بررسی فعالیت ضداکسایشی عصاره‌های مختلف میوه کنار و مقایسه فعالیت ضداکسایشی آن با ضداکساینده مصنوعی BHT در روغن سویا

عباس نمدی‌پور[۱]، علیرضا صادقی ماهونک[۲*]، محمد قربانی[۳]

۱- کارشناس ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۲- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۳- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

(تاریخ دریافت: ۹۵/۱۲/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۵/۰۳)

چکیده

میوه‌ی کنار دارای خصوصیات تغذیه‌ای بسیار مفیدی می‌باشد و برای درمان بیماری‌های مختلفی در طب سنتی مورد استفاده قرار می‌گیرد. هدف از مطالعه حاضر بررسی ویژگی‌های ضداکسایشی عصاره‌های اتانولی، متانولی و آبی میوه کنار (*Ziziphus spina-christi*) در سه غلظت ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ PPM و مقایسه بهترین عصاره با ضداکسایش مصنوعی BHT با غلظت ۲۰۰ PPM در روغن سویا بود. عصاره اتانولی کنار در هر سه غلظت ۶۰۰ ، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ PPM در تمام آزمون‌های آنتی‌اکسیدان (DPPH، ظرفیت ضداکسایشی کل و قدرت احیاکنندگی اتم آهن) به صورت معناداری عملکرد بهتری نسبت به عصاره‌های متانولی و آبی داشت. عصاره متانولی نیز نسبت به عصاره آبی در تمام آزمون‌ها به صورت معناداری عملکرد بهتری از خود نشان داد. در مقایسه با BHT در دو آزمون قدرت مهار کنندگی و ظرفیت ضداکسایشی کل، غلظت ۱۰۰۰ PPM دو عصاره اتانولی و متانولی و در آزمون قدرت احیا کنندگی فقط غلظت ۱۰۰۰ PPM عصاره اتانولی عملکرد بهتری در مقایسه با BHT داشتند. در جلوگیری از اکسایش روغن سویا (آزمون پراکسید و TBA) عصاره منتخب از آزمون‌های ضداکسایشی(اتانولی) در دو غلظت ۸۰۰ و ۱۰۰۰ PPM به صورت معنی‌داری عملکرد بهتری نسبت به BHT داشت و در غلظت ۶۰۰ PPM اثر این عصاره از BHT به صورت معنی‌داری ضعیف‌تر بود. نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره اتانولی کنار دارای بیشترین قدرت ضداکسایشی می‌باشد و در غلظت‌های بالا توان رقابت با غلظت‌های مورد استفاده BHT (۲۰۰ PPM) در مواد غذایی را دارد و برای معرفی به عنوان جایگزین ضداکساینده مصنوعی BHT مناسب می‌باشد.

کلید واژگان: ضداکسایش، میوه کنار، بوتیلیتد هیدروکسی تولوئن، اندیس پراکسید، عدد تیوباربیتوریک اسید

* مسئول مکاتبات: sadeghiaz@yahoo.com

۱- مقدمه

اکسایش عامل اصلی فساد چربی‌ها و روغن‌ها محسوب می‌شود. به همین دلیل ضداکسایندهها برای جلوگیری از بد طعمی ناشی ازاکسایش به این محصولات اضافه می‌شوند. بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول (BHA)[1]، بوتیلیتد هیدروکسی تولوئن (BHT)[2] و ترشیری بوتیل هیدروکینون (TBHQ)[3] از مهمترین ضداکسایندهای فنلی مصنوعی هستند[۱]. این ترکیبات فرار بوده و برای پایداری مواد غذایی مطلوب نیستند و برای سلامتی انسان مضرند [۲]. به همین دلیل استفاده از ضداکسایندههای طبیعی به جای مصنوعی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. از بین ترکیبات ضداکسایندهٔ گیاهی، ترکیبات فنلی توزیع گستردهای در بسیاری گیاهان دارند. ویژگی‌های ضداکسایشی ترکیبات فنلی عمدتا ناشی از قدرت احیاءکنندگی و ساختار شیمیایی آن‌هاست که آن‌ها را قادر به خنثی کردن رادیکال‌های آزاد، تشکیل کمپلکس با یون‌های فلزی و خاموش کردن مولکول‌های اکسیژن یگانه و سه گانه می‌سازد. ترکیبات فنلی از طریق اهدای الکترون به رادیکال‌های آزاد، واکنش‌های اکسایش چربی را مهار می‌کنند [۳].

درخت کنار با نام علمی *زیزیفوس اسپینا کریستی*[4] درختی همیشه سبز، تیغ‌دار و مرتفع با برگ‌های کوچک، قلبی شکل و کشیده است که به تیره عنابیان تعلق داشته و با حدود ۱۰۰ نوع گونه مختلف در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری پراکنده است[٤]. این درخت و میوه آن در جنوب ایران کنار نامیده می‌شود و نام‌های دیگر آن سدر، سدره، منبل داوود، سنجد گرجی، نیم، ضال، ببر و شجره النبق است [۵]. استفاده از میوه کنار به صورت تازه و خشک شده قدمت زیادی در طب سنتی داشته و به عنوان تسکین دهنده دردهای معده و دندان، تب‌بر، ضداسهال و مادهای قابض کاربرد داشته است [٤]. امروزه نیز مشاهده گردیده که عصاره‌های مختلف استخراج شده از میوه، هسته و برگ کنار به دلیل داشتن ترکیبات ترپنوئیدی، آلکالوئیدی، فلاونوئیدی و پلی‌فنولی دارای خاصیت ضداکسایشی، ضد ویروسی، ضد باکتریایی و ضد قارچی می‌باشند [٦]. میوه کنار به دلیل داشتن ترکیبات فنلی فراوان یک ترکیب زیست فعال محسوب می‌شود و این میوه با داشتن خاصیت ضداکسایشی بسیار بالا قابل رقابت با ضداکسایندههای مصنوعی نظیر TBHQ بوده و هیچ گونه عوارضی بر عملکرد کبد و کلیه ندارد [۷]. تانمای کومار و همکاران (۲۰۱۱) به بررسی فعالیت ضداکسایشی واریته‌های مختلفی ازکنار هندی پرداختند؛ نتایج حاکی از آن بود که کنار هندی منبع بسیار خوبی از آسکوربیک اسید (۹۹/٤۹-۱۹/٥٤ میلی‌گرم در هر ۱۰۰ گرم وزن خشک ماده) و فنل کل (۳۲۸/٦-۱۷۲ میلی‌گرم معادل اسید گالیک در هر ۱۰۰ گرم وزن خشک ماده) می‌باشد. قدرت احیا کنندگی اتم آهن نیز در محدوده ۱۳/۹۳-۷/٤۱ بود [۸]. دلفانیان و همکاران (۲۰۱۵) با بررسی عصاره‌های میوه‌ی کنار استخراج شده با روش‌های مختلف، مقادیر ترکیبات فنلی را، ۲۳٥۲/٥-۱۳۲۱/۹۸ میلی‌گرم معادل اسید گالیک در هر ۱۰۰ گرم وزن خشک ماده گزارش نمودند [۹]. تاکنون پژوهشی در زمینه خواص ضداکسایشی میوه کنار استان خوزستان انجام نشده است لذا هدف از این مطالعه بررسی خصوصیات ضداکسایشی عصاره‌های اتانولی، متانولی و آبی میوه‌ی کنار استان خوزستان بود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

