نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۲۴ شماره ۱/ سال ۱۳۹۳

شناسایی ترکیبات فنولی عصاره برگ درخت نیم به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و ارزیابی قدرت آنتی‌اکسیدانی آنها

فاطمه رحمانی*[۱]، محمد حسین حداد خداپرست[۲]، امیر حسین الهامی راد[۳] و فرهاد خانزاده[۴]

تاریخ دریافت: ۹۲/٤/٤ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۰/۹

[۱] دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار
[۲] استاد گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه فردوسی مشهد
[۳] استادیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار
[٤] دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار
* مسئول مکاتبه: E-mail: f1991.rahmani@yahoo.com

چکیده

عصاره‌گیری از برگ درخت نیم *(Azadirachta indica L.)* با منشاء کشور هندوستان، با استفاده از دو حلال متانول ۸۰٪ و آب و به سه روش دکوکشن، پرکولاسیون و ماسریشن انجام گردید. تعیین محتوی کل ترکیبات فنولی عصاره ها به روش فولین سیو کالتیو نشان می داد که استفاده از متانول ۸۰٪ به مدت ۷ روز (روش ماسریشن) بیشترین استخراج ترکیبات فنولی را سبب خواهد شد. این در حالی است که تعیین میزان روبش رادیکال آزاد عصاره ها به روش DPPH نشان می داد که عصاره بدست آمده با استفاده از متانول ۸۰٪ به مدت ۲٤ ساعت (روش پرکولاسیون) دارای بیشترین قدرت روبش رادیکال‌های آزاد بوده و به عنوان موثرترین عصاره در نظر گرفته می‌شود. تعیین هویت ترکیبات فنولی موجود در عصاره مذکور به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا بصورت کمی و کیفی نشان می داد که نیمبولید با ۲۸۹٦/۰۵ میلی گرم به ازاء ۱۰۰ گرم عصاره، عمده‌ترین لیمونوید تری‌ترپن و پس از آن اسیدهای فنولی و ۲ و۳-دهیدروسالانول به ترتیب با ٦۳۵/۳۸ و ۵۳۱/۹٤ میلی گرم به ازاء ۱۰۰ گرم عصاره عمده ترین ترکیبات فنولی این عصاره هستند. نتایج تست گرمخانه‌گذاری (۱۳ روز، دمای ٦۰°C) به منظور بررسی اثر آنتی اکسیدانی عصاره بدست آمده به روش پرکولاسیون نشان می داد که نمونه روغن سویا با غلظت ۲۰۰۰ ppm عصاره، بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی را تا روز چهارم در مهار تشکیل محصولات اولیه اکسیداسیون داشته در حالی که این غلظت قادر بود تشکیل محصولات ثانویه اکسیداسیون را تا روز سیزدهم مهار نماید.

واژگان کلیدی: برگ درخت نیم، ترکیبات فنولی، فولین سیوکالتیو، فعالیت آنتی رادیکالی، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

مقدمه

امروزه در راستای حذف و یا کاهش ترکیبات شیمیایی در مواد غذایی، تحقیقات زیادی برای جایگزین کردن مواد شیمیایی با طبیعی انجام شده است. در همین زمینه تلاش‌های متعددی برای یافتن آنتی‌اکسیدانهای طبیعی از منابع گیاهی صورت گرفته است (میلان سوهاج ۲۰۰٤، آنون ۱۹۹۷، وی ژنگ و شیو ونگ ۲۰۰۱) که این عمدتا بدلیل مشکلات و مسائل ایمنی و همچنین سمیت آنتی اکسیدان های سنتتیک مثل BHA و BHT می باشد که بطور معمول در غذاهای حاوی چربی استفاده می‌شوند (ریزارد آمارویچ و همکاران ۲۰۰۰، جولیا هوول ۱۹۸٦، ن ایتو ۱۹۸٦). تاکنون آنتی اکسیدان های طبیعی بسیاری از بخش های مختلف گیاهان جداسازی شده اند (ناراسیمان راماراسنام و همکاران ۱۹۹۵، می یائه شون و همکاران ۲۰۰۳، ماهیندا وتاسینگ و فریدون شهیدی ۱۹۹۹). از جمله آنتی اکسیدان های طبیعی که بطور گسترده ای در سلسله گیاهان توزیع شده اند، ترکیبات فنولی را می توان نام برد. تمام انواع فنولی ها دارای خاصیت روبش رادیکال آزاد بوده و دارای پتانسیل آنتی‌اکسیدانی هستند (دوناتا باندونیئن و میخائیل مورکوویچ ۲۰۰۲).

