تاثیر روش استخراج بر خاصیت آنتی اکسیدانی و برخی متابولیت‌های ثانویه عصاره گیاه اوجی (*Mentha aquatic* L.)

رضا اسماعیل زاده کناری[1*]، مریم اثنی عشری[2]

۱- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۲- دانشجوی دکتری مهندسی علوم و صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

چکیده

با بهبود شرایط زندگی مصرف کنندگان به طور فزاینده‌ای مواد غذایی تهیه شده با مواد نگهدارنده سنتزی را نمی‌پذیرند. در حال حاضر افزایش علاقه در صنعت و جامعه علمی برای گیاهان آروماتیک وجود دارد چراکه آن‌ها حاوی آنتی اکسیدان‌های قوی هستند و در بسیاری موارد خاصیت آنتی اکسیدانی آن‌ها از آنتی اکسیدان‌های سنتزی و طبیعی بالاتر است. گیاه *Mentha aquatique* یا نعنای آبی یگ گیاه معطر و دارویی همه ساله از جنس نعنا است که گروه بزرگ و متنوعی از ترکیبات فنولی را تولید می‌نماید. در این مطالعه عصاره گیاه اوجی *Mentha aquatique* با استفاده از روش اولتراسوند و ماسراسیون (اتانول:آب (۸۰:۲۰)) استخراج شد و با یکدیگر مقایسه شدند. فنول، توکوفرول، فلاونوئید و تانن کل عصاره و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره با آنتی اکسیدان سنتزی TBHQ با استفاده از روش‌های مهار رادیکال آزاد DPPH، بیرنگ شدن بتاکاروتن و آزمون رنسیمت مقایسه شدند. نتایج نشان داد که عصاره تیمار اولتراسوند بیشترین مقدار فنول (۵۱/۹۲mg gallic acid/g extract)، توکوفرول (α- mg ٦/٥٥tocopherol/ g extract)، فلاونوئید (۳۰/۳۳mg quercetin/ g extract) و تانن (۱۰/۲۵mg catechin/ g extract) را داشت. فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها (۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ ppm) با افزایش غلظت عصاره افزایش یافت. در غلظت ۱۰۰۰ ppm اختلاف معنی دار آماری (P<۰/۰۵) بین عصاره‌ها و TBHQ مشاهده نشد. بر اساس نتایج فعالیت آنتی اکسیدانی می‌توان گفت هر دو عصاره اوجی می‌تواند جایگزین مناسبی برای آنتی اکسیدان‌های سنتزی مانند TBHQ باشند و روش استخراج به کمک اولتراسوند به دلیل مصرف حلال و زمان کمتر نسبت به روش ماسراسیون ارجحیت دارد.

کلید واژگان: عصاره اوجی، اکسیداسیون، آنتی اکسیدان، اولتراسوند

*مسئول مکاتبات: Reza_kenari@yahoo.com

۱- مقدمه

اکسایش روغن‌ها یک فرآیند بسیار مخرب است که نقش مهمی در کاهش ارزش تغذیه‌ای غذاهای حاوی روغن بازی می‌کند [۱]. این واکنش مخرب بر روی پارامترهای کیفی روغن (آروما، رنگ و طعم) تاثیر می‌گذارد و بنابراین مناسب مصرف نمی‌باشد [۲]. آنتی اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که در غلظت-های پایین اکسایش را کاهش می‌دهند [۳]. زمانیکه آنتی اکسیدان‌ها به روغن‌های غیر اشباع اضافه می‌شوند، اکسایش روغن‌ها متوقف می‌شود و یا به تاخیر می‌افتد که مرتبط با توانایی آنتی اکسیدان‌ها در مهار رادیکال‌های آزاد است [٤ و ٥]. در کارخانجات مواد غذایی اکسایش روغن‌ها به میزان زیادی با استفاده از آنتی اکسیدان‌های سنتزی کنترل می‌شود زیرا این آنوع آنتی اکسیدان‌ها ارزان و قابل دسترس هستند [٥]. مصرف آنتی اکسیدان‌های سنتزی در حیوانات آزمایشگاهی باعث ایجاد سرطان و مشکلات کبدی شده است. به همین دلیل تقاضای قابل توجهی از طرف کارخانجات مواد غذایی و دارویی جهت استفاده از مشتقات گیاهی به عنوان آنتی اکسیدان‌های غیر سمی در سیستم‌های غذایی مطرح شده است [٦ و ٧]. گیاه اوجی با نام علمی *Mentha aquatique* (معروف به نعنای آبی) گیاه همیشه سبز با خاصیت پزشکی و معطر است [٨]. گیاه اوجی به دلیل دارا بودن مقادیر بالای ترکیبات فنولی یک منبع بالقوه از آنتی اکسیدان‌های طبیعی است [۹ و ۱۰]. این گیاه در نواحی شمالی ایران پراکنش گسترده‌ای دارد و می‌تواند به عنوان منبعی برای آنتی اکسیدان-های طبیعی معرفی گردد [۳]. روش‌های قدیمی استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی از گیاهان استخراج به وسیله حلال و سوکسله هستند که نیاز به مصرف مقادیر بالای حلال و زمان طولانی دارند و بازده استخراج آن‌ها بسیار پایین است. تکنیک-های کارآمد دیگر شامل استخراج به کمک امواج میکروویو [۱۱]، اولتراسوند [۱۲]، آب زیر بحرانی [۱۳] و سیال فوق بحرانی [١٤] است. تا کنون پژوهش‌های متعددی مبنی بر مقایسه روش‌های استخراج بر خصوصیات آنتی اکسیدانی و مقدار ترکیبات موثره عصاره گیاهان انجام شده است که از آن جمله می‌توان به بررسی تاثیر فرآیند اولتراسوند و میکروویو در گیاه گنه گنه [۱٥]، اولتراسوند و روش متداول در گیاه استاتیس [١٦]، اولتراسوند، ماسراسیون و جوشاندن در گیاه پتردن امارجیناتوس [۱۷]، اولتراسوند و ماسراسیون در گل همیشه بهار [۱۸] اشاره نمود. نتایج بررسی در منابع کتابخانه‌ای نشان می‌دهد که تا کنون پژوهش مبنی بر مقایسه دو روش ماسراسیون و استخراج با کمک اولتراسوند این پژوهش با هدف بررسی روش‌های مختلف استخراج بر میزان استخراج ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی، توکوفرول و تانن و همچنین خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره گیاه اوجی انجام شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

گیاه اوجی در فروردین ماه ۱۳۹٤ از حواشی مناطق مرطوب و جنگلی استان مازندران جمع آوری گردید و در آون تحت خلا در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد خشک شدند و سپس با استفاده از آسیاب آزمایشگاهی به طور کامل به پودر تبدیل شدند. پودر حاصله سپس با استفاده از الک با مش ٤۰ عبور داده شد و برای عصاره گیری مورد استفاده قرار گرفت [۱۹]. سایر مواد شیمیایی مورد استفاده دارای درجه تجزیه‌ای بودند و از شرکت مرک آلمان خریداری شدند.