میوه کنار مورد استفاده در این تحقیق از درختان شهر شوش در فروردین ۱۳۹٤ جمع آوری و پس از انتقال به آزمایشگاه و پوست گیری و جدا نمودن هسته از آن، به منظور خشک شدن در دمای محیط قرار گرفتند. خشک کردن نهایی (رسیدن به رطوبت نهایی۱۵٪) در آون آزمایشگاهی به مدت ٤ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد انجام پذیرفت و سپس با آسیاب آزمایشگاهی پودر و برای تولید پودری یکنواخت از الک با قطر منافذ یک میلیمتر عبور داده شد[۱۰].

۲-۲-روش‌ها

۲-۲-۱- استخراج عصاره

بر اساس آزمون‌های اولیه مقدار ۵۰ گرم از پودر نمونه مورد آزمایش با یک لیتر آب دوبار تقطیر، اتانول ۸۰ درصد و متانول ۸۰ درصد مخلوط گردید و مخلوط حاصل به مدت ۳ دقیقه در دستگاه فراصوت با توان ۳۸۰ وات در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد همزده شد تا عمل استخراج عصاره صورت گیرد. عصاره حاصل توسط کاغذ واتمن شماره ٤ فیلتر شد. سپس عصاره

1. Butylated hydroxyanisole
2. Butylated hydroxytoluene
3. Tert-butyl hyroquinone
4. *Ziziphus spina-christi*

توسط دستگاه روتاری اواپراتور تحت خلاء IKA-RV05 (Basic ساخت آلمان) در دمای ٤٠ درجه سانتی‌گراد تغلیظ شد و در ادامه توسط دستگاه خشک کن انجمادی Operun-FDB550) ساخت کره جنوبی) خشک شد و پودر خشک حاصل از نمونه تا زمان آزمون بعدی در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد [۱۱].

۲-۲-۲- اندازه‌گیری ترکیبات فنلی کل عصاره‌ها

میزان ترکیبات فنلی کل موجود در عصارها به روش فولین سیوکالتیو اندازه‌گیری شد. ۱ میلی‌لیتر عصاره با ۲/۵ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتو (۱:۱۰) رقیق شده ترکیب شد. پس از گذشت ۸ دقیقه ۵ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷/۵ درصد به آن اضافه شد. و بعد به حجم ۵۰ میلی‌لیتر با آب مقطر رسانده شد.ترکیب حاصله به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار داده شده و جذب نمونه‌ها در طول موج ۷٦۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (ساخت انگلستان، پی جی اینسترومنت[1] مدل T80) تعیین شد. مقادیر فنل کل عصاره‌ها با توجه به معادله خط حاصل از نمودار استاندارد (رابطه ۱)، به صورت معادل گالیک اسید از بیان شد [۱۲]:

$$A = 0/0011\,C + 0/0196, \quad R^2 = 0/9949$$

A جذب نمونه در ۷٦۵ نانومتر

و C غلظت معادل اسید گالیک (میکروگرم بر میلی لیتر) است.

۲-۲-۳- آزمون مهار رادیکال آزاد DPPH

توانایی مهار رادیکال آزاد توسط عصاره‌ها بر اساس روش عربشاهی و همکاران (۲۰۰۷) انجام شد [11]. ۳ میلی‌لیتر از نمونه عصاره تهیه شده به ۱ میلی‌لیتر محلول متانولی ۱ میلی-مولار DPPH[2] اضافه شد. برای نمونه شاهد از ۱ میلی‌لیتر محلول DPPH به همراه ۳ میلی‌لیتر حلال استفاده شد. نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط و تاریکی قرار گرفتند. جذب نمونه‌ها در ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری و درصد مهار رادیکال از رابطه ۲ محاسبه شد:

= به دام‌اندازی رادیکال آزاد (%)

$$\frac{\text{جذب نمونه شاهد} - \text{جذب نمونه}}{\text{جذب نمونه شاهد}} \times 100$$

۲-۲-٤- ظرفیت ضداکسایشی کل

ظرفیت ضداکسایشی کل عصاره‌های مورد آزمون به روش عربشاهی و عروج (۲۰۰۷) انجام شد [۱۱]. اساس این آزمون تبدیل مولیبدات چهار ظرفیتی به مولیبدات سه ظرفیتی توسط نمونه و ایجاد کمپلکس سبز رنگ فسفات مولیبدات در محیط اسیدی است. ۰/۱ میلی‌لیتر محلول نمونه با ۱ میلی‌لیتر محلول معرف (سولفوریک اسید ۰/٦ مولار، سدیم فسفات ۲۸ میلی مولار و آمونیوم مولیبدات ٤ میلی‌مولار) ترکیب شده و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. برای نمونه شاهد به جای عصاره از حجم برابر حلال استفاده شد. جذب نمونه‌ها پس از سرد شدن در ٦۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. جذب بیشتر نشان‌دهنده ظرفیت ضداکسایشی کل بیشتر است.

