

## ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ زیتون و کاربرد آن در روغن آفتابگردان

زهرا رفیعی<sup>۱</sup>، سید مهدی جعفری<sup>۲\*</sup>، مهران اعلمی<sup>۳</sup> و مرتضی خمیری<sup>۴</sup>

تاریخ دریافت: ۸۹/۷/۴

تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۲/۲۸

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد صنایع غذایی، دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۲- استادیار، دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۳- استادیار، دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۴- استادیار، دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

\* مسئول مکاتبه: E-mail: Smjafari@gau.ac.ir

### چکیده

در این پژوهش میزان ترکیبات فنولی برگ زیتون دو واریته کرونایکی و روغنی به کمک حلال‌های آب، متانول ۸۰٪ و استون استخراج شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های حاصل با سه روش مهار رادیکال دی پی پی اچ، نیروی احیا کنندگی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تعیین و با آنتی‌اکسیدان‌های سنتتزی (BHT و BHA) مقایسه شدند. در ادامه اثر عصاره متانولی واریته کرونایکی بر پایداری اکسایشی روغن آفتابگردان با اندازه‌گیری دو فاکتور اندیس پروکسید و اسید تیوباربیتوریک بررسی شد. نتایج نشان داد بیشترین میزان ترکیبات فنولی ( $196/6 \pm 0/33$ ) میلی‌گرم معادل اسید تانیک در گرم عصاره و کمترین IC<sub>50</sub> در آزمون دی پی پی اچ ( $106/065 \pm 0/55$ ) میکروگرم در میلی‌لیتر، نیروی احیاکنندگی ( $258/137 \pm 0/16$ ) میکروگرم در میلی‌لیتر و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل ( $205/9 \pm 0/18$ ) میکروگرم در میلی‌لیتر) مربوط به عصاره متانولی واریته کرونایکی بود. همچنین عصاره متانولی کرونایکی در سطح ۱۰۰۰ پی پی ام به خوبی توانست اندیس پروکسید و اسید تیوباربیتوریک را کنترل کرده و جایگزین آنتی‌اکسیدان‌های سنتتزی بوتیله هیدروکسی آنیزول و بوتیله هیدروکسی تولوئن در دو سطح ۱۰۰ و ۲۰۰ پی پی ام شود.

واژه‌های کلیدی: برگ زیتون، ترکیبات فنولی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، روغن آفتابگردان

**Antioxidant Properties of Olive Leaf Extract and its Application in Sunflower Oil****Z Rafiei<sup>1</sup>, SM Jafari<sup>\*2</sup>, M Alami<sup>3</sup> and M Khomeiri<sup>4</sup>**

Received: 26 September, 2010

Accepted: 19 March, 2011

<sup>1</sup>MSc Graduate, Faculty of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran<sup>2</sup>Assistant Professor, Faculty of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran<sup>3</sup>Assistant Professor, Faculty of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran<sup>4</sup>Assistant Professor, Faculty of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

\*Corresponding author: E-mail: Smjafari@gau.ac.ir

**Abstract**

In this study the antioxidant properties and total phenolics content of methanol (80%), acetone and water extracts of olive leaves produced by maceration method were examined. Two varieties of olive including Koroneiki and Roghani were studied. Various experimental models including reducing power, total antioxidant capacity and DPPH radical scavenging activity were used for evaluation of antioxidant activity of extracts and compared with synthetic antioxidants (BHA and BHT). At the next stage, effect of methanol extract of Koroneiki on oxidative stability of sunflower were assessed using peroxide value and thiobarbitoric acid index. Results revealed that the highest phenolic content ( $196.6 \pm 0.33$  mg TAE/g extract) and the lowest  $IC_{50}$  in DPPH ( $106.065 \pm 0.55$   $\mu$ g/ml), reducing power ( $258.137 \pm 0.16$   $\mu$ g/ml) and total antioxidant capacity ( $205.9 \pm 0.18$   $\mu$ g/ml) indices were related to the methanol extract of Cronaiky. Also, methanolic extract of Cronaiky at 1000 ppm could control peroxide value and thiobarbitoric acid index and could be used instead of BHA and BHT at 100 and 200 ppm levels.

**Key words:** Antioxidant activity, olive leaf, phenolic compound, sunflower oil**مقدمه**

اکسایش عامل اصلی فساد چربی‌ها و روغن‌ها محسوب می‌شود. به همین دلیل آنتی‌اکسیدان‌ها برای جلوگیری از بدطعمی ناشی از اکسایش به این محصولات اضافه می‌شوند. <sup>۱</sup> BHA، <sup>۲</sup> BHT، <sup>۳</sup> TBHQ از مهمترین آنتی‌اکسیدان‌های فنولی سنتزی هستند (اسکین و رابینسون ۲۰۰۰). این ترکیبات فرار و حساس به گرما بوده و برای پایداری مواد غذایی مطلوب نیستند. از طرفی استفاده از آن‌ها سلامتی انسان را تهدید می‌کند (ایکس هو ۲۰۰۳). به این دلایل استفاده از مواد آنتی

اکسیدانی طبیعی که بتواند جایگزین انواع سنتزی شود و یا مصرف آن‌ها را کاهش دهد، بسیار مورد توجه قرار گرفته‌است. فنول‌ها یکی از مهمترین آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی بوده و موجب نگهداری غذاهای فراوری شده در برابر اکسایش می‌شوند (آنتوویچ و همکاران ۲۰۰۴).

برگ زیتون یکی از گیاهان دارویی می‌باشد که به خاطر ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی خود شناخته شده است. در بین بخش‌های مختلف درخت زیتون، برگ زیتون غنی‌ترین منبع ترکیبات فنولی و الئوروپین<sup>۴</sup> فراوان‌ترین ترکیب فنولی موجود در برگ می‌باشد. بنابراین این برگ‌ها منابع مفید و ارزان الئوروپین هستند (لوجان و

<sup>1</sup> . Butylated hydroxyanisole<sup>2</sup> . Butylated hydroxytoluene<sup>3</sup> .Tert-butyl hydroquinone<sup>4</sup>.Oleuropein

اکسیدانی کل بود. همچنین اثر عصاره متانولی بر پایداری اکسایشی روغن آفتابگردان (به دلیل محتوای بالای اسید لینولئیک) مورد ارزیابی قرار گرفت.

### مواد و روش ها

#### مواد شیمیایی

حلال های مصرفی از شرکت مجلی تهران و دیگر مواد شیمیایی مصرفی از نمایندگی های مرک و اپلیکم آلمان تهیه شدند.