درخت نیم با نام علمی آزادیراچتا ایندیکا متعلق به خانواده ملیاسه، بومی شبه قاره هند و جنوب شرق آسیا است (پراساد ۲۰۰٦). توزیع این گونه در ایران در سواحل جنوبی می‌باشد (جعفری و همکاران ۲۰۱۲). گل های این درخت از ماه های فروردین تا خرداد شکوفا شده و میوه های آن در ماه های خرداد تا مرداد به ثمر می رسند (پراساد ۲۰۰٦). برگهای درخت نیم دارای طول ۷ و پهنای ۲/۵ سانتی متر بوده و ترکیباتی همچون کوئرستین و نیمبواسترول به همراه تعدادی لیمونوئید (نیمبین و مشتقاتش) در آن شناسایی شده است. ترکیبات برگ نیم شامل ۷/۱٪ پروتئین، ۲۲/۹٪ کربوهیدرات و مواد معدنی مختلف می باشد. سه ترکیب فعال نیم شامل نیمبین، نیمبیدین و نیمبینون هستند که این ترکیبات همگی از یک ترپن تتراسیکلیک مشتق می شوند. از دیگر ترکیبات نیم می‌توان به لیمونیدهای تلخ همچون آزادیراچتین، ملنونتریول و سالانین اشاره کرد (تران دانگ ژوان و همکاران ۲۰۰٤).

تاکنون تحقیقات زیادی در ارتباط با مشخص نمودن فعالیت آنتی اکسیدانی بخش های مختلف درخت نیم به انجام رسیده است که نشان دهنده اثر آنتی اکسیداتیو بالای این گیاه می باشد. سیسی ساران و همکاران اثر آنتی اکسیدانی عصاره های برگ، میوه، گل و پوست ساقه درخت *Azadirachta indica A. Juss Var. Siamensis Valeton, Meliaceae* را با استفاده از سه روش DPPH، فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل و ممانعت از پراکسیداسیون لیپید در محیط بیولوژیک با استفاده از TBARS تعیین نمودند (پونگتیپ سیسی ساران و همکاران ۲۰۰۵). همچنین این پژوهشگر و همکارانش اثرات آنتی اکسیداتیو برگ گونه های مختلف گیاه *Azadirachta* با منشاء استان های مختلف کشور تایلند را از طریق تعیین محتوی کل ترکیبات فنولی و تعیین میزان حذف رادیکال آزاد عصاره های آبی به روش رادیکال پایدار و با استفاده از احیاء نمک فِرمی تعیین نمودند (پونگتیپ سیسی ساران و همکاران ۲۰۰۷). مانی کاندان و همکاران فعالیت روبش رادیکال آزاد، پتانسیل احیاء کنندگی و محتوی کل ترکیبات فنولی عصاره اتانولی، فراکسیون اتیل استات، و فراکسیون متانولی برگ گیاه نیم را تعیین نمودند. همچنین ترکیبات عمده فراکسیون های مختلف این برگ به روش HPLC تعیین گردید (مانیکاندان و همکاران ۲۰۰۸). سلطانا و همکاران فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره های مختلف متانولی ۸۰٪، اتانولی ۸۰٪ و استونی ۸۰٪ پوست چهار گونه مختلف درخت نیم را از طریق تعیین کل محتوی فنولی و کل محتوی فلاونوئیدی و همچنین تعیین ظرفیت روبش رادیکال آزاد ارزیابی نمودند (بشرا سلطانا و همکاران ۲۰۰۷). راندمان عصاره گیری از برگ درخت نیم با ٦ روش دکوکشن، ماسریشن، پرکولاسیون،

سوکسله، خشک کردن انجمادی و خشک کردن افشانه‌ای، ظرفیت روبش رادیکال آزاد آن را به روش DPPH و همچنین ترکیبات فنولی موجود در عصاره بدست آمده به روش دکوکشن را به روش کروماتوگرافی لایه نازک تعیین نمودند (پونگتیپ سیسی ساران و همکاران ۲۰۰۶).