۲-۲-۵- قدرت احیا کنندگی

این آزمون برای بررسی قدرت احیا اتم آهن سه ظرفیتی توسط عصاره‌ها و به روش عربشاهی و عروج (۲۰۰۷) انجام شد [۱۱]. ۱ میلی‌لیتر از محلول نمونه با ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات (۰/۲ مولار، PH ٦/٦) و ۲/۵ میلی‌لیتر پتاسیم فری سیانید ($10\,g\,l^{-1}$) ترکیب شد و به مدت ۳۰ دقیقه در ۵۰ درجه سانتی‌گراد حرارت دید. سپس ۲/۵ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید ($100\,g\,l^{-1}$) اضافه شده و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. نهایتا ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول سطحی با ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر کلرید آهن ($1\,g\,l^{-1}$) ترکیب شده و جذب نمونه‌ها در ۷۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. جذب بیشتر نشانگر قدرت احیا کنندگی بیشتر است.

۲-۲-٦- اندازه‌گیری فعالیت ضداکسایشی در روغن سویا

عصاره اتانولی در سه سطح غلظت ٦۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ PPM و ضداکساینده مصنوعی در سطح مجاز ۲۰۰ PPM به روغن سویا بدون ضداکساینده اضافه شدند. مقداری از روغن سویا (بدون هیچ‌گونه افزودنی) نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. ظروف مورد استفاده در این بررسی، کدر و با دهانه باز بودند. دوره‌ی آزمایش ۱٦ روز گرمخانه‌گذاری در دمای ٦۳ درجه سانتی‌گراد بود و طی این مدت، میزان پیشرفت اکسایش روغن در روزهای ٤، ۸، ۱۲ و ۱٦ با اندازه‌گیری عددهای پراکسید و TBA تعیین گردید.

1. P G Instrument
2. 2,2'-diphenyl-1-picryl hydrazyl

۲-۲-٦-۱- ارزیابی عدد پراکسید

این آزمون برای اندازه‌گیری محصولات اولیه اکسایش روغن بر اساس روش (۲۰۰۳) AOCS[1] انجام شد [۱۳]. در این آزمون، هیدروپراکسیدها، ید را به یداین اکسید تبدیل می‌نمایند که توسط تیتراسیون با سدیم تیوسولفات تعیین می‌شود. ۵ گرم روغن سویا توزین شده و ۳۰ میلی‌لیتر محلول اسید استیک-کلروفرم (سه حجم اسید استیک و دو حجم کلروفرم) به آن افزوده شد. پس از هم زدن و حل شدن روغن در حلال، ۰/۵ میلی‌لیتر محلول اشباع یدید پتاسیم به آن اضافه شده و به آرامی مخلوط شد. محلول حاصل به مدت ۱ دقیقه در تاریکی و دمای محیط قرار گرفته و پس از خروج از تاریکی ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه شده و با تیوسولفات سدیم ۰/۰۱ نرمال تیتر شد. با از بین رفتن رنگ زرد محلول، ۱ میلی‌لیتر شناساگر نشاسته اضافه شده و تیتراسیون تا از بین رفتن رنگ آبی ادامه یافت. عدد پراکسید نمونه‌ها با استفاده از رابطه ۳ محاسبه شد:

$$PV = \frac{(V2 - V1) \times N \times 1000}{M} \quad (۳)$$

V_2: حجم تیتر در نمونه

V_1: حجم تیتر در شاهد

M: گرم وزن نمونه

N: نرمالیته محلول سدیم تیوسولفات

PV: عدد پراکسید

۲-۲-٦-۲- ارزیابی عدد TBA در روغن سویا

این آزمون برای اندازه‌گیری محصولات ثانویه اکسایش روغن بر اساس روش (۲۰۰۹) AOCS انجام شد [14]. ۲۰۰ میلی‌گرم روغن سویا توزین و ۲۵ میلی‌لیتر حلال بوتانول به آن افزوده شد. پس از هم‌زدن و حل شدن روغن در حلال، ۵ میلی‌لیتر از محلول برداشته و به یک لوله آزمایش اضافه شد. سپس ۵ میلی‌لیتر معرف (تیوباربیتوریک اسید+بوتانول) به آن اضافه شد. پس از هم زدن، لوله‌های آزمایش به مدت ۲ ساعت در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد درون حمام آب گرم قرار داده شدند. پس از خروج از حمام، لوله‌ها درون دسیکاتور قرار داده شدند تا به دمای محیط رسیدند. جذب نمونه‌ها در ۵۳۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. عدد TBA نمونه‌ها با استفاده از رابطه ٤ محاسبه شد:

$$TBA = \frac{50 \times A}{M} \quad (٤)$$

A :جذب نمونه

M: وزن نمونه بر حسب میلی‌گرم

۲-۲-۸- تجزیه و تحلیل آماری

آزمون‌ها در سه تکرار و در قالب طرح کاملا تصادفی و به روش آزمون فاکتوریل، آنالیز واریانس ANOVA و مقایسه میانگین دانکن در سطح احتمال ۵ درصد ($p<۰/۰۵$) انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم افزار Portable 9.1.3 SAS و رسم نمودارها با نرم‌افزار Office Excel 2010 Microsoft انجام شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱-ارزیابی مقدار کل ترکیبات فنلی

