که بدین ترتیب که فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره هیدروالکلی حاصل از روش استخراج کربن دی اکسید فوق بحرانی در آزمون های قدرت احیاکنندگی و مهار رادیکال DPPH، نسبت به عصاره آب زیربحرانی بالاتر بوده است اما با این وجود به علت این که روش قدرت احیاکنندگی، خاصیت آنتی اکسیدانی ترکیبات هیدروفیل را نشان می دهد و فنولیک اسیدها به عنوان ترکیبات آنتی اکسیدانی که محلول در آب هستند می توان گفت که صحت روش قدرت احیا کنندگی برای سنجش خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره میوه زغال اخته با توجه به سطح بالای فنول در این مطالعه و ماهیت هیدروفیلی آن بیشتر قابل قبول و کارآمد تر است.

9. Redox
10. Morinda Lucida

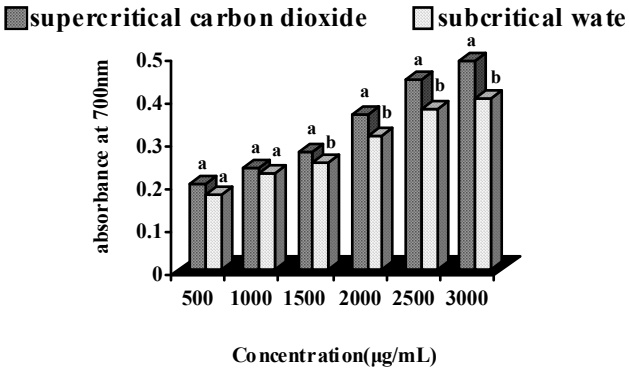

Fig 4 Reducing power of different concentrations of cornelian cherry fruit extracts obtained by different extraction methods.
Different letters in each concentration indicate significant differences ($P < 0.05$).

٤- نتیجه گیری

میوه زغال اخته به واسطه داشتن مقایر زیادی از ترکیبات فنولیک دارای پتانسیل آنتی اکسیدانی بالایی است. نتایج این مطالعه نشان داد که روش کربن دی اکسید فوق بحرانی با بالاترین مقدار فنول استخراجی میوه زغال اخته نسبت به روش آب زیر بحرانی موثرتر بوده است و خواص آنتی اکسیدانی عصاره ها به تناسب افزایش غلظت ترکیبات فنولیک افزایش یافت.

۵- منابع

[1] Rodríguez-Meizoso, I., Marin, F.R., Herrero, M., Señorans, F.J., Reglero, G., Cifuentes, A., and Ibáñez, E. 2006. Subcritical water extraction of nutraceutical with antioxidant activity from oregano. Chemical and functional characterization. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. (41): 1560–1565.

[2] Co, M., Koskela, P., Eklund-Åkergren, P., Srinivas, K., King, J.W., Sjöberg, P.J.R., and Turner, C. 2009. Pressurized liquid extraction of betulin and antioxidant from brich bark. Journal of green chemistry. 11: 668-674.

[3] Shilpi, A., Shivhare, U.S., and Basu, S. 2013. Supercritical co_2 extraction of compounds with antioxidant activity from fruits and vegetables waste. Journal of Focusing on Modern Food Industry. 2(1): 43-62.

[4] Aliakbarian, B., Fathi, A., Perego, P., Dehghani, F. 2012. Extraction of antioxidants from winery wastes using subcritical water. Journal of supercritical fluids. 65: 18-24.

[5] Moraes, M.N., Zabot, G.L., Prado, J.M., and Meireles, M.A.A. 2013. Obtaining antioxidants from botanic matrices applying novel extraction techniques. Journal of food and public health. 3(4): 195-214.

[6] Wiboonsirikul, J., and Adachi, S. 2008. Extraction of functional substances from agricultural productes or by-productes by subcritical water treatment. Journal of food sci. technol. res. 14(4): 319-328.