۲-۲-روش ها

۲-۲-۱-استخراج عصاره

۱۰ گرم نمونه پودر شده برگ گیاه اوجی با ترازو توزین شد و در ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری با ۱۰۰ میلی لیتر حلال اتانول-آب (۲۰:۸۰) با نسبت (۱:۱۰) مخلوط شد. سپس به مدت ٤۸ ساعت در شیکر با دور ۱۵۰ rpm قرار داده شد تا عمل استخراج عصاره از گیاه صورت بگیرد. عصاره سپس به کمک کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف شد و حلال اضافی با استفاده از روتاری اواپراتور (٤٥ درجه سانتیگراد) تبخیر شد. عصاره تغلیظ شده سپس با استفاده از خشک کن انجمادی در برودت ۵۰- درجه سانتیگراد و تحت شرایط خلا به پودر تبدیل شد [۱۹]. ۱۰ گرم نمونه پودر شده برگ گیاه اوجی با ترازو توزین شد و در ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری با ۱۰۰ میلی لیتر حلال اتانول-آب (۲۰:۸۰) با نسبت (۱:۱۰) مخلوط شد و در حمام اولتراسوند به مدت ۲۰ دقیقه و دمای ٤٥ درجه سانتیگراد و فرکانس ۲۰ کیلو هرتز قرار گرفت و عصاره سپس به کمک کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف شد و حلال اضافی با استفاده از روتاری اواپراتور (٤٥ درجه سانتیگراد) تبخیر شد. عصاره تغلیظ شده سپس با استفاده از خشک کن انجمادی در

برودت ۵۰- درجه سانتیگراد و تحت شرایط خلا به پودر تبدیل شد [۱۹].

۲-۲-۲- اندازه گیری ترکیبات فنولی

مقدار کل ترکیبات فنولی موجود در عصاره گیاه اوجی از طریق رنگ سنجی به روش فولین -سیوکالتو مورد بررسی قرار گرفت. مطابق روش دونالد و همکاران [۲۰]، ۰/۵ میلی لیتر از عصاره با ۵ میلی لیتر از معرف فولین-سیوکالتو (که با آب مقطر ۱۰ برابر رقیق شده بود) و ٤ میلی لیتر از محلول کربنات سدیم یک مولار به خوبی مخلوط شد. مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. سپس مقدار جذب محلول توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ٧٦٥ نانومتر خوانده شد. برای رسم منحنی استاندارد از گالیک اسید استفاده شد. محلول پایه‌ای از اسید گالیک با غلظت ۱ گرم بر لیتر تهیه گردید. از این محلول پایه، غلظت‌های مختلف (۱۰۰،...،۲۰،۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر) آماده گردید و پس از انجام مراحل مختلف مطابق روش ذکر شده در بالا مقدار جذب نمونه‌ها خوانده شد. پس از رسم منحنی کالیبراسیون گالیک اسید، مقدار کل ترکیبات فنولی با استفاده از معادله خط رسم شده ($Y = 1.36x + 0.064$) بر مبنای اسید گالیک و به صورت میلی گرم در گرم عصاره بیان گردید [۲۰].

۲-۲-۳-اندازه گیری فلاونوئید عصاره گیاه اوجی

ترکیبات فلاونوئیدی عصاره به روش چانگ و همکاران [۲۱] اندازه‌گیری شد. به این ترتیب که به ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره، ۰/۱ میلی‌لیتر از کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد افزوده سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از استات پتاسیم ۱ مولار، ۱/۵ میلی‌لیتر متانول و در پایان ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه و بعد از گذشت مدت زمان ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه جذب آن‌ها در ٤١٥ نانومتر قرائت شد. برای رسم منحنی استاندارد از کوئرستین استفاده شد. محلول پایه‌ای از کوئرستین با غلظت ۱ گرم بر لیتر تهیه گردید. از این محلول پایه، غلظت‌های مختلف (۱۰۰،...،۲۰،۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر) آماده گردید و پس از انجام مراحل مختلف مطابق روش ذکر شده در بالا مقدار جذب نمونه‌ها خوانده شد. پس از رسم منحنی کالیبراسیون کوئرستین، مقدار کل فلاونوئید عصاره اوجی با استفاده از معادله خط رسم شده ($Y = 0.96x + 0.017$) بر مبنای کوئرستین و به صورت میلی گرم در گرم عصاره بیان گردید.

۲-۲-٤- اندازه گیری ترکیبات توکوفرولی عصاره

اندازه گیری ترکیبات توکوفرولی عصاره با روش وانگ و همکاران [۲۲] انجام شد. میزان کل ترکیبات توکوفرولی عصاره بر مبنای α-توکوفرول اندازه گیری شد. در این آزمون، ۱۰۰ میلی گرم عصاره برگ اوجی به دقت داخل بالن ژوژه ۱۰ میلی لیتری وزن شد. ۵ میلی لیتر تولوئن به نمونه اضافه و بخوبی مخلوط شد. سپس ۳/۵ میلی لیتر از محلول ۲ و ۲ ′بی پیریدین (۰/۰۷ درصد وزنی حجمی در اتانول ۹۵ درصد) و ۰/۵ میلی لیتر کلرید آهن III شش آبه (۰/۲ درصد وزنی حجمی در اتانول ۹۵ درصد) اضافه و مخلوط گردید. سرانجام، حجم محلول‌های استاندارد با اتانول آبی ۹۵ درصد به ۱۰ میلی لیتر رسانده شد. محلول حاصل به مدت یک دقیقه درحال سکون قرارگرفت وجذب آن در ٥٢٤ نانومتر توسط اسپکتروفتومتری UV-Vis خوانده شد. مقدارترکیبات توکوفرولی براساس میلی گرم در گرم عصاره با توجه به شیب نمونه استاندارد α-توکوفرول و از طریق معادله $Y = 1.16x - 6.02$ خوانده و گزارش شد.

۲-۲-۵- اندازه گیری تانین کل عصاره اوجی

جهت اندازه گیری تانین کل عصاره اوجی از روش ربایا و همکاران [۲۳] با اندکی تغییر استفاده شد. ۱۲/۵ میکرولیتر از عصاره اوجی به ۷۵۰ میکرولیتر وانیلین و ۳۷۵ میکرولیتر اسید کلریدریک اضافه شد. مخلوط حاصل هم زده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. جذب نمونه‌ها سپس در طول موج ۵۰۰ نانومتر قرائت شد و مقدار تانین کل بر حسب میلی گرم کاتچین بر گرم عصاره و از روی منحنی استاندارد کاتچین به معادله ($Y = 1.36x + 3.33$) محاسبه و بیان گردید.