هدف این پژوهش، مقایسه روش های مختلف عصاره گیری از برگ درخت نیم از طریق بررسی روبش رادیکال های آزاد DPPH، تعیین محتوی کل ترکیبات فنولی آنها به روش فولین سیوکالتیو و تعیین کمی و کیفی ترکیبات فنولی به روش HPLC در موثرترین روش عصاره گیری می باشد. علاوه بر این، از طریق گرمخانه گذاری و پایش اندیس های پراکسید و تیوباربیتوریک اسید در یک دوره زمانی ۱۳ روزه، روند تاثیر موثرترین عصاره در به تاخیر انداختن اکسیداسیون روغن سویای تصفیه شده و بدون آنتی‌اکسیدان بررسی می شود.

مواد و روش ها

مواد شیمیایی

کلیه مواد شیمیایی و حلال های مورد استفاده در این تحقیق از شرکت مرک آلمان و رادیکال آزاد $DPPH^{\cdot}$ از شرکت سیگما آمریکا تهیه شدند. در تمام مراحل آزمایشات از آب دوبار تقطیر استفاده شد.

تهیه عصاره

برگ های تازه درخت نیم در نیمه دوم خرداد سال ۱۳۸۸ از ایالت اوتار پرادش در شمال کشور هندوستان جمع آوری و بلافاصله به صورت لایه نازک در سایه خشک، با خرد کن کنوود (۱۰۰ CG) خرد و تا زمان انجام آزمایش در بطری های شیشه ای درب بسته نگهداری شدند.

روش دکوکشن

پودر برگ تهیه شده (۱۰ g) به مدت ٦ ساعت با ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر و در زیر کندانسور جوشانده، سپس بوسیله قیف بوخنر و با کاغذ واتمن شماره ٤١ صاف شد. در ادامه ابتدا در دمای ٤٠°C در تبخیر کننده چرخان تغلیظ (Heidolph, Germany) و سپس در آون تحت خلا (Labtech, Korea) و در همان دما تا رسیدن به وزن ثابت خشک شد (پونگتیپ سیسی ساران و همکاران ۲۰۰٦، پونگتیپ سیسی ساران و همکاران ۲۰۰۷). پودر بدست آمده در ظروف شیشه ای درب بسته و در دمای یخچال تا زمان انجام آزمایشات نگهداری و راندمان عصاره گیری به روش گراویمتری تعیین شد.

روش پرکولاسیون

پودر برگ تهیه شده (۱۰ g) به مدت ٢٤ ساعت در مجاورت متانول ۸۰٪ (۲۰:۱ w/v) قرار گرفت. مابقی مراحل مانند روش قبل انجام شد (پونگتیپ سیسی ساران و همکاران ۲۰۰٦).

روش ماسریشن

پودر برگ تهیه شده (۱۰ g) به مدت ۷ روز در مجاورت متانول ۸۰٪ (۲۰:۱ w/v) قرار گرفت. مابقی مراحل مانند روش دکوکشن انجام شد (پونگتیپ سیسی ساران و همکاران ۲۰۰٦).

محتوی کل ترکیبات فنولی به روش فولین سیوکالتیو

کل محتوی فنولی به صورت رنگ سنجی و با روشی که توسط سینگلتون و روسی اصلاح شده است تعیین شد (و ل سینگلتون و ج ا روسی ۱۹٦٥). مختصرا؛ ۵۰۰ µl محلول فنولی (عصاره با غلظت ۵۰۰ میلی گرم به ازاء کیلوگرم و یا غلظت های ۱۰-۸۰ میلی گرم اسید کافئیک در کیلوگرم متانول ۵۰٪ (نونزیا سیسکو و همکاران ۲۰۰۸)) با ۲/۵ میلی لیتر واکنشگر فولین سیوکالتیو که ۱۰ برابر با آب مقطر رقیق شده است مخلوط شده، ۲ میلی لیتر محلول ۷/۵٪ کربنات سدیم افزوده شده و در دمای ٤٥°C به مدت ۱۵ دقیقه گرمخانه گذاری گردید. در

نهایت جذب در طول موج nm ۷٤۰ توسط اسپکتروفتومتر UV-Vis شیمادزو مدل ۰۲-۱۲۰ UV قرائت گردید. نتایج بصورت میلی گرم اکی والان های اسید کافئیک به ازاء کیلوگرم ماده خشک بیان می گردد.