[7] Liu, H., Jiao,ZH., Liu,J., Zhang, C., Zheng,X., Lai, S., Chen, F., and Yang, H. 2013. Optimization of supercritical fluid extraction of phenolics from date Seeds and characterization of its antioxidant activity. Journal of food analytical Methods. 6: 781–788.

[8] Poontawee,W., Natakankitkul, S., and Wongmekiat, O. 2015. Enhancing phenolic contents and antioxidant potentials of *Antidesma thwaitesianum* by supercritical carbon dioxide extraction. Journal of Analytical Methods in Chemistry. 1–7.

[9] Cardenas-Toro, F.P., Forster-Carneiro, T., Rostagno, M.A., Petenate, A.J., Filho, F.M., and Meireles, M.A.A. 2014. Integrated supercritical fluid extraction and subcritical water hydrolysis for the recovery of bioactive compounds from pressed palm fiber. Journal of supercritical fluids. 1–7.

[10] Shitu, A., Izhar, S., and Tahir, T.M. 2015. Sub-critical water as a green solvent for production of valuable materials from agricultural waste biomass: A review of recent work. Global Journal of environmental science and management. 1(3): 255-264.

[11] Pawlowska, A.M., Camangi, F., and Braca , A. 2010. Quali-quantitative analysis of flavonoids of Cornus mas L. (Cornaceae) fruits. Journal of Food Chemistry. 119: 1257–1261.

[12] Narimani-Rad, M., Zendehdel, M., Mesgari Abbasi, M., Abdollahi, B., and Lotfi, A. 2013. Cornelian cherry (*Cornus mas L.*) extract affects glycemic status in wistar rats. Journal

of bulletin of environment, pharmacology and life sciences. 2(9): 48-50.

[13] Yousfbeyk, F., Esmaiili, T., Pashna, Z., Hozori, Z., Ghohari, A.R., Ostad, S.N., and Amin, Gh.R. 2014. Antioxidant activity, total phenol and total anthocyanin contents of *Cornus sanguinea* L subsp *australis.* (C.A. Mey.) Jáv. Journal of medicinal plants. 13(49): 69-74.

[14] Delfanian, M., Esmaeilzadeh Kenari, R., and Sahari, M.A. 2015. Influence of extraction techniques on antioxidant properties and bioactive compounds of loquat fruit (*Eriobotrya japonica* Lindl.) skin and pulp extracts. Journal of Food Science & Nutrition. 3(3): 179-187.

[15] Hassas-Roudsari, M., Chang, P.R., Pegg, R.B., and Tyler, R.T. 2009. Antioxidant capacity of bioactives extracted from canola meal by subcritical water, ethanolic and hot water extraction. Journal of food chemistry. 114: 717–726.

[16] Esmaeilzadeh Kenari, R., Mohsenzadeh, F., and Raftani Amiri, Z. 2014. Antioxidant activity and total phenolic compounds of Dezful sesame cake extracts obtained by classical and ultrasound-assisted extraction methods. Journal of food science & nutrition. 2(4): 426–435.

[17] Farhoosh, R., Golmovahhed, G.A., and Khodaparast, M.H.H. 2007. Antioxidant activity of various extracts of old tea leaves and black tea wastes (Camellia sinensis L.). Journal of Food chemistry. 100: 231–236.

[18] Hassim, N., Markom, M., Anuar, N., Dewi, KH., Baharum, S.N., and Noor, N.M. 2015. Antioxidant and antibacterial assays on *Polygonum minus* extracts: different extraction methods. Journal of chemical engineering. 1-10.

[19] Pereira, C. G., Marquis, M. O. M., Barreto, A. S., Siani, A. C., Fernandes, E. C., and Meireles, M.A.A. 2004. Extraction of indole alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis* using supercritical CO2 +Ethanol: an evaluation of the process variables and the raw material origin. Journal of Supercritical Fluids. 30: 51-56.

[20] Rangsriwong, P., Rangkadilok, N., Satayavivad, J., Goto, M., and Shotipruk, A. 2009. Subcritical water extraction of polyphenolic compounds from *Terminalia chebula* Retz. Fruits. Journal of Separation and Purification Technology. 66: 51–56.