۲-۲-٦- مهار رادیکال آزاد DPPH

آزمایش مهار رادیکال آزاد یکی از پرکاربردترین روش‌ها جهت اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره است. بدین منظور ۰/۳ میلی لیتر از عصاره با غلظت‌های مختلف با ۲/۷ میلی لیتر محلول متانولی (٥-١٠×٦) DPPH مخلوط و به مدت ٦٠

دقیقه در دمای اتاق در مکان تاریک نگهداری شده و جذب در ۵۱۷ نانومتر خوانده شد و از طریق رابطه زیر میزان فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره بر اساس مهار رادیکال آزاد بدست آمد [۲٤].

درصد مهار = (جذب نمونه – جذب DPPH) / جذب DPPH

رادیکال آزاد DPPH

۲-۲-۷-آزمون بتاکاروتن-لینولئیک اسید

این آزمایش براساس روش ماتا و همکاران [۲۵] انجام گرفت. ابتدا یک محلول پایه از بتاکاروتن- لینولئیک اسید به صورت زیر تهیه گردید: ۵ میلی گرم از بتاکاروتن در ۱۰ میلی لیتر کلروفرم حل شد، ٦۰۰ میکرو لیتر از محلول تهیه شده به مخلوط ٤۰ میلی گرم لینولئیک اسید و ٤۰۰ میلی گرم توئین ٤۰ اضافه شد. سپس با روش تبخیر در خلا کلروفرم جدا گردید و ۱۰۰ میلی لیتر آب اکسیژنه به آن اضافه و شدیدا هم زده شد. ۵ میلی لیتر از امولسیون تهیه شده فوق به لوله آزمایش منتقل و ۲۰۰ میکرولیتر از ترکیبات صابونی ناشونده به لوله آزمایش اضافه گردید. یک نمونه فاقد عصاره نیز به عنوان ترکیب شاهد در نظر گرفته شد. جذب نوری نمونه‌ها با اسپکتروفتومتر در ٤۷۰ نانومتر در زمان صفر و همچنین بعد از ۲٤ ساعت گرمخانه گذاری در دمای اتاق قرائت شد. ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره به عنوان درصد بازداری بیان شد.

$$\text{درصد بازداری} = \frac{\text{جذب شاهد} - \text{جذب نمونه}}{\text{جذب شاهد}} \times ۱۰۰$$

۲-۲-۸-اندازه‌گیری پایداری اکسایشی عصاره

برای تعیین کارایی آنتی اکسیدان‌های اضافه شده به روغن، از دستگاه رنسیمت استفاده شد. بدین ترتیب در دمای ۱۲۰ درجه سانتیگراد ۲/۵ گرم نمونه روغن به همراه غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ppm از عصاره مورد آزمایش قرار گرفت. آنتی اکسیدان سنتزی TBHQ به میزان ۱۰۰ ppm به عنوان شاهد در نظر گرفته شد [۲٦].

۲-۳-تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌های مربوط به اندازه گیری ترکیبات موثره فنول، فلاونوئید، توکوفرول و تانن و نیز فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها که به صورت میانگین گزارش شده بود؛ با استفاده از آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵٪ و روش آنوای دو طرفه تجزیه و تحلیل شد. بدین منظور از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ استفاده شد و رسم نمودارها با برنامه اکسل ۲۰۱۳ انجام شد. به منظور کاهش خطا کلیه آزمایشات در ۳ تکرار انجام شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱-ترکیبات موثره عصاره اوجی

ترکیبات فنولی مشتقات پنتوز فسفات و فنیل پروپانوئید در گیاهان هستند. این متابولیت‌های ثانویه دارای اثرات آنتی اکسیدانی، ضد توموری و ضد انعقادی هستند. فلاونوئیدها، فلاونول‌ها، فنول‌ها، تانن‌ها، آنتوسیانین‌ها، آنتراکینون و اسیدهای فنولیک مهمترین ترکیبات موثره موجود در گیاهان هستند [۲۷]. جدول ۱ مقادیر میانگین ترکیبات موثره عصاره اوجی که شامل ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی، تانین و توکوفرول می باشد را نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود در مورد هر ٤ ترکیب موثره، مقدار ماده استخراج شده توسط روش اولتراسوند بیشتر از روش ماسراسیون بوده است و دو روش با هم اختلاف معنی دار آماری ($P<۰/۰۵$) داشتند. بیشترین ترکیب موثره جداسازی شده از عصاره گیاه اوجی ترکیبات فنولی و بعد از آن ترکیبات فلاونوئیدی بودند و توکوفرول کمترین ترکیب موثره شناسایی شده در عصاره اوجی بود. بن عبدالله و همکاران [۲۸] مقدار ترکیبات فنولی، فلاونوئید و تانن عصاره گیاه اوجی را به ترتیب ٤۳/۲۱، ۳۱/۷۷ و ۸/٦۷ میلی گرم بر گرم گزارش نمودند که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد. اوسلن و همکاران [۲۹] حضور ترکیبات فلاونوئیدی در عصاره گیاه اوجی که با روش اولتراسوند و با استفاده از حلال‌های اتانول:آب ۷۰٪، استون، آب بوتانول، کلروفرم، دی کلرو متان و پترولیوم اتر استخراج شده بود اثبات نمودند. لی و همکاران [۳۰] وجود کوئرسیتین، ایزوکوئرسیتین و روتین را بعنوان ترکیبات فلاونوئیدی در عصاره اوجی تایید نمودند که همراستا با وجود فلاونوئید در این پژوهش است. در یک پژوهش ویرین و همکاران [۳۱] ضمن بررسی ترکیبات

سازنده عصاره گیاه اوجی با استفاده از روش HPLC وجود ترکیبات فنولی مانند آپیجنین، پبرلین، سالویجنین و گاردنین B را اعلام نمودند که تایید کننده وجود خاصیت آنتی اکسیدانی در این عصاره است. اسماعیل زاده کناری و همکاران [۱۹] ضمن بررسی تاثیر نوع روش استخراج بر میزان ترکیبات فنولی استخراج شده نشان دادند که روش اولتراسوند توانست تاثیر مثبتی بر روی روش‌های اتانولی، آبی: اتانولی و آبی عصاره کنجد داشته باشد و ترکیبات فنلی بیشتری را در این روش‌ها بدست آمد. همچنین آن‌ها اعلام نمودند در ترکیبات آبی: اتانولی میزان ترکیبات فنلی افزایش یافت که می‌توان این افزایش را در ارتباط با تورم بافت‌های گیاهی در این روش دانست. دلیل این امر را می‌توان به کارآمد بودن روش اولتراسوند در تخریب دیواره سلولی و انتقال جرم موثر دانست [۳۲]. مارتین و همکاران [۱۸] ضمن مقایسه دو روش استخراج با اولتراسوند و ماسراسیون در گیاه گل همیشه بهار علت اصلی بالاتر بودن میزان ترکیبات استخراج شده در روش اولتراسوند را کاویتاسیون صوتی ایجاد شده در حلال دانستند که همراستا با نتایج ژانگ و همکاران [۳۳]، لیانفو و همکاران [۳٤] و ریرا و همکاران [۳۵] می‌باشد. امواج اولتراسوند مانند هر موج دیگری از طریق یک سری امواج فشاری و نسبتا تجمعی در مولکول‌های محیط القا می‌شوند و از محیط عبور می‌نماید. در مواقعیکه نیروهای تجمعی بیشتر از نیروهای جاذبه مولکولی مایع باشند حباب‌های کاویتاسیون شکل می-گیرند. چنین حباب هایی با یک فرآیند که تحت عنوان تزریق یکسو شناخته می‌شود؛ مانند مقادیر کم بخار یا گازی که طی فرایند انبساط از محیط وارد سلول گیاهی می‌شود؛ شناخته می-شود. در نتیجه ترکیدن این حباب‌ها انرژی ایجاد می‌شود که منجر به پاره شدن سلول گیاهی و خروج ترکیبات موثره از سلول گیاهی می‌شود [۱۵].