فعالیت آنتی رادیکالی به روش روبش رادیکال آزاد DPPH·

با توجه به مطالعات قبلی (پراکاش شارما و تج بات ۲۰۰۹) مشخص شد که دامنه دقت اندازه گیری های اسپکتروفتومتری در محدوده جذب ۰/٦۹۸-۰/۲۲۱ است که معادل عبور ٦۰-۲۰٪ است (ج ه آیرس ۱۹٤۹) و این میزان متناظر با غلظت های μM ۷۰- ۲۵ DPPH· است. با توجه به این موارد غلظت های متفاوت DPPH· (μM ٦۳-۱۳) در متانول تهیه شده و ارتباط خطی بین غلظت رادیکال و جذب تعیین شد (د ویلانو و همکاران ۲۰۰٦). در نهایت غلظت μM ۵۰ به عنوان بهترین غلظت DPPH· انتخاب شد (ه ج سلوان و س جی ویلیاومس ۱۹۹۷، ج ه آیرس ۱۹٤۹).

ابتدا محلول های استاندارد BHT در متانول در غلظت های مختلف ۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۹۰ میکرومولار و یا غلظت های ۰، ۲، ٤، ٦، ۱۰، ۱٤ و ۱۸ ppm (میلی گرم عصاره به ازاء کیلوگرم) عصاره های دکوکشن و ماسریشن و غلظت های ۰، ۲، ٤، ٦، ۸، ۱۰ و ۱۲ ppm (میلی گرم عصاره به ازاء کیلوگرم) عصاره پرکولاسیون تهیه گردید. یک میلی لیتر محلول ۲۰۰ میکرومولار DPPH· در متانول به ۳ میلی لیتر محلول متانولی BHT و یا عصاره با غلظت های فوق اضافه گردید. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۰°C گرمخانه گذاری و در نهایت به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر، جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر در برابر سل حاوی متانول قرائت شد (پراکاش شارما و تج بات ۲۰۰۹). درصد فعالیت روبش رادیکال های آزاد (RSA) با استفاده از فرمول شماره ۱ محاسبه گردید.

فرمول شماره ۱:

$$\%RSA=\frac{\text{OD Control}-\text{OD Sample}}{\text{OD Control}}\times 100$$

که در این رابطه:

OD control جذب کنترل، OD Sample جذب نمونه و RSA میزان فعالیت روبش رادیکال‌های آزاد بوده و بیانگر فعالیت آنتی‌اکسیدانی و درصد بازدارندگی ترکیب آنتی‌اکسیدان می‌باشد (پراکاش شارما و تج بات ۲۰۰۹).

گرمخانه گذاری

جهت تعیین قدرت آنتی اکسیدانی عصاره های بدست آمده در به تاخیر انداختن شروع اکسیداسیون در روغن سویا؛ غلظت های ۸۰۰، ۱٤۰۰ و ۲۰۰۰ ppm (میلی گرم عصاره به ازاء کیلوگرم) از عصاره بدست آمده به روش پرکولاسیون به عنوان موثرترین عصاره در روبش رادیکال های آزاد، به روغن سویای تصفیه، رنگ بری شده و فاقد آنتی اکسیدان افزوده شد و طی ۱۳ روز در دمای ٦۰°C، اندیس پراکسید به عنوان شاخص محصولات اولیه اکسیداسیون در روزهای ۰، ٤، ۸ و ۱۲ و اندیس ۲- تیوباربیتوریک اسید به عنوان شاخص محصولات ثانویه اکسیداسیون در روزهای ۰، ۵، ۹ و ۱۳ تعیین شدند. نظر به اینکه ترکیبات پلی فنولی موجود در عصاره حلالیت کمی در روغن دارند و نیز با توجه به سمیت متانول، در این تحقیق از پروپیلن گلایکول به عنوان حلال پودر حاصل از عصاره‌گیری استفاده شد. ظروف نمونه، شیشه های قهوه ای رنگ به حجم ۱۲۰ میلی‌لیتر بودند که قبل از آزمایش به منظور حذف عوامل پرواکسیدان تا حد امکان با آب مقطر و محلول 0/5 درصد EDTA شستشو داده شده وسپس در آون ۱۸۰°C خشک گردیدند.