#### آماده سازی برگ های زیتون

برگ های زیتون در اردیبهشت ماه سال ۸۸ از باغ زیتون جهاد کشاورزی کردکودی برداشت شد. بعد از برداشت برگ ها در سایه خشک و با استفاده از آسیاب (ساخت شرکت ایران خود ساز) پودر و از الک با مش ۴۰ عبور داده شد و تا زمان انجام آزمایشات بعدی در فریزر ۱۸- درجه سانتیگراد نگه داری شد.

#### استخراج ترکیبات فنولی با روش غرقابی

پودر برگ های زیتون دو وارسته کرونایکی (وارسته یونانی) و روغنی (وارسته ایرانی) با نسبت ۵۰:۱ با سه حلال متانول ۸۰ درصد، آب و استون به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط به خوبی مخلوط شد. عصاره های حاصل پس از صاف شدن با کاغذ صافی واتمن شماره ۱ توسط دستگاه تبخیرکننده چرخان (آی کا آ مدل آر وی بیسیک ۰۵) با دمای ۴۰ درجه سانتیگراد تغلیظ و با دستگاه خشک کن انجمادی (ساخت شرکت اپرون مدل اف دی بی ۵۵۰۳) خشک گردید. در نهایت میزان ترکیبات فنولی عصاره ها به روش فولین-سیوکالتو اندازه گیری (عربشاهی و اروج ۲۰۰۷) و میزان ترکیبات فنولی به صورت میلی گرم معادل اسید تانیک در گرم عصاره برگ زیتون بیان شد.

#### بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ها با آزمون های مختلف

از پودر خشک شده، غلظت های مختلفی (۱۰۰۰-۵۰ پی پی ام) آماده و فعالیت آنتی اکسیدانی آن ها، با سه روش DPPH<sup>۱</sup> (عربشاهی و اروج ۲۰۰۷)، نیروی احیا

همکاران ۲۰۰۶، محمد و همکاران ۲۰۰۶). از طریق هیدرولیز الئوروپین، ترکیبات دیگری هم از برگ استخراج شده اند که از لحاظ مقدار، کمتر از الئوروپین هستند. از جمله این ترکیبات می توان دی متیل الئوروپین، لیگستروزید، ورباسکوزید، الئوزید دی متیل استر، یک نوع اسکوئیریدوئید غیر گلیکوزیدی و الئوروزید را نام برد (گویندا ۲۰۰۶).

آتاوودی (۲۰۰۵) فعالیت آنتی اکسیدانی گیاهان دارویی آفریقا از جمله برگ زیتون آفریقایی را مورد مطالعه قرار داد و فعالیت آنتی اکسیدانی آن را خوب عنوان کرد.

در پژوهش دیگری، محمد و همکاران (۲۰۰۷) ظرفیت آنتی اکسیدانی گیاهان مناطق مدیترانه ای از جمله برگ زیتون را مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه مشخص شد بلوط اروپایی و برگ زیتون بیشترین مقدار آلفا توکوفرول را دارند. پتانسیل آنتی اکسیدانی بالای برگ های زیتون وارسته های تونسسی (بوعزیز و صیادی ۲۰۰۵) و پرتغالی (سیلوا و همکاران ۲۰۰۶) به ترتیب در برابر رادیکال های آزاد DPPH<sup>+</sup> و ABTS گزارش شده است. در مورد اثر عصاره برگ زیتون بر پایداری اکسایشی روغن های خوراکی، بوعزیز و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند غنی سازی روغن زیتون با عصاره برگ های زیتون موجب کاهش اندیس پراکسید و پایداری اکسایشی نسبت به نمونه شاهد شد. داده های سالتا و همکاران (۲۰۰۹) نیز بیانگر افزایش پایداری اکسایشی روغن های زیتون، پالم، آفتابگردان و یک شورتینینگ گیاهی غنی شده با ترکیبات فنولی برگ های زیتون (۲۰۰ میلی گرم / کیلوگرم) بود.

بنابراین با توجه به اینکه برگ زیتون به عنوان یک برگ همیشه سبز در تمام فصول سال به آسانی در دسترس بوده و یک ماده خام ارزان قیمت و غنی از ترکیبات فنولی می باشد، هدف از این پژوهش، استخراج ترکیبات فنولی برگ زیتون وارسته های کرونایکی و روغنی با سه حلال متانول ۸۰ درصد، آب و استون به روش غرقابی و بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ها با سه روش DPPH، نیروی احیا کنندگی و ظرفیت آنتی-

<sup>1</sup> 2,2'-diphenyl-1-picryl hydrazyl

درصد معنی دار بود. در مورد تأثیر وارپته ها به استثنای عصاره های متانولی، وارپته روغنی ترکیبات فنولی بیشتری را نسبت به وارپته کرونایکی استخراج کرد. در بین حلال ها، بیشترین و کمترین میزان استخراج به ترتیب مربوط به عصاره های متانولی و عصاره های استونی بود (جدول ۱) و به طور کلی بیشترین ( $\pm 0/33$ ) و کمترین ( $196/6$  میلی گرم معادل اسید تانیک در گرم عصاره) و ( $105/651 \pm 0/55$  میلی گرم معادل اسید تانیک در گرم عصاره) میزان ترکیبات فنولی به ترتیب در عصاره متانولی و استونی کرونایکی مشاهده شد.

میزان ترکیبات فنولی عصاره متانولی برگ های زیتون وارپته های پرتغالی  $40/1 - 11/7$  میلی گرم معادل اسید تانیک در هر گرم برگ گزارش شده است (سیلوا و همکاران ۲۰۰۶). به علاوه آلتیوک و همکاران (۲۰۰۸) میزان ترکیبات فنولی عصاره های آبی برگ های زیتون ترکیه را  $3/4$  میلی گرم معادل اسید تانیک در گرم برگ عنوان کردند.

استفاده از آب برای استخراج، یک محیط کاملاً قطبی ایجاد می‌کند. در نتیجه برخی از ترکیبات فنولی با درجه قطبیت پائین کمتر استخراج می‌شوند. علاوه بر این عصاره‌های آبی حاوی ناخالصی‌هایی نظیر اسیدهای آلی، پروتئین‌ها و قندهای محلول می باشند (چرینوس و همکاران ۲۰۰۷) اما اتانول و متانول همراه با آب توانایی بیشتری در استخراج ترکیبات فنولی دارند (سوزوکی و همکاران ۲۰۰۲). با توجه به این موارد، علت میزان بالای استخراج ترکیبات فنولی در عصاره‌های متانولی نسبت به آب توجیه می‌شود. از طرفی چون استون یک حلال غیرقطبی می‌باشد، برای استخراج ترکیبات قطبی از جمله فنول‌ها مناسب نبود.

در استخراج ترکیبات فنولی عصاره‌های کاکل ذرت (محسن و آمار ۲۰۰۹) و برگ های چای (جان و همکاران ۲۰۰۶) نتایج مشابهی گزارش شده است.