Table 1 Average of active compounds

Extraction method	Total phenol (mg GA/g E)	Tocopherol (mg α-toc/g E)	Flavonoid (mg QU/g E)	Tanin (mg CE/g E)
Ultrasound	51.92±3.7a	6.55±1.7a	30.33±3.32a	10.25±2a
maceration	45.16±3.6b	4.32±1.3b	22.19±2.1b	7.47±1.9b

Different letter between columns indicate significant statistical difference at level 5%.

۳-۲- بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره

۳-۲-۱-مهار رادیکال‌های آزاد DPPH

رادیکال‌های پایدار DPPH به رنگ بنفش، با عوامل کاهنده مناسب (A-H) واکنش می‌دهند و طی این فرآیند الکترون‌ها به یکدیگر متصل می‌شوند و محصول این واکنش یک مولکول دیامغناطیس پایدار به رنگ زرد است که دیفنیل پیکریل هیدرازیل نامیده می‌شود. مقدار از دست دادن رنگ محلول بستگی به تعداد الکترون‌های برداشته شده دارد [۳٦]. روش ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی DPPH در واقع وابسته به توانایی DPPH به عنوان یک رادیکال آزاد پایدار در جهت رنگبری در حضور آنتی اکسیدان‌ها است. لذا مقدار کمتر دلیلی برای توانایی بالای عصاره در مهار رادیکال‌های آزاد است [۳۷]. شکل ۱ مقادیر میانگین مهار رادیکال آزاد DPPH را نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود در هر دو عصاره استخراج شده با افزایش غلظت عصاره از ۵۰ به ۱۵۰۰ ppm فعالیت آنتی اکسیدانی بصورت مهار رادیکال آزاد افزایش یافته است و اختلاف معنی دار آماری ($P<۰/۰۵$)بین غلظت‌های مختلف عصاره ایجاد شده است. از نظر اختلاف بین نمونه‌ها مشاهده می‌شود، در تمام غلظت‌های مورد بررسی همواره میزان مهار رادیکال‌های آزاد در نمونه‌های عصاره استخراج شده توسط اولتراسوند بالاتر از عصاره‌های استخراج شده به وسیله ماسراسیون است. در غلظت ۱۰۰۰ ppm عصاره‌ها با هم و با TBHQ اختلاف معنی دار آماری نداشتند. دلیل افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره با افزایش غلظت را می-توان مرتبط با مقدار ترکیبات فنولی عصاره دانست. بطوریکه بن عبدالله و همکاران [۲۸] نشان دادند که همبستگی بالایی بین میزان ترکیبات فنولی و خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره وجود

دارد. ابوطالبیان و همکاران [۳]، جریدانی و همکاران [۳۸]، کاتالینیک و همکاران [۳۹] و کاتسوبی و همکاران [٤٠] نیز ارتباط قوی بین میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی استخراج شده با فعالیت آنتی اکسیدانی ارائه نمودند که همراستا با نتایج این پژوهش است.

این نتایج با نتایج الوگبامی و همکاران [٤١] مطابقت داشت. آن‌ها اعلام نمودند مهار رادیکال‌های آزاد عصاره گیاه Terminalia glaucescens با غلظت وابسته است و با افزایش غلظت میزان مهار افزایش می‌یابد. زیرا در غلظت‌های بالاتر ترکیبات فنولی به دلیل افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل موجود در محیط واکنش احتمال اهدا هیدروژن به رادیکال‌های آزاد و به دنبال آن قدرت مهار کنندگی عصاره افزایش می‌یابد [٤٢]. ابوطالبیان و همکاران [۳] از روش مهار رادیکال آزاد DPPH به عنوان یک روش سریع جهت اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی چند عصاره خانواده Mentha استفاده نمودند و نشان دادند که با افزایش غلظت عصاره از ۵۰ به ۵۰۰ ppm فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره به صورت مهار رادیکال آزاد DPPH افزایش می‌یابد و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره بالاتر از آنتی اکسیدان سنتزی BHA بود که مطابق با نتایج بدست آمده از این پژوهش است.