اندیس پراکسید

طبق استاندارد ایران به شماره ٤۱۷۹ تعیین گردید (استاندارد ملی ایران (شماره ٤۱۷۹) ۱۳۷۷).

اندیس تیوباربیتوریک اسید

ابتدا ۳ گرم چربی در ۱۰ میلی لیتر کلروفرم حل شده و سپس ۱۰ میلی لیتر محلول کار (محلول ۰/۰۷٪ اسید تیوباربیتوریک در آب که با هم حجمش اسید استیک گلاسیال مخلوط شده است) به آن اضافه گردید. در

ادامه مخلوط بدست آمده به مدت ۵ دقیقه در سانتریفوژ (سیگما ۱۸KS-۳، آلمان) با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. سپس قسمت آبکی آن جدا شده و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب جوش قرار گرفته و در پایان میزان جذب در طول موج ۵۳۰ نانومتر قرائت شد (مصطفی مهران ۱۳۵۵). عدد TBA براساس رابطه زیر محاسبه گردید.

فرمول شماره ۲:

$$E_{1\,\mathrm{cm}}^{1\,\mathrm{g}} = \frac{\mathrm{e}}{\mathrm{d.a}}$$

که در این رابطه:

e: جذب نوری اندازه گیری شده، d: ضخامت سل نوری و a: وزن نمونه برحسب گرم است (سی جی سایدول و همکاران ۱۹۵٤).

جداسازی ترکیبات فنولیک به روش HPLC

دستگاه HPLC (یاگلین Acme ۹۰۰۰) و ستون RP-۱۰۰ LiChrosphere C_{18} (۲۵۰ mm× ٤/٦ mm ID × ٤ μm) در این تست مورد استفاده قرار گرفت. فاز متحرک، استونیتریل- آب (٦٠:٤٠) با شدت جریان ۰/۵ میلی لیتر در دقیقه بوده و شناسایی بوسیله دتکتور فرابنفش مدل UV/Vis-YL ۹۱۲۰ در طول موج ۲۱۵ نانومتر انجام گردید (پ مانیکاندان و همکاران ۲۰۰۸). ترکیبات فنولی در عصاره بدست آمده به روش پرکولاسیون جداسازی شده و سپس از طریق مقایسه با اسید سیرینجیک به عنوان استاندارد داخلی تعیین مقدار شدند.

آنالیز آماری

مقایسات میانگین با استفاده از نرم افزار SPSS ۲۰/۰، از طریق آزمون ANOVA و تست توکی انجام شد. P<۰/۰۵ از لحاظ آماری معنی دار در نظر گرفته شد. نتایج به صورت میانگین سه تکرار ± انحراف معیار بیان شدند.

نتایج و بحث

راندمان عصاره‌گیری

راندمان عصاره گیری از برگ درخت نیم در روش های دکوکشن، پرکولاسیون و ماسریشن بترتیب ۱۱/۱±۰/۱، ۱۲/۳±۰/۱ و ۱٦/۸۱±۰/۰۰۱ درصد ($\frac{w}{w}$) تعیین گردید. نتایج آنالیز های آماری نشان می‌دهند که عصاره ها از لحاظ راندمان عصاره‌گیری با یکدیگر اختلاف معنی داری داشته (P<۰/۰۵) و بیشترین راندمان مربوط به روش ماسریشن می باشد. علت را می توان در اثر متانول و همچنین مدت زمان عصاره گیری بر روی استخراج مواد موثره از برگ عنوان نمود.

سیسی ساران و همکاران راندمان عصاره گیری از برگ نیم را در روش های دکوکشن، ماسریشن با اتانول ۸۰٪ و پرکولاسیون با اتانول ۸۰٪ بترتیب ۸/۱۵، ۱۷/۵ و ۲۱/٤۸ درصد ($\frac{w}{w}$) گزارش نمودند. مشاهده می‌شود که بیشترین راندمان متعلق به روش پرکولاسیون با اتانول ۸۰٪ است (پونگتیپ سیسی ساران و همکاران ۲۰۰٦). همچنین سیسی سارن و همکاران راندمان عصاره آبی یا همان روش دکوکشن را برای برگ درخت سیامس نیم ۱۱/۲۹ درصد ($\frac{w}{w}$) و راندمان روش ماسریشن با متانول و پس از ۷ روز چربی گیری با هگزان را ٤/۷۱ درصد ($\frac{w}{w}$) گزارش کردند (پونگتیپ سیسی ساران و همکاران ۲۰۰۵).