کنندگی (بیلدریم و همکاران ۲۰۰۰) و ظرفیت آنتی-اکسیدانی کل (پریتو و همکاران ۱۹۹۹) تعیین و با آنتی-اکسیدان های سنتزی BHA و BHT مقایسه شد. در ادامه، نمودار فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ها در برابر میزان ترکیبات فنولی از طریق نرم افزار Excel رسم و معادلات خط و ضرایب تبیین ( $R^2$ ) مربوطه مشخص گردید.

### بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی در روغن آفتابگردان

روغن آفتابگردان بدون آنتی‌اکسیدان و اسید سیتریک از کارخانه پرتو دانه خزر بهشهر خریداری گردید. عصاره متانولی وارپته کرونایکی در سه سطح ۲۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ پی پی ام و آنتی‌اکسیدان های سنتزی (BHT و BHA) در دو سطح ۱۰۰ و ۲۰۰ پی پی ام به خوبی به کمک همزن مغناطیسی (آی کا آ مدل آر اچ پی ۲) به مدت ۳۰ دقیقه با روغن مخلوط شد. نمونه های روغن در آون (ممرت مدل یو ال ام ۴۰۰) با دمای ۷۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۲ روز قرار داده شد و اندازه گیری اندیس پراکسید (AOAC ۱۹۹۰) و اسید تیو باربیتوریک (گلی و همکاران ۲۰۰۵) در روزهای ۰، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰ و ۱۲ صورت گرفت.

### آنالیز آماری

نتایج به دست آمده با استفاده از روش آنالیز واریانس (ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ( $P < 0/05$ ) صورت گرفت. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SAS صورت گرفت.

### نتایج و بحث

#### تأثیر وارپته و حلال بر میزان ترکیبات فنولی

توضیح عبارات اختصاری و میزان ترکیبات فنولی عصاره ها به ترتیب در جدول ۱ و ۲ ارائه شده است. با توجه به نتایج تجزیه واریانس اثر وارپته، حلال و اثر متقابل این دو فاکتور بر میزان ترکیبات فنولی در سطح ۵

## جدول ۱- تعریف عبارات اختصاری.

عصاره متانولی واریته کرونایکی	CM
عصاره متانولی واریته روغنی	RM
عصاره آبی واریته کرونایکی	CW
عصاره آبی واریته روغنی	RW
عصاره استونی واریته کرونایکی	CA
عصاره استونی واریته روغنی	RA

## جدول ۲- میزان ترکیبات فنولی عصاره ها (میلی گرم معادل اسید تانیک در گرم عصاره).

عصاره ها	میزان ترکیبات فنولی
CM	<sup>a</sup> ۱۹۶/۶۰ ± ۰/۳۳
RM	<sup>b</sup> ۱۸۸/۸۳ ± ۰/۲۶
CW	<sup>d</sup> ۱۶۲/۸۸ ± ۰/۳۵
RW	<sup>c</sup> ۱۶۵/۷۹ ± ۰/۳۵
CA	<sup>f</sup> ۱۰۵/۶۵ ± ۰/۵۵
RA	<sup>e</sup> ۱۲۴/۴۱ ± ۰/۷۶

حرف مشابه نشانگر عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد می باشد.

## آزمون DPPH

می باشد. عصاره متانولی واریته کرونایکی با IC<sub>50</sub> برابر با ۱۰۶/۰۶۵ ± ۰/۵۵ میکروگرم در میلی لیتر بهترین عصاره در مهار این رادیکال بود اما عصاره های آبی و استونی واریته روغنی نسبت به کرونایکی توانایی بیشتری در مهار رادیکال داشتند (جدول ۳).

جدول ۳، IC<sub>50</sub> عصاره ها در آزمون های مختلف بر حسب میکروگرم در میلی لیتر را نشان می دهد. IC<sub>50</sub> بیانگر غلظتی از عصاره است که برای مهار ۵۰ درصد رادیکال های آزاد DPPH مورد نیاز می باشد. IC<sub>50</sub> کمتر نشان دهنده قدرت آنتی اکسیدانی بالای عصاره مربوطه

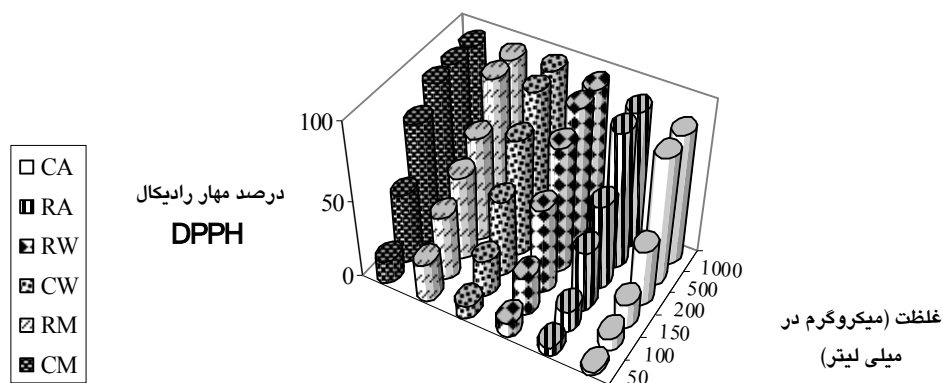
جدول ۳- IC<sub>50</sub> عصاره ها در آزمون های مختلف.

آنتی اکسیدان ها	مهار رادیکال DPPH	قدرت احیاکنندگی	ظرفیت آنتی اکسیدانی کل
CM	<sup>f</sup> ۱۰۶/۰۶۵ ± ۰/۵۵	<sup>f</sup> ۲۵۸/۱۳۷ ± ۰/۱۶	<sup>f</sup> ۲۰۵/۹ ± ۰/۱۸
RM	<sup>e</sup> ۱۲۹/۲۶۴ ± ۰/۸۲	<sup>e</sup> ۲۷۹/۲۸۵ ± ۰/۲۵	<sup>e</sup> ۲۲۴/۲۶۶ ± ۰/۳۲
CW	<sup>c</sup> ۱۴۹/۰۷۹ ± ۰/۵۶	<sup>d</sup> ۳۱۷/۱۱۱ ± ۰/۱۶	<sup>d</sup> ۳۷۵/۸۸۸ ± ۰/۱۶
RW	<sup>d</sup> ۱۳۹/۶۳ ± ۰/۵۴	<sup>c</sup> ۳۶۱/۰۰ ± ۰/۴	<sup>d</sup> ۳۷۷/۱۳۳ ± ۰/۱۳
CA	<sup>a</sup> ۲۷۷/۰۴۱ ± ۰/۵۸	<sup>a</sup> ۶۰۸/۷۱۴ ± ۰/۲۹	<sup>a</sup> ۶۱۵/۴۱۶ ± ۰/۲۶۷
RA	<sup>b</sup> ۱۸۳/۲۱۷ ± ۰/۰۴	<sup>b</sup> ۵۸۹/۳۷۵ ± ۰/۷۲	<sup>b</sup> ۵۰۸/۶۱۱ ± ۰/۲۱
BHA	<sup>g</sup> ۸۹/۰۵۸ ± ۰/۳۸	<sup>g</sup> ۲۰۵/۵۴۹ ± ۰/۶۵	<sup>c</sup> ۴۲۲/۳۰۷ ± ۰/۵
BHT	<sup>h</sup> ۴۱/۶۰۲ ± ۰/۴۲	<sup>h</sup> ۵۹/۱۵۴ ± ۰/۱۹	<sup>g</sup> ۱۷۹/۴۳۲ ± ۰/۱

حروف مشابه در هر ستون نشانگر عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد می باشند.