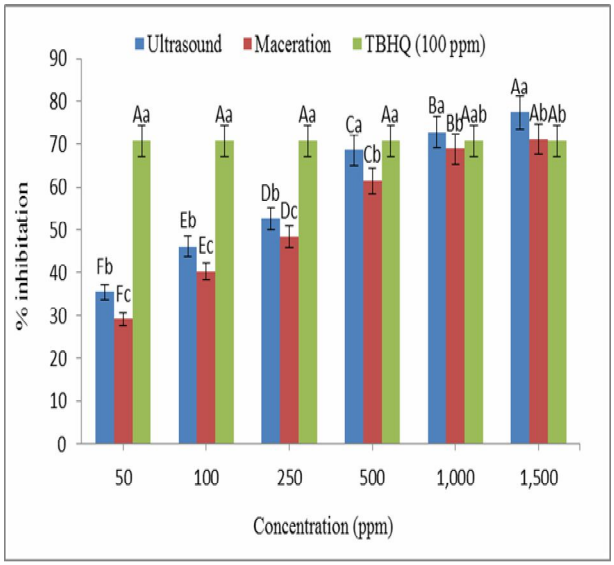

Fig 1 DPPH radical scavenging activity of extracts and TBHQ

۳-۲-۲- بیرنگ شدن بتاکاروتن-لینولئیک اسید

اکسیداسیون لینولئیک اسید شکل‌گیری رادیکال‌های آزاد را تسریع می‌نماید که در نهایت منجر به بیرنگ شدن مولکول‌های بتاکاروتن بسیار غیر اشباع می‌گردد [٤۳]. لذا اضافه کردن یک آنتی اکسیدان به امولسیون بتاکاروتن:لینولویک اسید ممکن است با خنثی نمودن رادیکال‌های آزاد لینولئات از بیرنگ شدن بتاکاروتن جلوگیری نماید [٤٤]. شکل ۲ مقادیر خاصیت آنتی اکسیدانی بدست آمده از روش بیرنگ شدن بتاکاروتن-لینولئیک اسید را نشان می‌دهد. خاصیت آنتی اکسیدانی در این روش در تمام نمونه‌ها با افزایش غلظت افزایش یافت و اختلاف معنی دار آماری ($P<۰/۰۵$) بین غلظت‌های مختلف مشاهده شد. در تمام غلظت‌های مورد بررسی همواره نمونه عصاره استخراج شده به روش اولتراسوند میزان بیرنگ شدن بتاکاروتن بالاتری داشت و با نمونه عصاره استخراج شده با روش ماسراسیون اختلاف معنی دار آماری ($P<۰/۰۵$) داشت. در غلظت ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ ppm عصاره فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره اولتراسوندی بالاتر از TBHQ بود. بن عبدالله و همکاران [۲۸] فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره متانولی گیاه اوجی را با ۳ روش مهار رادیکال آزاد DPPH، بیرنگ شدن بتاکاروتن و فعالیت چلاته کنندگی یون آهن (II) اندازه گیری نمودند و فعالیت آنتی اکسیدانی در این عصاره را اثبات نمودند که همراستا با نتایج بدست آمده از این پژوهش است. محققین دیگر نشان داده‌اند که همبستگی بالایی بین افزایش میزان ترکیبات فنولی و خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره وجود دارد [٤۵ و ٤٦]. لوکسیمون-راما و همکاران [٤۷] نشان دادند که بین میزان ترکیبات فنولی عصاره‌ها و خاصیت آنتی اکسیدانی رابطه خطی مناسبی وجود دارد. فعالیت آنتی اکسیدانی پلی فنول‌ها عموما وابسته به توانایی آن‌ها در عمل کردن به عنوان یک دهنده الکترون، عوامل کاهنده و جاروب کنندگی رادیکال-ها است [٤۸]. در واقع عصاره استخراج شده با روش اولتراسوند به دلیل دارا بودن مقادیر بالایی از ترکیبات فنولی، فلاونوئید و تانن‌ها دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتری بودند. همچنین ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره وابسته به ساختار شیمیایی ترکیبات سازنده در عصاره خام می‌باشد [٤۹].

تفاوت در فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های مختلف که با دو روش متفاوت اولتراسوند و ماسراسیون استخراج شده اند وابسته به نوع و مقدار ترکیبات فنولی در عصاره می‌باشد. ابوطالبیان و همکاران [۳] ضمن اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی غلظت‌های مختلف عصاره‌های خانواده نعنا نشان دادند که با افزایش غلظت عصاره فعالیت آنتی اکسیدانی آن به صورت بیرنگ شدن بتاکاروتن:لینولئیک اسید افزایش می‌یابد که همراستا با نتایج بدست آمده از این پژوهش است. گولوس و همکاران [۵۰] نیز نتایج مشابهی گزارش نمودند. پترسون و همکاران [۵۱] فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره جوی دو سر را با روش بی رنگ شدن بتاکاروتن اندازه گیری کرده و میزان ترکیب‌های فنولیک کل عصاره را تعیین کردند. این پژوهشگران نشان دادند بین میزان ترکیب‌های فنولیک و فعالیت آنتی اکسیدانی اندازه گیری شده ارتباط خوبی وجود داشت. الوگبامی و همکاران [٤١] نیز نتایج مشابهی در مورد افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی همراستا با افزایش غلظت عصاره اعلام نمودند که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد.

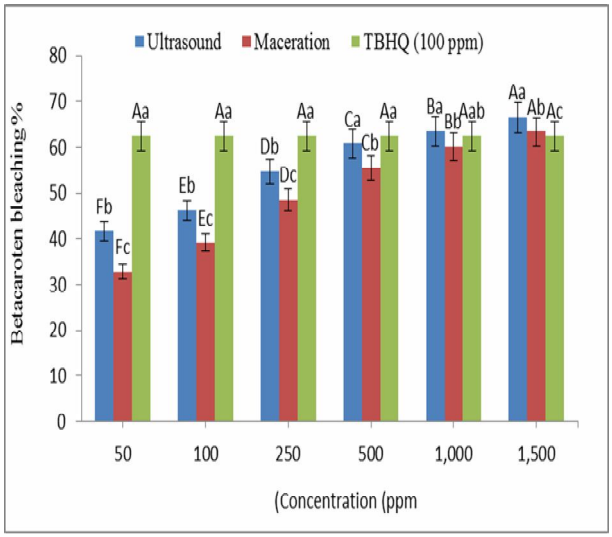

Fig 2 Betacaroten bleaching inhabitation activity of extracts and TBHQ

۳-۲-۳-پایداری اکسایشی عصاره

آزمون رنسیمت یا پایداری اکسایشی به منظور اندازه گیری دوره القا[1] و با استفاده از شناسایی اسیدهای فرار طی فرآیند اکسایش انجام می‌شود [۵۲]. پایداری اکسایشی مقاومت روغن‌ها به اکسایش طی نگهداری و فرآیند است و با اندازه گیری آن کنترل شرایط بحرانی که منجر به تغییرات حسی و تسریع اکسایش می‌شوند، امکان پذیر می‌شود. این پارامتر مدت زمان لازم جهت گسترش تندی قابل اندازه‌گیری در روغن‌ها وچربی‌ها را اندازه‌گیری می‌نماید [۵۳] که اساس آن تخمین ترکیبات فرار حاصله و رسم نمودار هدایت بر اساس زمان است. ترکیبات آنتی اکسیدان با افزایش طول دوره القا منجر به افزایش پایداری اکسایشی روغن‌های حاوی ترکیبات آنتی اکسیدان می‌شوند [٥٤]. جدول ۲ مقادیر میانگین پایداری اکسایشی غلظت‌های مختلف عصاره و آنتی اکسیدان سنتزی TBHQ را نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود در هر دو عصاره مورد بررسی با افزایش غلظت عصاره از ۵۰ به ۱۵۰۰ ppm پایداری اکسایشی عصاره افزایش یافت و اختلاف معنی دار آماری ($P<0/05$) بین غلظت‌های مختلف عصاره ایجاد شده است. در تمام غلظت‌های مورد بررسی عصاره استخراج شده به روش اولتراسوند دارای پایداری اکسایش بالاتری بود و با عصاره استخراج شده توسط ماسراسیون اختلاف معنی دار آماری ($P<0/05$) داشت. در دو غلظت ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ ppm از عصاره فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره استخراج شده به روش اولتراسوند بالاتر از TBHQ بود. آگرگران و همکاران [۵۵] به بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره گیاه شقایق در غلظت‌های مختلف در افزایش پایداری اکسایشی روغن کانولا طی فرآیند تسریع شده پرداختند و نشان دادند که با افزایش غلظت عصاره فعالیت آنتی اکسیدانی آن افزایش می‌یابد که همراستا با نتایج بدست آمده از پژوهش حاضر است. زو و همکاران [٥٦] پایداری اکسایشی سه نمونه روغن حاوی عصاره رزماری و آنتی اکسیدان سنتزی را مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که پایداری اکسایشی در نمونه‌هایی که حاوی آنتی اکسیدان سنتزی بودند کمتر از نمونه‌های روغن حاوی عصاره بود که مطابق با نتایج بدست آمده از پژوهش حاضر است. فرهمندفر و همکاران [۵۷] نشان دادند که میزان پایداری اکسایشی در عصاره سبوس برنج طارم محلی استخراج شده به روش اولتراسوند از TBHQ بالاتر است ولی اختلاف معنی دار آماری نداشتند که مطابق با نتایج بدست آمده از پژوهش حاضر است.