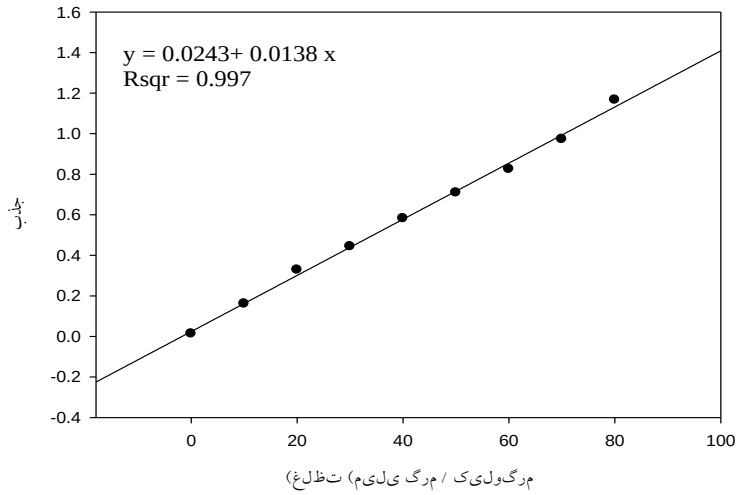
مقدار کل ترکیبات فنولی

با توجه به معادله رگرسیون بدست آمده در مورد اسید کافئیک (شکل ۱) و قرار دادن جذب هر یک از عصاره‌ها در این معادله، مقدار کل ترکیبات فنولی به صورت میلی‌گرم اکی‌والان‌های اسید کافئیک به ازاء کیلوگرم ماده خشک گزارش گردید. این مقدار بترتیب برای عصاره های حاصل از روش دکوکشن، پرکولاسیون و ماسریشن ۲۳/٦۷±۰/٤۷، ۳٤/۲۱±۰/۱۵ و ۳۷/۵۵±۰/۲۵ میلی گرم اکی والان اسید کافئیک به ازاء کیلوگرم ماده خشک بدست آمد. مشهود است که بیشترین مقدار کل ترکیبات فنولی مربوط به روش ماسریشن می‌باشد

(شکل ۲). مقایسه میانگین انجام شده به روش توکی نشان می داد که اختلاف معنی داری بین میزان کل ترکیبات فنولی هر سه عصاره وجود دارد (P<۰/۰۵). قبلا مقدار کل پلی فنول در عصاره اتانولی، فراکسیون اتیل استاتی و فراکسیون متانولی برگ نیم به ترتیب ۳۹/۳۱±٤/۸۵، ۷۳/۱±۳/۱۹ و ۱۳/٤٥±۱/۲۱ (wt٪) گزارش شده است (پ مانیکاندان و همکاران ۲۰۰۸). عصاره برگ گیاه آزادیراچتا دارای محتوی ترکیبات فنولیک ۷۹- ۱۲ میلی گرم بر گرم اکی والان کوئرستین است و میانگین کل فنولی ها را در درختان سیامس نیم، مارانگو و نیم بترتیب برابر با ۳۲/٦±۱٦/۱، ٥۳±۲٤/۸ و ٤۰/۹±٥/٥ میلی گرم کوئرستین به ازاء هر گرم عصاره گزارش کردند (پونگتیپ سیسی ساران و همکاران ۲۰۰۷).