از افزایش قدرت مهار رادیکال DPPH همراه با افزایش غلظت بود (شکل ۱).

به طور کلی از نظر مهار رادیکال DPPH، عصاره های متانولی بیشترین و عصاره های استونی کمترین قدرت آنتی اکسیدانی را دارا بودند. علاوه بر این داده ها حاکی



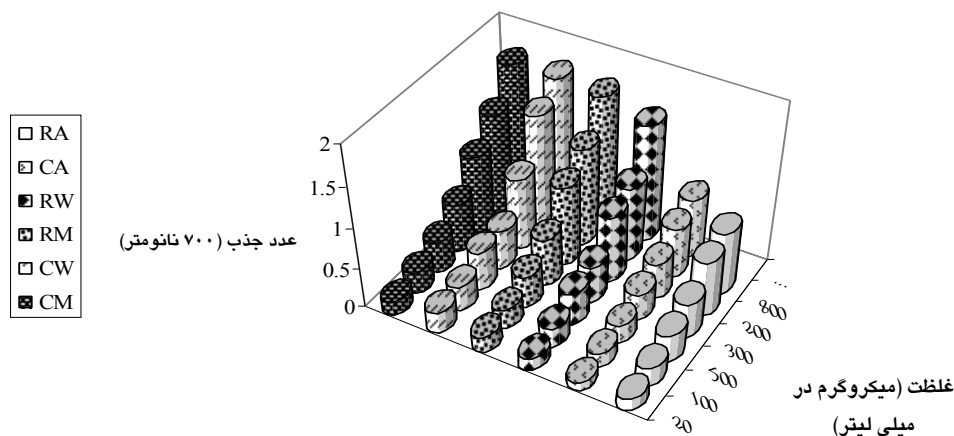
شکل ۱- اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌ها بر میزان مهار رادیکال DPPH.

بالاترین قدرت احیاکنندگی مربوط به عصاره متانولی کرونایکی ( $258/137 \pm 0/16$  میکروگرم در میلی لیتر) بود. در بین عصاره‌های آبی، واریته کرونایکی ( $1/16 \pm 317/111$  میکروگرم در میلی لیتر) و در بین عصاره‌های استونی، واریته روغنی ( $608/714 \pm 0/29$  میکروگرم در میلی لیتر) فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به سایر عصاره‌ها نشان دادند. شکل ۲، نشان دهنده وجود رابطه مستقیم بین افزایش غلظت عصاره و فعالیت آنتی-اکسیدانی است. همچنین همه عصاره‌ها،  $IC_{50}$  بیشتری نسبت به BHT ( $59/154 \pm 0/19$  میکروگرم در میلی لیتر) و BHA ( $205/549 \pm 0/65$  میکروگرم در میلی لیتر) داشتند.

در مقایسه با آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی همه عصاره‌های مورد آزمون،  $IC_{50}$  بیشتری نسبت به BHT ( $0/42 \pm 41/602$  میکروگرم در میلی لیتر) و BHA ( $0/28 \pm 89/058$  میکروگرم در میلی لیتر) داشتند. در پژوهش بوعزیز و صیادی (۲۰۰۵).  $IC_{50}$  عصاره هیدرولیزی، عصاره اتیل استات و عصاره متانولی واریته‌های تونسوی برگ زیتون به ترتیب برابر با  $0/65$ ،  $1/25$  و  $1/57$  میکروگرم در هر میلی لیتر گزارش شد که با داده‌های این پژوهش متفاوت است. دلیل این اختلاف را می‌توان به تفاوت در نوع واریته و ترکیبات فنولی، شرایط اقلیمی و... نسبت داد.

#### نیروی احیاکنندگی

در این آزمون، منظور از  $IC_{50}$  غلظتی است که جذب عصاره به نیم برسد. با توجه به داده‌های جدول ۳،

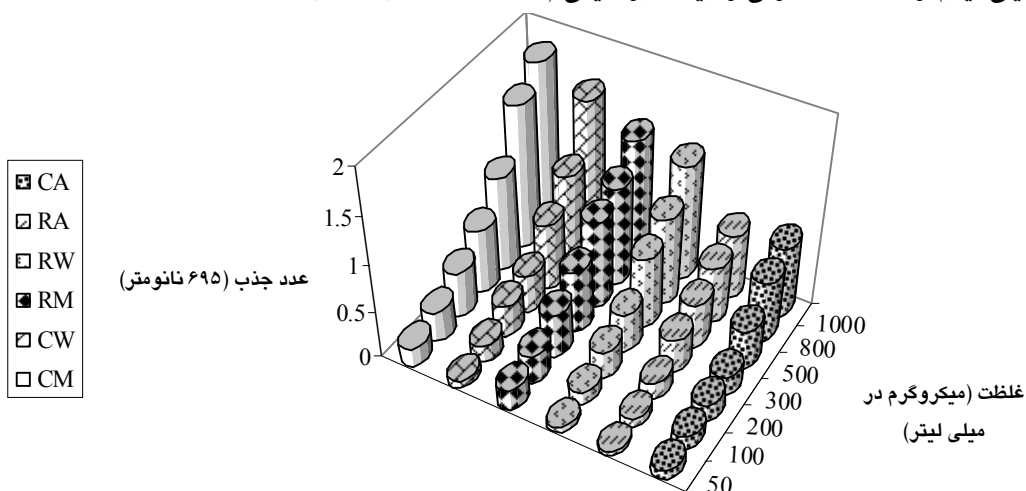


شکل ۲- اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌ها بر نیروی احیاکنندگی.