مقدار کل ترکیبات فنولی عصاره‌های مختلف در جدول ۱ آمده است. با توجه به نتایج واریانس، اثر حلال بر میزان ترکیبات فنلی در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود. در بین حلال‌ها، بیشترین و کمترین میزان استخراج به ترتیب مربوط به عصاره اتانولی (۵۵/٤۸ میلی‌گرم معادل اسید گالیک در گرم عصاره) و عصاره آبی (۵۰/۲۹ میلی‌گرم معادل اسید گالیک در گرم عصاره) بود (جدول ۱). دلیل قدرت کمتر آب نسبت به متانول و اتانول این است که آب یک محیط کاملا قطبی ایجاد می‌کند در نتیجه ترکیبات فنلی با درجه قطبیت پایین کمتر استخراج می‌شوند. علاوه بر این عصاره آبی حاوی مقادیر زیادی از ناخالصی‌هایی همچون پروتئین‌ها، قندهای محلول و اسیدهای آلی می‌باشد که می‌توانند در تشخیص و تعیین مقدار ترکیبات فنلی تداخل ایجاد نمایند [۱۵]. در حالی‌که اتانول و متانول در ترکیب با آب باعث افزایش توانایی در استخراج ترکیبات فنلی می‌شوند [۱٦]. قطبیت حلال‌های مورد استفاده نقش کلیدی را در افزایش حلالیت این ترکیبات بازی می‌کند. محققین وجود اختلاف بین عصاره‌های مختلف را به وجود تفاوت در قطبیت حلال‌های مورد استفاده مربوط می‌دانند. استخراج ترکیبات ضداکسایشی از مواد گیاهی به حلالیت این ترکیبات در حلال‌های مختلف بستگی دارد [۱۷]. در نتیجه دلیل قدرت کمتر آب نسبت به متانول و متانول نسبت به اتانول توجیه می‌شود. نتایج این پژوهش با نتایج دلفانیان و همکاران (۲۰۱٦) که بر روی پایداری حرارتی روغن سویا در حضور عصاره کنار کار

1. American Oil Chemical Society

کرده بودند مشابه بود؛ چون این پژوهشگران نیز بهترین حلال را برای استخراج ترکیبات فنلی کنار، ترکیب اتانول و آب معرفی کرده بودند [۱۸].

Table 1 Comparison of phenolic compounds in different extracts of the zizyphus fruit

extract	Total phenolics content (mg Gallic acid/g of dry matter)
Ethanolic extract(%80)	$55/48^{a} \pm 0/7$
Methanolic extract (%80)	$52/94^{b} \pm 0/9$
watery extract	$50/29^{c} \pm 0/29$

different letters are significantly different at $P < 0.05$.

ترکیبات فنلی، گروه مهمی از ترکیبات گیاهی به عنوان متابولیت‌های ثانویه را تشکیل می‌دهند که در پاسخ به استرس‌های محیطی ایجاد می‌شوند. این ترکیبات به دلیل داشتن گروه‌های هیدروکسیل، توانایی خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد را داشته و می‌توانند به عنوان دهنده الکترون یا هیدروژن عمل نمایند. عوامل متعددی مقدار ترکیبات فنولی موجود در بافت‌های گیاهی را تحت تاثیر قرار می‌دهند که از آن جمله می‌توان به فاکتورهای ژنتیکی، میزان تابش نور خورشید، شرایط خاک، درجه رسیدگی در زمان برداشت، شرایط محیطی و آب و هوایی، عملیات پس از برداشت و شرایط نگه داری اشاره کرد. علاوه بر این درجه قطبیت حلال‌های مختلف میزان استخراج ترکیبات پلی‌فنولی را تحت تاثیر قرار می‌دهد [۱۹].

۳-۲- مهار رادیکال آزادDPPH

جدول ۲ نشان دهنده توانایی ضداکسایندگی مصنوعی BHT و غلظت‌های مختلف عصاره‌های کنار استخراج شده با حلال‌های مختلف در مهار رادیکال آزاد DPPH است. نتایج آنالیز واریانس در این تحقیق نشان داد که در هر سه غلظت، به ترتیب عصاره‌های اتانولی، متانولی و آبی دارای بیشترین قدرت مهار کنندگی می‌باشند. در تمام حالات نیز عصاره اتانولی با غلظت ۱۰۰۰ PPM و عصاره آبی با غلظت ۶۰۰ PPM به ترتیب دارای بیشترین و کمترین قدرت مهارکنندگی می‌باشند. از تمام حالات فقط غلظت ۱۰۰۰ PPM عصاره‌های متانولی و اتانولی دارای قدرت مهارکنندگی بیشتری از ضداکسایندگی مصنوعی با غلظت ۲۰۰ PPM بودند. عصاره آبی با غلظت ۱۰۰۰ PPM دارای قدرت مهارکنندگی تقریبا یکسانی با BHT بود و بقیه عصاره‌ها قدرت مهار کنندگی کمتری از BHTداشتند. علاوه بر این، داده‌ها حاکی از آن بود که غلظت عصاره تاثیر معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) بر میزان مهار رادیکال‌های آزاد دارد و با افزایش غلظت توانایی همه عصاره‌ها در مهار رادیکال آزاد افزایش یافت. نتایج تحقیق حاضر با نتایج آلتمن و همکاران (۲۰۰۹) [۲۰] و شوکلا و همکاران (۲۰۰۹) [۲۱] همخوانی داشت. این محققین گزارش نمودند که با افزایش غلظت اثر مهارکنندگی شدت می‌یابد.

Table 2 average of DPPH radical scavenging activities of BHT and different concentrations of extracts of the zizyphus fruit

Treatment	BHT 200 ppm	Zizyphus 600 ppm	Zizyphus 800 ppm	Zizyphus 1000 ppm
Ethanolic extract (%80)		$38/75^{a} \pm 1/5$	$59/38^{a} \pm 0/1$	$86/87^{a} \pm 0/44$
Methanolic extract (%80)		$33/27^{b} \pm 0/8$	$53/14^{b} \pm 1/8$	$80/17^{b} \pm 0/38$
watery extract		$29/88^{c} \pm 1/1$	$50/87^{c} \pm 0/7$	$75/64^{c} \pm 0/67$
Ethanolic extract	75/67±0/86			

different letters are significantly different at $P < 0.05$.