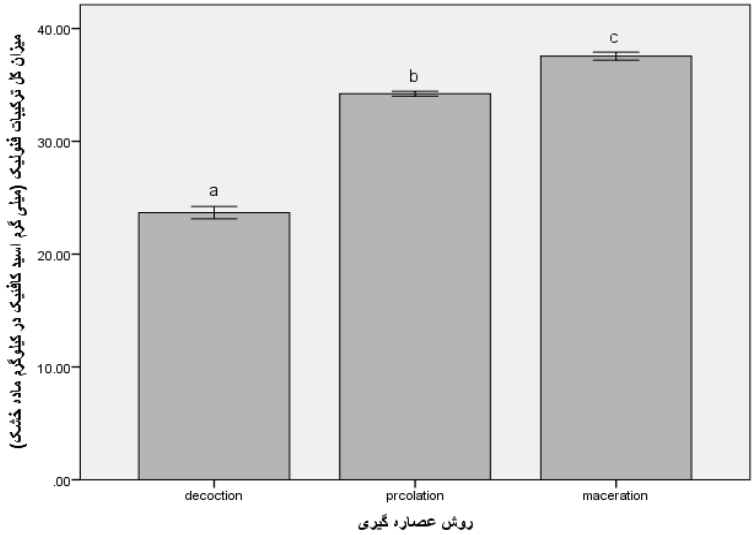
فعالیت آنتی رادیکالی

در این پژوهش با توجه به معادله رگرسیون غیر خطی بدست آمده، مقدار IC_{50} BHT در متانول ٥۸/۹ میکرو مول معادل ۱۲/۹۸±۰/۰٥ میکروگرم بر میلی لیتر محاسبه شد (شکل ۳). همچنین مقادیر IC_{50} برای عصاره های دکوکشن، پرکولاسیون و ماسریشن بترتیب ۲۸/۹٤±۰/۰۰، ۱۹/٦۲±۰/۲۳ و ۷۸/۸±۹/٤۳ میکروگرم بر میلی لیتر بدست آمد. نتایج آزمون توکی نشان می‌داد که علیرغم عدم وجود اختلاف معنی دار بین مقادیر IC_{50} عصاره‌های دکوکشن، پرکولاسیون و آنتی اکسیدان BHT (P>۰/۰٥) اما مقادیر IC_{50} این سه با عصاره ماسریشن اختلاف معنی داری دارند (P<۰/۰٥). بنابراین با وجود بالاتر بودن میزان کل ترکیبات فنولی عصاره ماسریشن و همچنین راندمان استخراج آن، اما عصاره بدست آمده به روش پرکولاسیون به عنوان موثرترین عصاره در روبش رادیکال های آزاد معرفی گردید (شکل ٤). در توضیح این پدیده باید گفت با توجه به مکانیسم تغییر رنگ واکنشگر فولین، که اکسیداسیون محلول قلیایی فنول ها بوسیله واکنشگر می‌باشد (نونزیا سیسکو و همکاران ۲۰۰۸) و اینکه در هنگام عصاره گیری علاوه بر ترکیبات فنولی، ترکیبات دیگری که این واکنشگر قادر است تا آنها را نیز اکسید کند نیز استخراج می‌گردند، یکی از اشکالات اصلی روش فولین سیوکاتیو پایین بودن درجه اختصاصی آن جهت اندازه‌گیری ترکیبات فنولی است (فریدون شهیدی و نازک ۲۰۰۳).



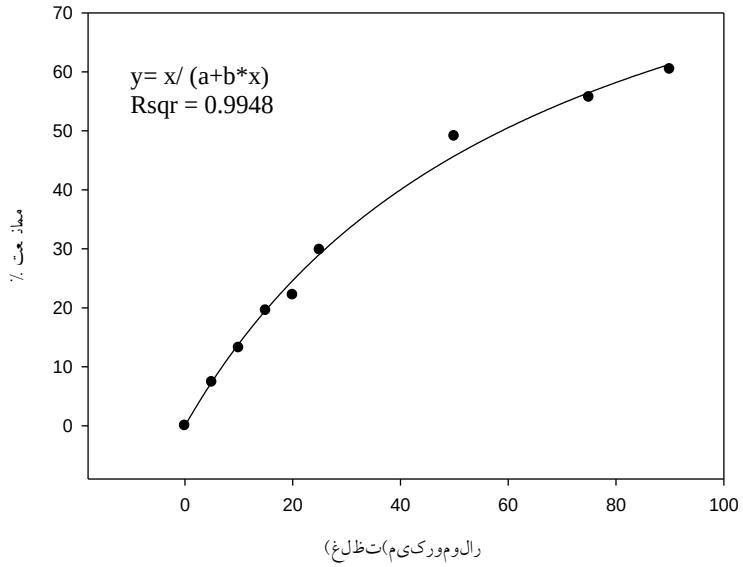
شکل ۱- منحنی کالیبراسیون ترکیبات فنولی بر حسب اسید کافئیک

غلظت های ۱۰-۸۰ میلی گرم اسید کافئیک در کیلوگرم متانول ٥۰٪ با واکنشگر فولین سیوکالتیو مخلوط و سپس محلول ۷/٥٪ کربنات سدیم افزوده شده و پس از گرمخانه گذاری در ٤٥°C به مدت ۱٥ دقیقه، جذب در طول موج ۷٤۰ nm قرائت شد.