[21] Tunchaiyaphum, S., Eshtiaghi, M.N., and Yoswathana, N. 2013. Extraction of bioactive compounds from mango peels using green technology. Journal of Chemical Engineering and Applications. 4(4): 194-198.

[22] Jin-wei, L., Shao-dong, D., and Xiao-lin, D. 2005. Comparison of antioxidant capacities of extracts from five cultivars of chinese jujube. Journal of Process Biochemistry. 40: 3607–3613.

[23] Barchan, A., Bakkali, M., Arakrak, A., Pagán, R., and Laglaoui, A. 2014. The effects of solvents polarity on the phenolic contents and antioxidant activity of three *Mentha* species extracts. Journal of current microbiology and applied sciences. 3(11): 399-412.

[24] Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., and Saura-Calixto, F. 1999. Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. Journal of food research international. 32: 407-412.

[25] Ivanović, J., Đilas, S., Jadranin, M., Vajs, V., Babović, N., Petrović, S., and Žižović, I. 2009. Supercritical carbon dioxide extraction of antioxidants from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and sage (*Salvia officinalis* L.). Journal of the Serbian chemical society. 74(7): 717–732.

[26] Fidrianny, I., Rahmiyani, I., and Ruslan Wirasutisna, k. 2013. Antioxidant capacities from various leaves extracts of four varieties mangoes using DPPH, ABTS assays and correlation with total phenolic, flavonoid, carotenoid. Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 5(4): 189-194.

[27] Do, Q.D., Angkawijaya, A.E., Tran-Nguyen, P.L., Huynh, L.H., Soetaredjo, F.E., Ismadji, S., and Ju, Y.H. 2014. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoids content, and antioxidant activity of Limnophila aromatica. Journal of Food and drug analysis. 22: 296-302.

[28] Srinivasahan, V., and Durairaj, B. 2014. Antioxidant and free radical scavenging effect of *Morinda citrifolia* fruit extract. Journal of

Pharmacy and Pharmaceutical sciences. 6(4): 55-59.

[29] Rice-Evans, C., Miller, N., and Paganga, G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. Journal of trends in plant science. 2(4): 152–159.

[30] Massias,A., Boisard, S, Baccaunaud, M., Calderon, F.L., and Subra-Paternault, P. 2015. Recovery of phenolics from apple peels using CO2+ ethanolextraction: Kinetics and antioxidant activity of extracts. Journal of supercritical fluids. 98: 172–182.

[31] Ogunlana, O.E., Ogunlana, O., and Farombi, O.E. 2008. Morinda Lucida: antioxidant and reducing activities of crude methanolic stem bark extract. Journal of advances in natural and applied sciences. 2(2): 49-54

Comparison of the effect of supercritical carbon dioxide and subcritical water methods on the phenolic content and antioxidant properties of *Cornus mas* L. fruit

Gillani, F. [1], Raftani Amiri, Z. [2*], Esmaeilzade Kenari, R.[3]

1. M. Sc. Student, Department of Food Science and Technology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
2. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
3. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

(Received: 2016/04/27 Accepted:2016/06/03)

Cornus mas L. besides edible consumption, is a medicinal plant with different functional aspects in traditional medicine. In this study, antioxidant property and total phenolic content of *Cornus mas* L. extract obtained from supercritical carbon dioxide and subcritical water extraction methods were evaluated. The total phenolic content of the extracts was determined using the Folin-ciocalteau method. Antioxidant activity of the extracts was investigated by tests of trapping free radicals DPPH and reducing power assay. *Cornus mas* L. extract obtained by supercritical carbon dioxide method showed the highest amount of phenolic compounds of 132.97 mg gallic acid per gram of dried extract and also the highest antioxidant activity. Activity related to the concentration of phenolic compounds in the case of anti-radical effect and reducing power was observed in all extracts. Thus, *Cornus mas* L. can be due to the presence of bioactive compounds such as phenolic compounds, as a good source for providing natural antioxidants recommended.

Key words: Subcritical water, *Cornus mas* L., Antioxidant activity, Supercritical carbon dioxide

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