همانطور که درجدول ۲ مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت عصاره، میزان مهار رادیکال‌های آزاد نیز افزایش یافته است، که دلیل آن این است که با افزایش غلظت عصاره‌ها مقدار ترکیبات فنلی هم زیاد می‌شود و در نتیجه به دلیل افزایش در تعداد گروه‌های هیدروکسیل موجود در محیط واکنش، قدرت مهار کنندگی عصاره به دلیل افزایش احتمال هیدروژن دهی به رادیکال‌های آزاد افزایش می‌یابد[۲۲] که این امر با نتایج سان و همکاران (۲۰۱۱) همخوانی داشت [۲۳]. فعالیت ضداکسایشی مواد فیتوشیمیایی موجود در گیاهان به‌دلیل ممانعت از تشکیل یا مهار رادیکال آزاد، احیا کردن این ترکیبات و هچنین چلاته کردن فلزات می‌باشد [۲۴].

۳-۳- ظرفیت ضداکسایشی کل

جدول ۳ نشان دهنده ظرفیت ضد اکسایشی کل ضداکسایش مصنوعی BHT و غلظت‌های مختلف عصاره‌های کنار استخراج شده با حلال‌های مختلف است. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که اختلاف معنی داری بین ظرفیت ضداکسایشی کل عصاره‌ها در هر سه غلظت مورد آزمون وجود دارد. به طوری‌که در هر سه غلظت ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ PPM به ترتیب عصاره‌های اتانولی، متانولی و آبی دارای بیشترین ظرفیت ضداکسایشی بودند. مقایسه تمام حالات نیز نشان دهنده این بود که عصاره اتانولی با غلظت ۱۰۰۰ PPM و عصاره آبی با غلظت ۶۰۰ PPM به ترتیب دارای بیشترین و کمترین ظرفیت ضداکسایشی هستند. در ظرفیت ضد اکسایشی کل نیز فقط غلظت ۱۰۰۰ PPM عصاره‌های متانولی و اتانولی دارای ظرفیت ضد اکسایشی کل بیشتری از ضداکساینده مصنوعی با غلظت ۲۰۰ PPM بودند. عصاره آبی با غلظت ۱۰۰۰ PPM دارای ظرفیت ضد اکسایشی کل تقریبا یکسانی با BHT بود و بقیه عصاره‌ها ظرفیت ضد اکسایشی کل کمتری از ضداکساینده مصنوعی داشتند.

Table 3 average of total antioxidant capacity of BHT and Different concentrations of extracts of the zizyphus fruit

Treatment	BHT 200 ppm	Zizyphus 600 ppm	Zizyphus 800 ppm	Zizyphus 1000 ppm
Ethanolic extract (%80)		$0/62^{a} \pm 0/05$	$0/75^{a} \pm 0/02$	$0/97^{a} \pm 0/04$
Methanolic extract (%80)		$0/57^{b} \pm 0/08$	$0/71^{b} \pm 0/07$	$0/9^{b} \pm 0/02$
watery extract		$0/5^{c} \pm 0/01$	$0/66^{c} \pm 0/01$	$0/85^{c} \pm 0/01$
Ethanolic extract	$0/84 \pm 0/02$			

different letters are significantly different at $P < 0.05$.

همانطور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت عصاره در هر سه حلال، میزان ظرفیت ضد اکسایشی کل نیز افزایش یافته است که با نتایج عربشاهی و عروج (۲۰۰۷) [11] همخوانی داشت. این نتایج بیان کننده حضور ترکیبات ضداکسایشی هیدروفیل و لیپوفیل در عصاره کنار می‌باشد. ترکیبات فنلی و آنتوسیانین‌ها ترکیبات ضداکسایشی اصلی در بخش هیدروفیلی عصاره و کارتنوئیدها و توکوفرول‌ها ترکیبات ضداکسایشی اصلی در قسمت لیپوفیلی عصاره می‌باشند.

۳-٤- قدرت احیا کنندگی

جدول ٤ نشان دهنده قدرت احیا کنندگی اتم آهن ۳ ظرفیتی توسط ضداکساینده مصنوعی BHT و غلظت‌های مختلف عصاره‌های کنار استخراج شده با حلال های اتانول، متانول و آب است. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که اختلاف معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) بین قدرت احیاکنندگی عصاره‌های استخراج شده با حلال‌های مختلف در هر سه غلظت وجود دارد. به طوری‌که در هر سه غلظت ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ PPM به ترتیب عصاره‌های اتانولی، متانولی و آبی دارای بیشترین قدرت احیاکنندگی بودند. مقایسه تمام حالات نیز نشان دهنده این بود که عصاره اتانولی با غلظت ۱۰۰۰ PPM و عصاره آبی با غلظت ۶۰۰ PPM به ترتیب دارای بیشترین و کمترین قدرت احیاکنندگی هستند. در مقایسه با BHT فقط غلظت ۱۰۰۰ PPM عصاره اتانولی دارای قدرت احیا کنندگی بالاتری از ضداکساینده مصنوعی با غلظت ۲۰۰ PPM بود و بقیه عصاره‌ها قدرت احیا کنندگی کمتری از BHT داشتند.

Table 4 average of reducing power of BHT and Different concentrations of extracts of the zizyphus fruit

Treatment	BHT 200 ppm	Zizyphus 600 ppm	Zizyphus 800 ppm	Zizyphus 1000 ppm
Ethanolic extract (%80)		$0/4^{a} \pm 0/05$	$0/6^{a} \pm 0/02$	$0/89^{a} \pm 0/04$
Methanolic extract (%80)		$0/31^{b} \pm 0/08$	$0/52^{b} \pm 0/07$	$0/78^{b} \pm 0/02$
watery extract		$0/2^{c} \pm 0/01$	$0/46^{c} \pm 0/01$	$0/67^{c} \pm 0/01$
Ethanolic extract	$0/85 \pm 0/06$			

different letters are significantly different at $P < 0.05$.