[1] - Induction Period

Table 2 Oxidative stability of extracts and TBHQ (Hours)

Extraction method	50	100	250	500	1000	1500
Ultrasound	3±0.45Fb	3.5±0.2Eb	4.15±0.15Db	4.35±0.15Ca	4.5±0.35Ba	5.15±0.4Aa
Maceration	2.4±0.4Fc	3.15±0.4Ec	3.45±0.3Dc	4.15±0.35Cb	4.3±0.45Bb	4.55±0.3Ab
TBHQ	4.4±0.25Aa	4.4±0.25Aa	4.4±0.25Aa	4.4±0.25Aa	4.4±0.25Aab	4.4±0.25Ac

Different small letters between columns indicate significant statistical difference at level 5%.
Different big letters between rows indicate significant statistical difference at level 5%.

دلیل بالاتر بودن فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره استخراج شده به روش اولتراسوند در هر سه روش مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانی، اثرات کاویتاسیون ناشی از امواج اولتراسوند می-باشد. همچنین تخریب مکانیکی دیواره سلولی منجر به نفوذ بیشتر حلال در بافت‌های گیاهی می‌شود که به نفوذ هرچه بیشتر ترکیبات فنولی عصاره در بافت‌های گیاه کمک می‌کند [۵۸]. محققان بسیاری معتقد هستند که استخراج به روش اولتراسوند به دلیل سپری نمودن زمان کمتر، بازده استخراج را افزایش می‌دهد و فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتری نسبت به عصاره‌های استخراج شده با روش حلال دارد [۵۹].

٤-نتیجه گیری

در این پژوهش عصاره گیاه اوجی با استفاده از دو روش ماسراسیون و با کمک اولتراسوند استخراج شد. حلال اتانول:آب ۲۰:۸۰ به عنوان محیط استخراج کننده در نظر گرفته شد. مقدار ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی، توکوفرول و تانن در عصاره گیاه اوجی نشان دهنده بالاتر بودن میزان ترکیبات موثره در روش استخراج به کمک اولتراسوند بود. نتایج مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها با آنتی اکسیدانی سنتزی TBHQ که به طور متداول در صنعت روغن استفاده می‌شود، نشان داد با افزایش غلظت عصاره از ۵۰ تا ۱۵۰۰ ppm در هر سه روش مهار رادیکال آزاد DPPH، بیرنگ شدن بتاکاروتن: لینولئیک اسید و پایداری اکسایشی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره افزایش یافته است. بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی مربوط به عصاره استخراج شده با روش اولتراسوند بود. همچنین یک همبستگی مثبت منطقی بین میزان ترکیبات موثره در عصاره و خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره مشاهده شد. بطوریکه فعالیت آنتی اکسیدانی در عصاره استخراج شده به روش اولتراسوند به دلیل بالاتر بودن ترکیبات موثره بیشتر بود و همچنین با افزایش غلظت عصاره به دلیل افزایش کمی در مقادیر ترکیبات موثره، فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره بیشتر شد. غلظت ۱۰۰۰ ppm از هر دو نوع عصاره استخراج شده به کمک اولتراسوند و روش ماسراسیون خصوصیات آنتی اکسیدانی مشابه ۱۰۰ ppm آنتی اکسیدان سنتزی TBHQ داشتند. کشور ایران به دلیل دارا بودن اقلیم چهار فصل مکان مناسبی برای رشد و پروش گیاهان دارویی می‌باشد. با توجه به اینکه امکان رشد و پروش گیاه اوجی در کشور وجود دارد و نیز با تکیه بر نتایج بدست آمده از این پژوهش عصاره گیاه اوجی می‌تواند به عنوان یک جایگزین مناسب آنتی اکسیدان سنتزی TBHQ معرفی و در صنایع روغن مورد استفاده قرار گیرد.

٥- منابع

[1] Chanwitheesuk, A., Teerawutgulrag, A., Rakariyatham, N. 2005. Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. Food Chemistry, 92, 491–497.

[2] Nogala-Kalucka, M., Korczak, J., Dratwia, M., Lampart-Szczapa, E., Siger, A., Buchowski, M. 2005. Changes in antioxidant activity and free radical scavenging potential of rosemary extract and tocopherols in isolated rapeseed oil triacylglycerols during accelerated tests. Food Chemistry, 93, 227–235.

[3] Abootalebian, M., Keramat, J., Kadivar, M., Ahmadi, F. and Abdinian, M. 2016. Comparison of total phenolic and antioxidant activity of different Mentha spicata and M. longifolia accessions. Annals of Agricultural Sciences, 61(2), 175-179.

[4] Liu, J., Wang, C., Wang, Z., Zhang, C., Lu, S., Liu, J. 2011. The antioxidant and freeradical scavenging activities of extract and fractions from corn silk (Zea mays L.) and related flavone glycosides. Food Chemistry, 126, 261–269.

[5] Wong, S.P., Leong, L.P., William Koh, J.H. 2006. Antioxidant activities of aqueous

[15] Vinatoru, M., Mason, T.J. and Calinescu, I., 2017. Ultrasonically Assisted Extraction (UAE) and Microwave Assisted Extraction (MAE) of Functional Compounds from Plant Materials. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 97, 159-178.

[16] Xu, D.P., Zheng, J., Zhou, Y., Li, Y., Li, S. Li, H.B. 2017. Ultrasound-assisted extraction of natural antioxidants from the flower of Limonium sinuatum: Optimization and comparison with conventional methods. Food chemistry, 217, 552-559.

[17] Dutra, R.C., Leite, M.N., Barbosa, N.R. 2008. Quantification of phenolic constituents and antioxidant activity of *Pterodon emarginatus* vogel seeds. International Journal of Molecule Science, 9, 606-614.

[18] Martins, F.S., da Conceição, E.C., Bandeira, E.S. Silva, J.O.C. 2014. The effects of extraction method on recovery rutin from Calendula officinalis L.(Asteraceae). Pharmacognosy magazine, 10(l3), 569-572.

[19] Esmaeilzadeh kenari, R., Mohsenzadeh, F., Raftani-Amiri, Z. 2014. Antioxidant activity and total phenolic compound of Dezful sesame cake extracts obtained by classical and ultrasound assisted extraction methods. Food Science and Nutration, 2(4), 426-435.