## ظرفیت آنتی اکسیدانی کل

در این آزمون هم،  $IC_{50}$  بیانگر غلظتی است که میزان جذب به عدد نیم برسد. با توجه به اطلاعات جدول ۳، بیشترین و کمترین ظرفیت آنتی اکسیدانی به ترتیب مربوط به عصاره متانولی ( $205/9 \pm 0/18$ ) میکروگرم در میلی لیتر) و عصاره استونی واریته کرونایکی ( $1/267 \pm$ )

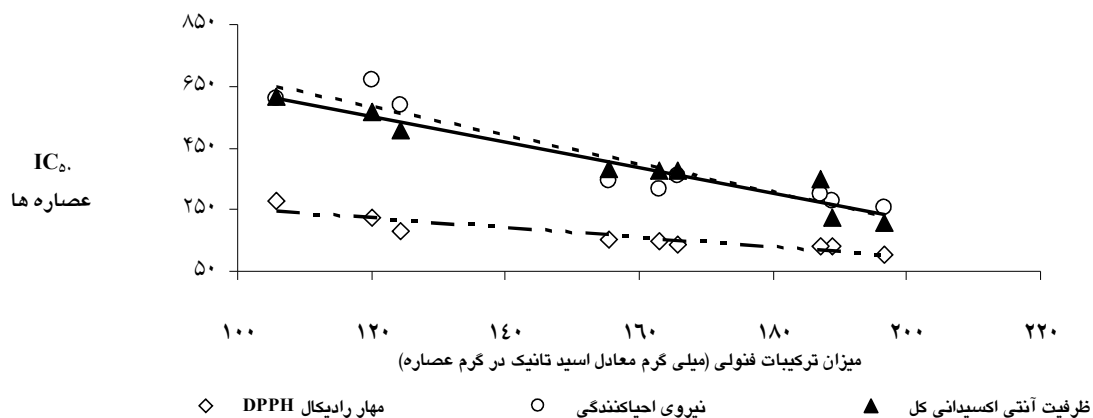
در این آزمون هم،  $IC_{50}$  بیانگر غلظتی است که میزان جذب به عدد نیم برسد. با توجه به اطلاعات جدول ۳، بیشترین و کمترین ظرفیت آنتی اکسیدانی به ترتیب مربوط به عصاره متانولی ( $205/9 \pm 0/18$ ) میکروگرم در میلی لیتر) و عصاره استونی واریته کرونایکی ( $1/267 \pm$ )



شکل ۳- اثر غلظت های مختلف عصاره ها بر ظرفیت آنتی اکسیدانی کل.

۴ نشان داده شده است. در هر سه مورد رابطه خطی منفی بین  $IC_{50}$  و ترکیبات فنولی وجود داشت به این معنا که هر چه میزان ترکیبات فنولی کمتر باشد،  $IC_{50}$  افزایش و در نتیجه فعالیت آنتی اکسیدانی کاهش می یابد.

در مقایسه با آنتی اکسیدان های سنتزی، به استثنای عصاره های استونی، سایر عصاره ها فعالیت آنتی-اکسیدانی بیشتری نسبت به BHA داشتند اما هیچ یک از عصاره ها قابل رقابت با BHT نبودند. رابطه بین میزان ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی-اکسیدانی هر سه مورد آزمون در شکل ۴ و جدول



شکل ۴- ارتباط بین  $IC_{50}$  و میزان ترکیبات فنولی عصاره ها در آزمون های مختلف.

بقیه موارد، ارتباط خطی بین میزان ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی اکسیدانی بخش های مختلف درخت زیتون وجود دارد. وجود این ارتباط توسط کاتسوب و همکاران (۲۰۰۴) و دجریان و همکاران (۲۰۰۶) نیز به اثبات رسیده است.

با توجه به معادلات ارائه شده در جدول ۴، ۸۷ درصد فعالیت آنتی اکسیدانی در مهار رادیکال DPPH، ۸۹ درصد نیروی احیا کنندگی و ۹۴ درصد ظرفیت آنتی-اکسیدانی کل مربوط به ترکیبات فنولی بود. سیلوا و همکاران (۲۰۰۶) نیز گزارش کردند به استثنای هسته در

جدول ۴- معادلات خط مربوط به ارتباط بین میزان ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ها

معادله خط	(R <sup>2</sup> )	نوع آزمون
$y = -1/52325x + 405/82$	۰/۸۷۸۱	مهار رادیکال DPPH
$y = -4/6033x + 1133/6$	۰/۸۹۱۲	نیروی احیا کنندگی
$y = -4/1613x + 1051/2$	۰/۹۴۰۷	ظرفیت آنتی اکسیدانی کل

میزان ترکیبات فنولی، در بین واریته های مورد آزمون می باشد (تو و همکاران، ۲۰۱۰).

از طرفی، فعالیت آنتی اکسیدانی مواد فیتوشیمیایی گیاهان به واسطه جلوگیری از تشکیل یا خنثی سازی و مهار رادیکال های آزاد، احیا کردن این ترکیبات، شلاته کردن فلزات و ... می باشد (آمیک و همکاران ۲۰۰۳). نحوه آماده سازی، شرایط واکنش، نوع سوبسترا و آزمون و بسیاری از فاکتورها از دیگر دلایل اختلاف نتایج تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی با روش های مختلف می باشند (کولایی و همکاران ۲۰۰۳). اختلاف نتایج بین واریته ها و روش های مختلف سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی در مورد دارچین (پراسد و همکاران ۲۰۰۹) و چای (ترکمن و همکاران ۲۰۰۶) نیز گزارش شده است. در مورد دارچین بیشترین میزان ترکیبات فنولی مربوط به عصاره های واریته بورمانی بود اما از نظر مهار رادیکال DPPH، قدرت احیا کنندگی، ظرفیت آنتی اکسیدانی کل، واریته زیکانیکا بهترین عصاره معرفی شد. همچنین توانایی به دام اندازی رادیکال DPPH توسط عصاره حاصل از استون ۵۰ درصد واریته بلک و عصاره اتانول ۵۰ درصد واریته بلک میت بیشتر از بقیه عصاره ها بود.

**اثر عصاره متانولی واریته کرونایکی بر پایداری اکسایشی روغن آفتابگردان**

همان طور که ملاحظه شد، عصاره متانولی واریته کرونایکی بیشترین میزان ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی-

همانطور که مشاهده شد، عصاره های استخراج شده با حلال های قطبی نسبت به استون قدرت آنتی اکسیدانی و بازده استخراج بالاتری داشتند. آیکبال و بنجر (۲۰۰۷) عنوان کردند عصاره متانولی سیر بالاترین فعالیت آنتی-اکسیدانی و بازده استخراج را نسبت به حلال های دیگر (اتانول، استون، اتیل استات، n- هگزان) داشت که در تطابق با نتایج این پژوهش می باشد. با وجودیکه افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی به حضور آنتی اکسیدان ها به ویژه ترکیبات فنولی نسبت داده می شود (چو و همکاران ۲۰۰۲) اما میزان فعالیت آنتی اکسیدانی بسته به ساختمان شیمیائی این ترکیبات متفاوت است. علاوه بر این در طی فرآیند استخراج ترکیبات دیگری نظیر اسید اسکوربیک، اسیدهای آمینه، پروتئین ها و قندها که خود اهداء کننده ی الکترون می باشند، همراه با ترکیبات فنولی وارد عصاره می شوند. بنابراین مشخص شد ۱۳ درصد مهار رادیکال DPPH، ۱۱ درصد قدرت احیا کنندگی و ۶ درصد ظرفیت آنتی اکسیدانی کل مربوط به سایر آنتی-اکسیدان ها و برهم کنش بین این ترکیبات بود.