همچنان که از جدول ٤ مشهود است با افزایش غلظت عصاره‌ها قدرت احیاکنندگی افزایش یافت، زیرا با افزایش میزان ترکیبات فنلی موجود در عصاره، قدرت احیاکنندگی آن افزایش می‌یابد در نتیجه عصاره قادر خواهد بود با اهداء الکترون یا

اتم‌های هیدروژن واکنش‌های زنجیری تشکیل رادیکال‌های آزاد را شکسته واکسایش چربی را به تاخیر بیندازد [۲٤]. وجود عوامل احیاکننده کلید اصلی قدرت احیاکنندگی است که فعالیت ضداکسایشی را از طریق شکستن واکنش زنجیری رادیکال آزاد انجام می‌دهند [۳]. این نتایج با نتایج به دست آمده توسط سایر محققین مثل سان و همکاران (۲۰۱۱)[۲۳] همخوانی داشت که گواه بر وجود ارتباط بین میزان ترکیبات فنلی عصاره و قدرت احیاءکنندگی آن بود.

۳-۵-ارزیابی عدد پراکسید در روغن سویا

پس از انتخاب بهترین حلال در هر سه غلظت، برای ارزیابی کارایی عصاره منتخب از آزمون‌های ضداکسایشی در جلوگیری از اکسایش روغن سویا در یک دوره ۱٦ روزه، نمونه‌های مربوط به عصاره اتانولی با غلظت‌های ٦۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ PPM در مقایسه با نمونه حاوی BHT و یک نمونه شاهد فاقد ضداکساینده مورد بررسی قرار گرفت. اثر غلظت در مهار اکسایش مشهود بود؛ با افزایش غلظت عصاره‌ها اکسایش بیشتر به تاخیر می‌افتاد. تمام نمونه‌های حاوی ضداکساینده در برابر اکسایش پایدارتر از نمونه شاهد بودند. با افزایش زمان نگهداری نمونه‌های روغن در شرایط اکسایش، میزان عدد پراکسید افزایش یافت. نمونه شاهد بیشترین مقدار (۹۲میلی اکی‌والان بر کیلوگرم روغن) و نمونه حاوی کنار با غلظت ۱۰۰۰ PPM کمترین مقدار (٤٥ میلی اکی‌والان بر کیلوگرم روغن) عدد پراکسید را در همه روزها دارا بودند.

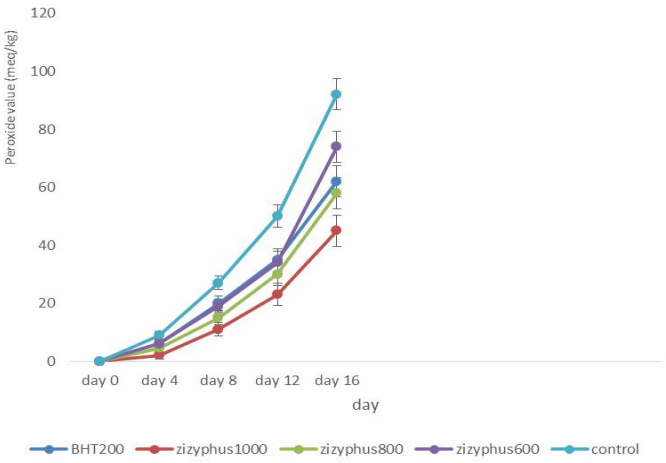

Fig 1 Comparison between peroxide values of treatment contains extract and synthetic antioxidant

همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است کنار با غلظت ۸۰۰ PPM نسبت به ضداکساینده مصنوعی BHT در جلوگیری از اکسایش روغن عملکرد بهتری داشت در صورتی که در آزمون‌های ضداکساینده ، BHT اثر بهتری داشت. توجیه آن این است که نوع ترکیب فنلی اهمیت بیشتری نسبت به غلظت آن دارد. همچنین این مطلب نشان می‌دهد که تفاوت در فعالیت ضداکسایشی در روش‌های مختلف (روش فولین سیوکالتیو، سنجش مهار رادیکال آزاد، سنجش فعالیت ضداکسایشی کل، قدرت احیاکنندگی و آزمون پراکسید) به مقدارزیادی به نوع فنل‌های موجود (طبیعت آب‌دوست و آب-گریز) و نسبت آن‌ها وابسته می‌باشد [25]. نتایج این آزمون با نتایج شاکر (۲۰۰٦)[۲٦] و ماریاشیووا (۲۰۰٦) [۲۷] همخوانی داشت.

۳-٦- عدد TBA

عدد پراکسید به تنهایی مشخص کننده اکسایش روغن نمی-باشد؛ لذا عدد TBA (مقدار مالون دی آلدهید موجود در یک کیلوگرم روغن) نیز به منظور مشخص شدن روند تاثیر عصاره-ی کنار افزوده شده در به تاخیر انداختن اکسایش روغن سویا طی روزهای ۰، ٤، ۸، ۱۲، و ۱٦ اندازه‌گیری گردید. در شکل ۲ عدد تیوباربیتوریک اسید نمونه‌ها طی یک دوره زمانی ۱٦ روزه مشاهده می‌شود. افزودن ضداکساینده‌های طبیعی و سنتزی به روغن سبب بروز تغییراتی در عدد تیوباربیتوریک اسید در طی نگهداری آن به مدت ۱٦ روز در ٦۳ درجه سانتی‌گراد گردید. در این دوره زمانی تمامی تیمارها با افزایش مدت زمان ماندگاری در دمای ٦۳ درجه سانتی‌گراد عدد تیوباربیتوریک آن‌ها افزایش یافت تمامی نمونه‌های مورد بررسی عملکرد بسیار بهتری نسبت به نمونه شاهد داشتند و تمامی نمونه‌های حاوی ضداکساینده در برابر اکسایش پایدارتر از نمونه شاهد بودند. نمونه شاهد بیشترین مقدار (۰/۳ میلی‌گرم مالون آلدئید در کیلوگرم روغن) و نمونه حاوی کنار با غلظت ۱۰۰۰ PPM کمترین مقدار (۰/۱۸ میلی‌گرم مالون آلدئید در کیلوگرم روغن) عدد TBA را در همه روزها دارا بودند. در آزمون TBA عصاره منتخب از آزمون های ضداکسایشی (اتانولی) در دو غلظت ۸۰۰ و ۱۰۰۰ PPM به صورت معنی‌داری عملکرد بهتری نسبت به BHT داشت و در غلظت ٦۰۰ PPM اثر این عصاره به صورت معنی‌داری از BHT ضعیفتر بود. در نتایج حاصل از اندازه‌گیری عدد تیوباربیتوریک در فاصله ٤ روز