[20] Donald S., Prenzler, P. D., Autolovich, M., Robards, K. 2001. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. Food chemistry Journal, 73:73-84.

[21] Chang, Y.L. 2002. Vitaminc equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. Journal Agricultural Food Chemistry. 50(13), 3713-3717.

[22] Wong, M. L., Timms, R. E., Goh, E.M. 1998. Colorimetric determination of total tocopherols in palm oil, olein and stearin. Journal of the American Oil Chemists' Society, 65:258–261.

[23] Rebaya A, Belghith SI, Baghdikian B, Leddet VM, Mabrouki F, Olivier E. 2015. Total phenolic, total flavonoid, tannin content, and antioxidant capacity of Halimium halimifolium (Cistaceae). Journal of Applied Pharmacological Science, 5, 52-7.

[24] Suh, S.S., Hwang, J., Park, M., Park, H.S., Lee, T.K. 2014. Phenol content, antioxidant and tyrosinase inhibitory activity of mangrove plants in Micronesia. Asian extracts of selected plants. Food Chemistry, 99, 775–783.

[6] Abdelli, M., Moghrani, H., Aboun, A., Maachi, R. 2016. Algerian Mentha pulegium L. leaves essential oil: chemical composition, antimicrobial, insecticidal and antioxidant activities. Industrial Crops and Products, 94, 197–205.

[7] Kanatt, S.R., Chander, R., Sharma, A. 2007. Antioxidant potential of mint (Mentha spicata L.) in radiation-processed lamb meat. Food Chemistry, 100, 451–458.

[8] Zebelo, S.A., Bertea, C.M., Bossi, S., Occhipinti, A., Gnavi, G., Maffei, M.E. 2011. Chrysolina herbacea modulates terpenoid biosynthesis of Mentha aquatica L. PLos One, 6, 1–10.

[9] Rita, I., Pereira, C., Barros, L., Santos-Buelga, C., Ferreira, I.C.F.R. 2016. Mentha spicata L. infusions as sources of antioxidant phenolic compounds: emerging reserve lots with special harvest requirements. Food and function, 7(10), 4188-4192.

[10] Dahmoune, F., Nayak, B., Moussi, K., Remini, H., & Madani, K. 2015. Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from Myrtus communis L. leaves. Food Chemistry, 166, 585–595.

[11] Liu, L., Shen, B. J., Xie, D. H., Cai, B. C., Qin, K. M., Cai, H. 2015. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from Cimicifugae rhizoma with response surface methodology. Pharmacognosy Magazine, 11(44), 682–689.

[12] Zou, T. B., Xia, E. Q., He, T. P., Huang, M. Y., Jia, Q., Li, H. W. 2014. Ultrasound assisted extraction of mangiferin from mango (Mangifera indica L.) leaves using response surface methodology. Molecules, 19(2), 1411–1421.

[13] Povilaitis, D., Sulniute, V., Venskutonis, P. R., Kraujaliene, V. 2015. Antioxidant properties of wheat and rye bran extracts obtained by pressurized liquid extraction with different solvents. Journal of Cereal Science, 62, 117–123.

[14] Diaz-Reinoso, B., Moure, A., Dominguez, H., Parajo, J. C. 2006. Supercritical CO2 extraction and purification of compounds with antioxidant activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54(7), 2441–2469.

Pacific Journal of Tropical Medicine, 7, 531-735.
[25] Mata, A.T., Proenca, C., Ferreira, A.R., Serralheiro, M.L.M., Nogueira, J.M.F., Ara´ujo, M.E.M. 2007. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. Food Chemistry, 103(3), 778-86.
[26] Esmaeilzadeh-kenari, R., Mehdipour, S.Z., and Razavi, R. 2017. Investigation the changes in fatty acid and antioxidant properties of kiwifruit (Actinidia Deliciosa) peel extract on stability of sunflower oil in thermal conditions, 68(14), 125-135.
[27] Kang, H.J., Chawla, S.P., Jo, C., Kwon, J.H., Byun, M.W. 2006. Studies on the development of functional powder from citrus peel. Bioresource Technology, 97, 614-20.
[28] Benabdallah, A., Rahmoune, C., Boumendjel, M., Aissi, O. Messaoud, C. 2016. Total phenolic content and antioxidant activity of six wild Mentha species (Lamiaceae) from northeast of Algeria. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 6(9), 760-766.
[29] Olsen, H.T., Stafford, G.I., van Staden, J., Christensen, S.B. Jäger, A.K. 2008. Isolation of the MAO-inhibitor naringenin from Mentha aquatica L. Journal of Ethnopharmacology, 117(3), 500-502.
[30] Lee, M.H., Lin, R.D., Shen, L.Y., Yang, L.L., Yen, K.Y., Hou,W.C., 2001. Monoamine oxidase B and free radical scavenging activities of natural flavonoids in Melastoma candidum D. Don. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 49, 5551–5555.
[31] Voirin, B., Bayet, C., Faure, O. Jullien, F. 1999. Free flavonoid aglycones as markers of parentage in Mentha aquatica, M. citrata, M. spicata and M. x piperita. Phytochemistry, 50(7), 1189-1193.
[32] Peksel A, Arisan I, Yanardag 2006. Antioxidant activities of aqueous extracts of purslane (Portulaca oleracea Subsp. Sativa L.). Ital. J. Food Sci., 3, 295–308United States Department of Agriculture (USDA). 2013. Tree Nuts: Pistachios World Markets and Trade. Foreign Agricultural Service /USDA, Circular Series February. 2-10.
[33] Zhang, H.F., Yang, X.H., Zhao, L.D., Wang, Y. 2009. Ultrasonic□assisted extraction of epidemic C from fresh leaves of Epimedium and extraction mechanism. Innovation in Food Science Emergency Technology, 10:54- 60.
[34] Lianfu, Z., Zelong, L. 2008. Optimization and comparison of ultrasound/ microwave assisted extraction (UMAE) and ultrasonic assisted extraction (UAE) of lycopene from tomatoes. Ultrasound Sonochemistry, 15, 731- 737.
[35] Riera, E., Gallego- Juarez, J.A., Mason, T.J. 2006. Airborne ultrasound for the precipitation of smokes and powders and the destruction of foams. Ultrasound Sonochemistry, 13,107- 116.
[36] Biswas, N.N., Saha, S., Ali, M.K. 2014. Antioxidant, antimicrobial, cytotoxic and analgesic activities of ethanolic extract of Mentha arvensis L. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 4(10), 792-807.
[37] Hasan, S.M., Jamila, M., Majumder, M.M., Akter, R., Hossain, M.M., Mazumder, M.E. 2009. Analgesic and antioxidant activity of the hydromethanolic extract of Mikania scandens (L.) Willd. leaves. American Journal of Pharmacological and Toxicology, 4(1), 1-7.
[38] Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N. 2006. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. Food Chemistry, 97, 654–660.
[39] Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T., Jukic, M. 2006. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. Food Chemistry, 94, 550–557.
[40] Katsube, T., Tabata, H., Ohta, Y., Yamasaki, Y., Anuurad, E., Shiwaku, K., Yamane, Y., 2004. Screening for antioxidant activity in edible plant products: comparison of low-density lipoprotein oxidation assay, DPPH radical scavenging assay, and Folin-Ciocalteu assay. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 52, 2391–2396.
[41] Olugbami, J.O., Gbadegesin, M.A. Odunola, O.A. 2015. In vitro free radical scavenging and antioxidant properties of ethanol extract of Terminalia glaucescens. Pharmacognosy research, 7(1), 49-55.
[42] Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L. 2004. Polyphenol: food sources and bioavailability. American Journal of Clinical Nutrition, 79, 727-747.
[43] Sarikurkcu, C., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Harmandar, M. 2008. Studies on the antioxidant activity of the essential oil and methanol extract of Marrubium

globosum subsp. globosum (lamiaceae) by three different chemical assays. Bioresource Technology, 99, 4239–4246.