علاوه بر موارد ذکر شده، مقدار ترکیبات فنولی بافت های گیاهی تحت تاثیر فاکتورهای ژنتیکی، میزان تابش نور خورشید، شرایط خاک، شرایط محیطی و آب و هوایی، عملیات پس از برداشت و شرایط نگهداری می باشد (فالر و فیالهو ۲۰۰۹). اختلاف در نوع این ترکیبات نیز یکی دیگر از عوامل وجود اختلاف معنی دار از نظر



عصاره در پایش اکسایش روغن آفتابگردان بررسی شد. پراکسید پایین تری نسبت به آنتی اکسیدان های سنتزی مشاهده شد.

#### اندیس اسید تیوباربتوریک

بررسی نتایج آنالیز واریانس و نیز مقایسه میانگین تیمارهای مختلف نشان داد که اثر تیمار و زمان بر اندیس اسید تیوباربتوریک در سطح احتمال پنج درصد معنی دار می باشد. طبق داده های جدول ۵، بالاترین میزان اندیس اسید تیوباربتوریک (۲۳۴/۰ میلی گرم مالون آلدئید در کیلوگرم روغن)، در نمونه شاهد مشاهده شد در حالیکه کمترین اندیس اسید تیوباربتوریک (۱۳۵/۰ میلی گرم مالون آلدئید در کیلوگرم روغن) مربوط به ۱۰۰۰- CM بود. ۱۰۰۰- CM با هر دو سطح آنتی-اکسیدان های سنتزی مورد آزمون، ۲۰۰- CM با BHA و BHT در سطح ۱۰۰ پی پی ام و ۵۰۰- CM به استثنای ۲۰۰- BHT با دیگر موارد قابل رقابت بود.

اکسیدانی را داشت. به این دلیل، در ادامه تأثیر این مقادیر به کار رفته بعد از عبارت اختصاری نیز بیانگر غلظت عصاره در روغن می باشد.

#### اندیس پراکسید

بررسی نتایج آنالیز واریانس و نیز مقایسه میانگین نشان داد که اثر تیمار و زمان بر اندیس پراکسید در سطح احتمال پنج درصد معنی دار می باشد. جدول ۵ میانگین کلی اعداد پراکسید و اسید تیوباربتوریک در طی شش روز اندازه گیری را نشان می دهد. با توجه به داده های این جدول، کمترین و بیشترین اندیس پراکسید به ترتیب مربوط به ۱۰۰۰- CM (۸۳/۴۲۸ میلی اکی والان در کیلوگرم روغن) و نمونه شاهد (۱۷۱/۸۱ میلی اکی والان در کیلوگرم روغن) بود. غلظت های بالای عصاره در پایش اندیس پراکسید موفق تر عمل کردند. ۲۰۰- CM، قابل رقابت با هیچ یک از آنتی-اکسیدان های سنتزی نبود در حالیکه ۱۰۰۰- CM توانست جایگزین BHA و BHT در هر دو سطح مورد بررسی شود. در مورد ۵۰۰- CM به استثنای ۲۰۰- BHT اندیس

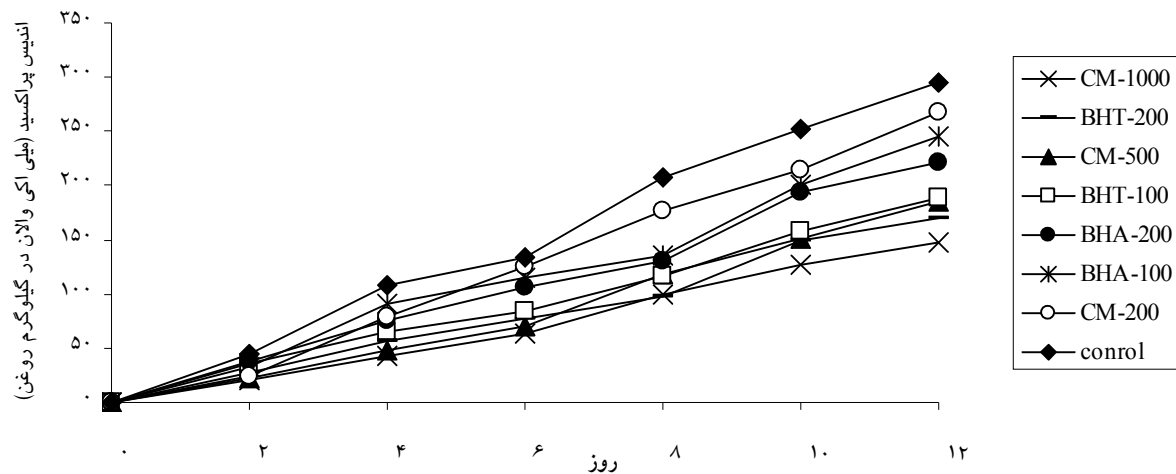
جدول ۵- میانگین اندیس پراکسید و اسید تیوباربتوریک تیمارهای مختلف.

تیمار ها	اندیس پراکسید	اندیس اسید تیوباربتوریک
نمونه کنترل	۱۷۱/۸۱ <sup>a</sup>	۰/۲۳۴ <sup>a</sup>
CM-۲۰۰	۱۴۷/۷۴ <sup>b</sup>	۰/۱۵۶ <sup>d</sup>
CM-۵۰۰	۹۸/۹۸۶ <sup>f</sup>	۰/۱۴۴ <sup>f</sup>
CM-۱۰۰۰	۸۳/۴۲۸ <sup>h</sup>	۰/۱۳۵ <sup>h</sup>
BHA-۱۰۰	۱۳۶/۷۱ <sup>c</sup>	۰/۱۸۲ <sup>b</sup>
BHA-۲۰۰	۱۲۷/۵ <sup>d</sup>	۰/۱۵۴ <sup>e</sup>
BHT-۱۰۰	۱۰۸/۳۴ <sup>e</sup>	۰/۱۵۷ <sup>c</sup>
BHT-۲۰۰	۹۶/۱۴۸ <sup>g</sup>	۰/۱۴ <sup>g</sup>

حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد می باشد.

تیوباربتوریک افزایش و در نتیجه فعالیت آنتی اکسیدانی کاهش یافت (شکل ۵ و ۶).