نشان‌دهنده توانایی نمونه‌های مورد آزمون در جلوگیری از تولید محصولات ثانویه حاصل از اکسایش روغن سویا بود که نشان‌دهنده توانایی این عصاره‌ها در به‌کارگیری به‌عنوان جایگزین BHT بود.

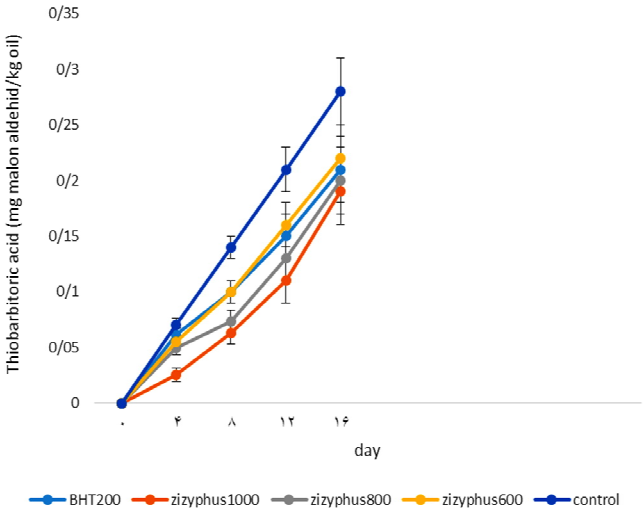

Fig 2 Comparison between Thiobarbituric acid index of treatment contains extract and synthetic antioxidant

با توجه به شکل ۲ می‌توان دریافت که با افزایش غلظت عصاره‌ی کنار، فعالیت ضداکسایشی عصاره‌ی کنار در به تاخیر انداختن تولید محصولات ثانویه روغن سویا به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. نتایج این آزمون با نتایج ضیا و همکاران (۲۰۰٤) که بر روی فعالیت ضداکسایشی عصاره پوست سیب زمینی و اثر آن بر روی پایداری روغن سویا کار کرده بودند مطابقت نداشت زیرا آن‌ها هیچگونه رابطه‌ی خطی میان غلظت عصاره و فعالیت ضداکسایشی مشاهده نکردند [۲۸].

٤- نتیجه گیری

عصاره اتانولی کنار در تمام غلظت‌ها و در تمام آزمون‌ها به شکل معنی‌داری عملکرد بهتری از عصاره متانولی و این عصاره عملکرد بهتری از عصاره آبی داشت. در مقایسه با BHT، در دو آزمون مهار رادیکال آزاد و ظرفیت ضد اکسایشی کل دو عصاره اتانولی و متانولی کنار با غلظت ۱۰۰۰ PPM عملکرد بهتری نسبت به BHT داشتند ولی در آزمون قدرت احیاکنندگی اتم آهن فقط عصاره اتانولی کنار با غلظت ۱۰۰۰ توان رقابت با BHT را داشت. در جلوگیری از اکسایش روغن سویا عصاره منتخب (عصاره اتانولی) مورد آزمون در دو غلظت ۸۰۰ و ۱۰۰۰ PPM عملکرد بهتری از BHT داشت ولی در غلظت ٦۰۰ PPM اثر این عصاره از BHT ضعیفتر بود. نتایج به‌دست آمده در این بررسی نشان داد که یک ترکیب فنلی ممکن است در یک سیستم مدل مثل آزمون قدرت مهارکنندگی، رادیکال آزاد را مهار کند اما در روغن باعث تشدید اکسایش روغن شود و بالعکس. همچنین نشان داده شد که کنار به واسطه داشتن مقادیر زیادی از ترکیبات فنلی دارای پتانسیل ضداکسایشی بالایی است. از دلایل اصلی وجود اختلاف در نتایج تعیین فعالیت ضداکسایشی با روش‌های مختلف می‌توان تفاوت در نحوه آماده سازی، شرایط واکنش، نوع سوبسترا و آزمون را نام برد. بنابراین با در نظر گرفتن اثرات نامطلوب ضداکساینده های مصنوعی بر سلامت انسان، می‌توان زمینه استفاده از آن را به عنوان یک منبع ضداکسایشی جدید در صنایع غذایی و دارویی فراهم نمود.

٥- منابع

[1] XHou, D. 2003. Potential mechanisms of cancer chemoprevention by anthocyanins. Current Molecular Medicine 3, 149–159.

[2] Eskin, N.A.M., Przybylski, R. 2001. Antioxidants and shelf life of foods. In: Food shelf life stability: chemical, biochemical, and microbiological changes. Eds. DS. Robinson and NAM Eskin. CRC Press.

[3] Barreira, J.C.M. Ferreira, I.C.F.R. Oliveira, M.B.P.P. Pereira, J.A. 2008. Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and fruit. Food Chemistry 107(3), 1106-1113.

[4] Nasif, N.M. 2001. Phytoconstituents of *Zizyphus spina-christi* L. fruits and their antimicrobial activity. Food Chemistry 76, 77-81.

[5]Asgarpanah, J., and Haghighat, E. 2012. Phytochemistry and pharmacologic properties of *Ziziphus spina christi* (L.) Willd. African Journal of Pharmacy and Pharmacology 6, 2332-2339.