[44] Singh, R., Chidambara Murthy, K., Jayaprakasha, G. 2002. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (Punica granatum) peel and seed extracts using in vitro models. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 50, 81–86.

[45] Borneo, R., Leon, E.A., Aguirre, A., Ribotta, P., Cantero, J.J. 2009. Antioxidant capacity of medicinal plants from the Province of Cordoba (Argentina) and their in vitro testing in model food system. Food Chemistry, 112, 664-70.

[46] Waheed, I., Ahmed, M., Syed, N.H., Ashraf, R. 2014. Investigation of phytochemical and antioxidant properties of methanol extract and fractions of Ballota limbata (Lamiaceae). Indian Journal of Pharmaceutical Science, 76(3), 251-6.

[47] Luximun-Ramma, A., Bahorun, T., Soobrattee, M.A., Aruomai, O.I. 2002. Antioxidant activities of phenolic, proanthocyanidin, and flavonoid components in extracts of Cassia fistula. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 50, 5042-5047.

[48] Lee, C.J., Chen, L.G., Chang, T.L., Ke, W.M., Lo, Y.F., Wang, C.C. 2011. The correlation between skin-care effects and phytochemical contents in Lamiaceae plants. Food Chemistry, 124, 833-841.

[49] Al-Owaisi, M., Al-Hadiwi, N., Khan, S.A. 2014. GC-MS analysis, determination of total phenolics, flavonoid content and free radical scavenging activities of various crude extracts of Moringa peregrina (Forssk.) Fiori leaves. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 4(12), 964-970.

[50] Gulluce, M., Sahin, F., Sokmen, M., Ozer, H., Daferera, D., Sokmen, A., Polissiou, M., Adiguzel, A., Ozkan, H. 2007. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from Mentha longifolia L. ssp. longifolia. Food Chemistry, 103, 1449–1456.

[51] Peterson, D. M., Emmons, C. L., Hibbs, A. 2001. Phenolic antioxidant activity in pearling fractions of oat groats. Cereal Science, 33, 97-103.

[52] Mathäus, B. 1996. Determination of the oxidative stability of vegetable oils by rancimat and conductivity and chemiluminescence measurements. Journal of American Oil Chemistry Society, 73, 1039–1043.

[53] Silva, L., Pinto, J., Carrola, J. Paiva-Martins, F. 2010. Oxidative stability of olive oil after food processing and comparison with other vegetable oils. Food Chemistry, 121, 1177–1187.

[54] Farhoosh, R., Golmovahhed, GH.A., Haddad Khodaparast, M.H. 2007. Antioxidant Activity of Various Extracts of Old Tea Leaves and Black Tea Wastes (Camellia Sinesis L.). Food Chemistry, 100, 231-236.

[55] Agregán, R., Lorenzo, J.M., Munekata, P.E., Dominguez, R., Carballo, J. Franco, D. 2016. Assessment of the antioxidant activity of Bifurcaria bifurcata aqueous extract on canola oil. Effect of extract concentration on the oxidation stability and volatile compound generation during oil storage. Food Research International. In press.

[56] Xu, Z., Hua, N., Godber, J.S. 2001. Antioxidant activity of tocopherols, tocotrienols, and oryzanol components from rice bran against cholesterol oxidationaccelerated by 2,2‘-azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 49, 2077–2081.

[57] Farahmandfar, R., Asnaashari, M. Sayyad, R. 2015. Comparison antioxidant activity of Tarom Mahali rice bran extracted from different extraction methods and its effect on canola oil stabilization. Journal of food science and technology, 52(10), 6385-6394.

[58] Hussain, A.I., Chatha, S.A.S., Noor, S., Arshad, M.U., Khan, Z.A., Rathore, H.A. Sattar, M.Z.A. 2012. Effect of extraction techniques and solvent systems on the extraction of antioxidant components from peanut (*Arachishypogaea L.)* hulls. Food Analytical Methods, 5, 890-896.

[59] The, S., Brich, J.B. 2014. Effect of ultrasonic treatment on the polyphenol content and antioxidant capacity of extract from defatted hemp, flax and canola seed cakes. Ultrasonics Sonochemistry, 21(1), 346–353.

Effect of extraction method on antioxidant activity and some secondary metabolites of *Mentha aquatic* L. extract

Esmaelzade- Kenari, R. [1*], Asna-ashari, M. [2]

1.Associated professor ,Department of Food Science & Technology Sari Agricultural sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, Iran.
2. PhD student ,Department of Food Science & Technology Sari Agricultural sciences and Natural Resources University (SANRU),

With the improvement in living conditions, consumers increasingly reject food prepared with additives of chemical origin due to health issues. There is an present increasing interest both in the industry and in scientific community for aromatic herbs because of their strong antioxidant, which exceed many currently used natural and synthetic antioxidants. *Mentha aquatica* (water mint) is a perennial medicinal and aromatic herb in the genus Mentha, which produces a large and diverse group of phenolic constituents. In this study, *Mentha aquatique* extracts by ultrasound assisted and maceration (ethanol: water (80:20)) extraction method were compared. The total phenolic, tocopherol, flavonoid and tannin content and antioxidant activity of the extracts was determined and compared with TBHQ by DPPH assay, β-carotene bleaching method and rancimat test. The results showed that the extract from ultrasonic treatment with high amount of phenols (51.92 mg gallic acid/g extract, tocopherols (6.55 mg α-tocopherol/ g extract), flavonoid (30.33 mg quercetin/ g extract) and tannin (10.25 mg catechin/ g extract). The antioxidant activity of extracts (50, 100, 250, 500, 1000 and 1500 ppm) were increased by increasing in concentration of extract. At 1000 ppm of concentration there was not observed significant statistical different ($P<0.05$) between TBHQ and both extracts. According to the results of antioxidant activity and of extract it can be said that both of *Mentha aquatique* extract could be a good alternative for synthetic antioxidant such as TBHQ and the ultrasound extraction method is preferred due to the use of lower solvent and time than the maceration method.

Keywords: Mentha aquatique extract, Oxidation, Antioxidant, Ultrasound

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