با افزایش زمان نگهداری نمونه های روغن در شرایط اکسایش، میزان اندیس پراکسید و اندیس اسید



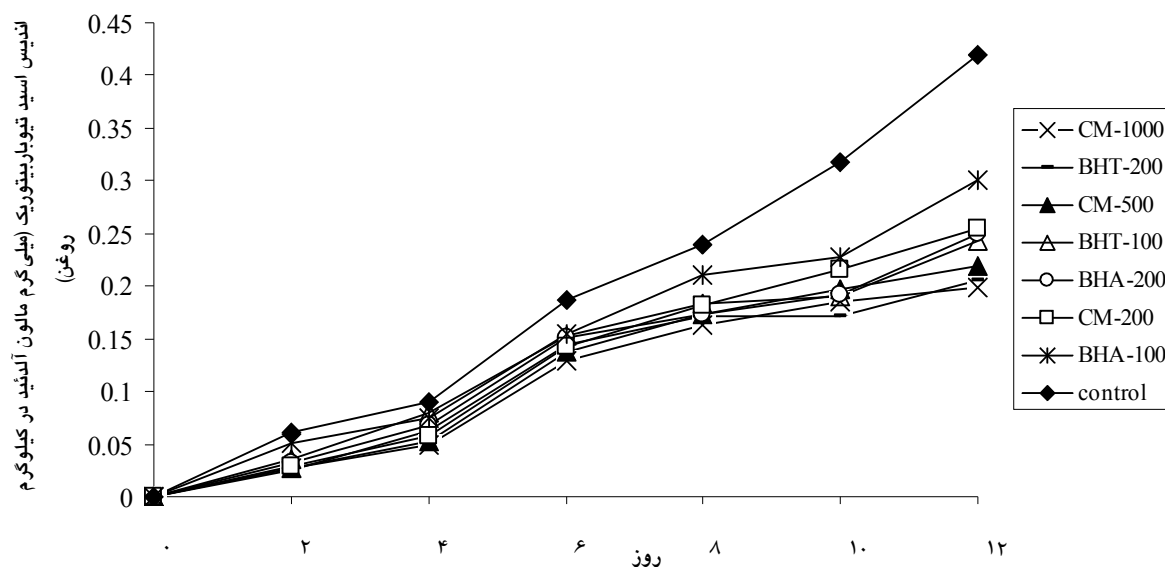
شکل ۵- اندیس پراکسید تیمارها در روزهای مختلف اندازه گیری.

با ۴۰۰ پی پی ام عصاره متانولی برگ زیتون به ترتیب از ۱۵/۹ به ۸۲۰ و ۶۳۰ میلی اکی والان در کیلوگرم روغن رسید.

داده‌های پژوهش فاراگ و همکاران (۲۰۰۵)، بیانگر کاهش اندیس پراکسید روغن آفتابگردان از ۴۳ به ۳۳ میلی اکی والان گرم در کیلوگرم روغن و اندیس اسید تیوباربتوریک از ۲/۳ به ۰/۸ میلی گرم مالون آلدئید در کیلوگرم روغن در حضور ۸۰۰ پی پی ام عصاره برگ زیتون بود.

در مورد سایر گیاهان نیز نتایج مشابهی مشاهده شده است. عماد (۲۰۰۶) گزارش کرد عصاره پوست انگور به دلیل وجود ترکیبات فنولی بیشتر اثرات آنتی اکسیدانی بهتری نسبت به عصاره دانه در روغن آفتابگردان نشان داد. همچنین مشخص شد که فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ی سیر بر پایداری روغن آفتابگردان در غلظت ۱۰۰۰ پی پی ام در مقایسه با BHA و BHT در غلظت ۲۰۰ پی پی ام بیشتر بود (شهد و بنگر ۲۰۰۷).

در روزهای ابتدایی فعالیت آنتی‌اکسیدانی غلظت‌های مختلف عصاره، تفاوت زیادی با هم نداشت اما در روزهای آخر این تفاوت افزایش یافته و عصاره در غلظت ۲۰۰ نسبت به ۱۰۰۰ کاهش بیشتری در فعالیت آنتی-اکسیدانی نشان داد (شکل ۵ و ۶). به دلیل اینکه مالون آلدئید از محصولات ثانویه اکسایش بوده و از تجزیه محصولات اولیه از جمله پراکسیدها به دست می‌آید، عکس اندیس پراکسید با سرعت کمتری افزایش یافت و این افزایش در روزهای پایانی بیشتر مشهود بود. اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها در مورد اندیس پراکسید و اسید تیوباربتوریک در تمام روزها مشابه یکدیگر نبود. دلیل این امر این است که یکسری از ترکیبات آنتی-اکسیدانی از شروع واکنش اکسایش و تشکیل پراکسید جلوگیری می‌کنند اما بعضی دیگر، تجزیه پراکسیدها و تشکیل محصولات ثانویه را به تعویق می‌اندازند. بوعزیز و همکاران (۲۰۰۸) نیز گزارش کردند که بعد از ۶ ماه نخیره سازی روغن زیتون در ۵۰ درجه سانتیگراد، عدد پراکسید نمونه کنترل و نمونه تیمار شده



شکل ۶- اندیس اسید تیوباربیئوریک تیمارها در روزهای مختلف اندازه گیری.

در بین واریته‌ها، واریته روغنی و در بین حلال‌ها، متانول بیشترین میزان استخراج ترکیبات فنولی به خود اختصاص دادند. در بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی کمترین  $IC_{50}$  در آزمون DPPH، نیروی احیاکنندگی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل مربوط به عصاره متانولی واریته کرونایکی بود. نتایج داده‌های پایداری اکسایشی در حضور عصاره متانولی کرونایکی نشان داد اندیس پراکسید و اسید تیوباربیئوریک با افزایش زمان نگهداری نمونه‌ها در شرایط اکسایش و همچنین با کاهش غلظت عصاره‌ها افزایش یافت. در بین عصاره‌ها، شاهد بیشترین اثر آنتی‌اکسیدانی در سطح ۱۰۰۰ پی پی ام بودیم و این عصاره قابل رقابت با BHA و BHT در هر دو سطح مورد آزمون بود. بنابراین می‌تواند جایگزین این ترکیبات در روغن‌های خوراکی شود.

سینگ و همکاران (۲۰۰۷) اثرات آنتی‌اکسیدانی اسانس برگ دارچین را در روند اکسیداسیون روغن خردل و تشکیل پراکسید و تیوباربیئوریک اسید مورد بررسی قرار دادند و نتایج حاکی از آن بود که اسانس در سطح غلظتی ۰/۰۲ درصد اثرات قوی تری نسبت به پروپیل گالات دارد. در پژوهش دیگری که توسط شهسواری و همکاران (۲۰۰۸) انجام گرفت، فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس *Zataria multiflora* را در روغن سویای خام، با کنترل دو عدد پراکسید و تیوباربیئوریک اسید بررسی شد. نتایج نشان داد که این اسانس در سطح غلظتی ۰/۱ درصد دارای اثر آنتی‌اکسیدانی معادل BHA در غلظت ۰/۰۲ می‌باشد.