[6]Youssef, H.E., Khedr, A.A., Mahran, M.Z. 2011. Hepatoprotective activity and antioxidant effects of Napk (*Zizyphus spinachristi* L.) fruits on rats hepatoxicity induced by carbon tetrachloride. Nutrition Science 9, 1-7.

[7]Basuny, A.M., Arafat, S.M., Faraq, H.A. 2013. Utilization from fruits and leaves of Napek (*Zizyphusspina-christi* L.) as a source

of bioactive components. International Journal of Chemical and Natural Science 1,29-36.

[8]Tanmay, K.K., Charanjit, K., Shweta, N., Shweta, W., Seema, J. 2011. Antioxidant activity and phenolic content in genotypes of Indian jujube (*Zizyphus mauritiana Lamk.*). Arabian Journal of Chemistry 2-4

[9]Delfanian, M., Esmaeilzadeh Kenari, R., Sahari, M.A. 2015. Frying stability of sunflower oil blended with jujube(*Ziziphus mauritiana* Lam.) leaf extract. Food Science and Nutrition.

[10] Shariati, A., Pardali, H., Khademian, A., and Kiaie, A. 2010. Antimicrobial activity fruit and date palm extracts against strains of resistat *Staphylococcus aureus*. Food Science and Feeding 7(4),44-47.

[11]Arabshahi, S., and Urooj, A. 2007. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. Food Chemistry 102, 1233-1240.

[12] Capannesi, C., Palchetti, I., Mascini, M., Parenti, A. 2000. Electrochemicalsensor andbiosensor for polyphenols detection in oliveoils. Food Chemistry 71, 553–562.

[13] AOCS. 2003. Official method of analysis. Cd 8-53. American Oil Chemical Society Washington, DC.

[14] AOCS. 2009. Official method of analysis. Cd 19-90. American Oil Chemical Society Washington, DC.

[15] 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) tubers. Separation and Purification Technology 55, 217-225

[16]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.

[17]Javanmardi, J., Stushnoff, C., Locke, E., and Vivanco, J. 2003. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian Ocimum accessions. FoodChemistry 83, 547 – 550.

[18]Faller, A.L.K., and Fialho, E. 2009. The antioxidant capacity and polyphenol content of organic and conventional retail vegetables after domestic coking. Food Research International 42, 210-215.

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

[20] Shukla, S.h., Mehta, A., Bajpai, V.K., Shukla, S. 2009. In vitro antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of Stevia rebaudiana Bert. Food and Chemical Toxicology 47, 2338–2343.

[21] 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.

[22] Sun, L., Zhang, J., Lu, X., Zhang, L., Zhang, Y. 2011. Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves. Food and Chemical Toxicology 49, 2689-2696.

[23] Kumaran, A., Karunakaran, R.J. 2007. In vitro antioxidant ctivities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. Food Science and Technology 40, 344-352.

[24] Amic D, Davidovic-Amic D, Beslo D, Trinajstic N, 2003. Structure– radical scavenging activity relationship of flavonoids. Croatia Chemistry Acta 76: 55-61.

[25] Pereira, J.A., Oliveira, I., Sousa, A., Valento, P., Andrade, P.B., Ferreira, I.C.F.R., Ferreres, F., Bento, A., Seabra, R., Estevinho, L. 2007 .Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: Phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. Food and Chemical Toxicology 45(11), 2287-2295.

[26] Chun, S.S., Vattem, D.A., Lin, Y.T., Shetty, k. 2005. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against Helicobacter pylori. Process Biochemistry 40, 809-816.

[27]Shaker, E.S. 2006. Antioxidant effect of extracts from red grape seed and peel on lipid oxidation in oils of sunflower. J. LWT- Food Science and Technology 39, 883 – 892.

[28] Mariassyova, M. 2006. Antioxidant activity of some herbal extract in rapeseed and sunflower oils. Food and Nutrition Research 45(3), 104-109.

[29]Zia-ur, R., Habib, F., Shah, W.H. 2004. Utilization of potato peels extract as a natural antioxidant in soy bean oil. Food Chemistry 85(2), 215-220.

Evaluation of antioxidant properties of different Zizyphus fruit extracts and comparing their antioxidant activity with BHT in soybean oil

Namadpour , A.[1], Sadeghi Mahoonak, A. R. [2*] , Ghorbani, M. [3]

1. M.Sc., Dept. of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural sciences & Natural Resources, Gorgan, Iran.
2. Associate Professor, Dept. of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Gorgan, Iran.
3. Associate Professor, Dept. of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Gorgan, Iran

(Received: 2017/03/03 Accepted:2017/07/25)

The zizyphus is include nutritional properties very useful, and is used to treatment of various diseases in traditional medicine.The aim of the present study was to evaluate the antioxidant properties of ethanol, methanol and water extracts of Zizyphus fruit in three different concentrations (600, 800 and 1000 ppm) and comparing the best extract with BHT(200 ppm) in soybean oil. Ethanol extract of Zizyphus in three concentrations of 600, 800 and 1000 ppm in all antioxidant tests (DPPH free radical scavenging assay, total antioxidant capacity and reducing power) performed better than methanol and water extracts. Also, methanolic extracts showed significantly better results in all tests compared to water extract. Compared with BHT, concentration of 1000 ppm ethanol and methanol extracts in DPPH and total antioxidant capacity tests, and concentration of 1000 ppm ethanol extract in reducing power test were better than BHT. In the peroxide value and TBA, selected extract of antioxidant (ethanolic extract) in concentrations of 800 and 1000 ppm had a significant ($p<0.05$) higher effect and in concentration of 600 ppm had a significant ($p<0.05$) weaker effect than BHT. The result showed that the zizyphus ethanol extract contain the highest antioxidant power and at high concentrations is comparable with BHT at concentrations used in food (200 ppm), and therefore is appropriate antioxidant to introduce as an alternative to synthetic antioxidant BHT.

Key words: Antioxidant, Butylated hydroxytoluene, peroxide value, Thiobarbituric Acid, zizyphus,

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