#### نتیجه گیری کلی

#### منابع مورد استفاده

- Altioek E, Baycin D, Bayraktar O and Ulku S, 2008. Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea* L.) by adsorption on silk fibroin. Separation and Purification Technology 62: 342- 348.
- Amic D, Davidovic-Amic D, Beslo D, Trinajstic N, 2003. Structure- radical scavenging activity relationship of flavonoids. Croatia Chemistry Acta 76: 55-61.

- Antolovich M, Bedgood DJR, Bishop A, Jardine D, Prenzler P and Robards K, 2004. LC-MS investigation of oxidation products of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 962-971.
- AOAC, 1990. *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists, 15th ed. Washington, DC, USA.
- Arabshahi S and Urooj A, 2007. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. *Food Chemistry* 102: 1233-1240.
- Atawodi SE, 2005. Antioxidant potential of African medicinal plants. *African Journal of Biotechnology* 4: 128 -133.
- Bouaziz M and Sayadi S, 2005 Isolation and evaluation of antioxidants from leaves of a Tunisian cultivar olive tree. *European Journal of Lipid Science and Technology* 107: 497-504.
- Bouaziz M, Fki I, Jemai H, Ayadi M and Sayadi S, 2008. Effect of storage on refined and husk olive oils composition:stabilization by addition of natural antioxidants from *Chemlali* olive leaves. *Journal of Food Chemistry* 108: 253-262.
- Chirinos R, Rogez H, Campos D, Pedreschi R and Larondelle Y, 2007. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavon) tubers. *Separation and Purification Technology* 55: 217-225.
- Chu Y, Sun J, Wu X and Liu R, 2002. Antioxidant and antiproliferative activity of common vegetable. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 6910-6916.
- Djeridane A, Yousif M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P and Vidal N, 2006. Antioxidant activity of some Algerian medical plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry* 97: 654-660.
- Emad S, 2006. Antioxidant effect of extracts from red grape seed and peel on lipid oxidation in oils of sunflower. *LWT-Food Science and Technology* 39: 883-92.
- Eskin NAM and 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.
- Faller ALK and Fialho E, 2009. The antioxidant capacity and polyphenol content of organic and conventional retail vegetables after domestic cooking. *Food Research International* 42: 210-215.
- Farag RS, Mahmoud EA and Basuny AM, 2007. Use crude olive leaf juice as a natural antioxidant for the stability of sunflower oil during heating. *International Journal of Food Science and Technology* 42: 107-115.
- Goli AH, Barzegar M and Sahari MA, 2005. Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. *Food Chemistry* 92: 521-525.
- Guinda A, 2006. Use of solid residue from the olive industry. *Grasas Y Aceites* 57: 107-115.
- Iqbal S and Bhangar MI, 2007. Stabilization of sunflower oil by garlic extract during accelerated storage. *Food Chemistry* 100: 246-254.
- John KMM, Vijayan D, Kumar RR and Premkumar R, 2006. Factors influencing the efficiency of extraction of polyphenols from young tea leaves *Asian Journal of Plant Sciences* 5: 123-126.
- Katsub T, Tabata H, Ohta Y, Yamasaka Y, Anuurad E and Shiwaku K, 2004. Screening for antioxidant activity in edible plant products: Comparison of low - density lipoprotein oxidation assay, DPHH radical scavenging assay, and Foline - Ciocalteu assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:2391-2396.

- Kolayli S, Kucuk M, Duran C, Candan F and Dincer F, 2003. Chemical and antioxidant properties of *Laucerasus officinalis* Roem. (Cherry Laurel) fruit grown in Black sea region. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51: 7489-7494.
- Lujan RJ, Rodriguez JML and Castro MDL, 2006. Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. Journal of Chromatography A 1108: 76-82.
- Mohamed R, Pineda M and Aguilar M, 2007. Antioxidant capacity of extracts From wild and crop plants of mediterranean region. Journal of Food Science 72: 59-63.
- Mohsen SM and Ammar ASM, 2009. Total phenolic contents and antioxidant activity of corn tassel extracts. Food Chemistry 112: 595-598.
- Prasad KN, Yang B, Dong X, Jiang G, Zhang H, Xie H and Jiang Y, 2009. Flavonoid contents and antioxidant activities from Cinnamomum species. Innovative Food Science and Emerging Technologies 10: 627-632.
- Prieto P, Pineda M and Aguilar M, 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. Analytical Biochemistry 269: 337-341.
- Salta FN, Mylona A, Chiou A, Boskou G and Andrikopoulos NK, 2009. Oxidative stability of edible vegetable oils enriched in polyphenols with olive leaf extract. Food Science and Technology International 13: 413-421.
- Shahid I and Bhangar M, 2007. Stabilization of sunflower oil by garlic extract during accelerated storage. Food Chemistry 100: 246 - 54.
- Shahsavari N, Barzegar M, Sahari MA and Naghdibadi H, 2008. Antioxidant activity and chemical characterization of essential oil of *Bunium persicum*. Plant Foods Human Nutrition 63: 183-88.
- Silva S, Gomes, L, Leitão F, Coelho AV and Boas LV, 2006. Phenolic compounds and antioxidant activity of *olea europaea* l. fruits and leaves. Food Science and Technology International 12: 385-396.
- Singh G, Maurya S and Delampasona MP, 2007. A comparison of chemical antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. Food and Chemical Toxicology 45: 1650-1661.
- Suzuki M, Watanabe T, Miura A, Harashima E, Nakagawa Y and Tsuji, K, 2002. An extraction solvent optimum for analyzing polyphenol contents by Folin-Denis assay. Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi 49: 507-511.
- Thoo YY, Ho SK, Liang JY, Ho CW and Tan CP, 2010. Effects of binary solvent extraction system, extraction time and extraction temperature on phenolic antioxidants and antioxidant capacity from mengkudu (*Morinda citrifolia*). Food Chemistry 120: 290-295.
- Turkmen N, Sari F and Velioglu YS, 2006. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. Food Chemistry 99: 835-841.
- Yildirim A, Mavi A, Oktay AA, Algur OF and Bilaloglu V, 2000. Comparison of antioxidant and antimicrobial activity of tilia (*Tilia argenta* Desf. Ex. D.C.), sage (*Salvia triloba* L.) and black tea (*Camellia sinensis* L.) extracts. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48: 5030-5034.
- X Hou D, 2003. Potential mechanisms of cancer chemoprevention by anthocyanins. Current Molecular Medicine 3: 149-159.