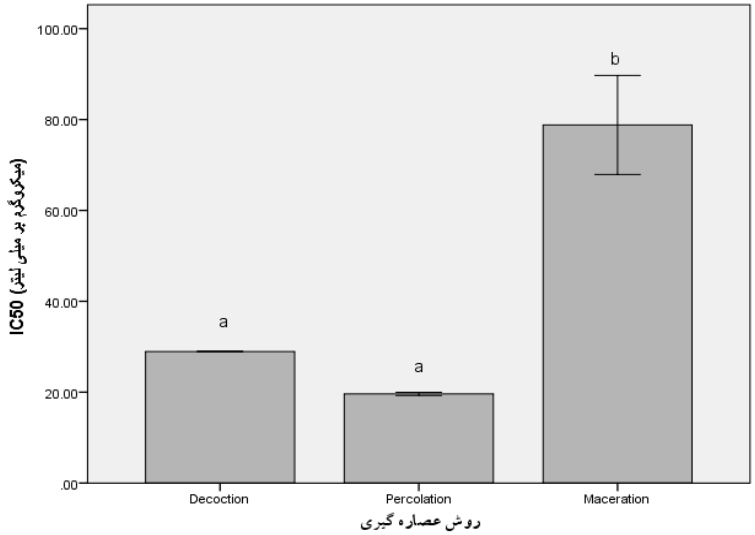
شکل ۲- میزان کل ترکیبات فنولی در سه عصاره مختلف

هر عصاره با غلظت ۵۰۰ میلی گرم در کیلوگرم متانول ۵۰٪ با واکنشگر فولین سیوکالتیو مخلوط و سپس محلول ۷/۵٪ کربنات سدیم افزوده شده و پس از گرمخانه گذاری در ۴۵°C به مدت ۱۵ دقیقه، جذب در طول موج ۷۴۰ nm قرائت شد. نتایج بصورت میلی گرم اکی والان های اسید کافئیک به ازاء کیلوگرم ماده خشک بیان گردید. حروف متفاوت بر روی هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف آماری معنی دار (P<۰/۰۵) می باشد.



شکل ۳- منحنی کالیبراسیون BHT

یک میلی لیتر محلول ۲۰۰ میکرومولار DPPH· در متانول به ۳ میلی لیتر محلول استاندارد BHT در متانول (غلظت های ۰-۹۰ میکرومولار) افزوده شده و پس از ۳۰ دقیقه گرمخانه گذاری در دمای ۳۰°C، جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر در برابر سل حاوی متانول قرائت شد.



شکل ۴- مقدار IC_{50} در سه عصاره مختلف

یک میلی لیتر محلول ۲۰۰ میکرومولار DPPH· در متانول به ۳ میلی لیتر محلول عصاره در متانول (غلظت های ۰-۱۸ ppm عصاره های دکوکشن و ماسریشن و یا غلظت های ۰-۱۲ ppm عصاره پرکولاسیون) افزوده شده و پس از ۳۰ دقیقه گرمخانه گذاری در دمای ۳۰°C، جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر در برابر سل حاوی متانول قرائت شد. حروف متفاوت بر روی هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف آماری معنی دار (P<۰/۰۵) می باشد.

مانی کاندان و همکاران مقدار IC_{50} عصاره متانولی برگ نیم را ۵۹/۳۹ میکروگرم به ازاء هر میلی لیتر گزارش نمودند (پ مانیکاندان و همکاران ۲۰۰۸). سیسی ساران و همکاران مقدار IC_{50} را برای عصاره آبی و متانولی برگ گیاه نیم بترتیب ۳/۶۳±۲۶/۴۸ و ۲۱/۹۵±۱۱۵/۵۶ میکروگرم به ازاء هر میلی‌لیتر گزارش نمودند (پونگتیپ سیسی ساران و همکاران ۲۰۰۵). همچنین این پژوهشگر و همکارانش مقدار IC_{50} را برای عصاره آبی به روش دکوکشن ۳۱/۴۱ میکروگرم به ازاء هر میلی لیتر گزارش نمودند (پونگتیپ سیسی ساران و همکاران ۲۰۰۶)، که به عدد بدست آمده در این تحقیق بسیار نزدیک است.

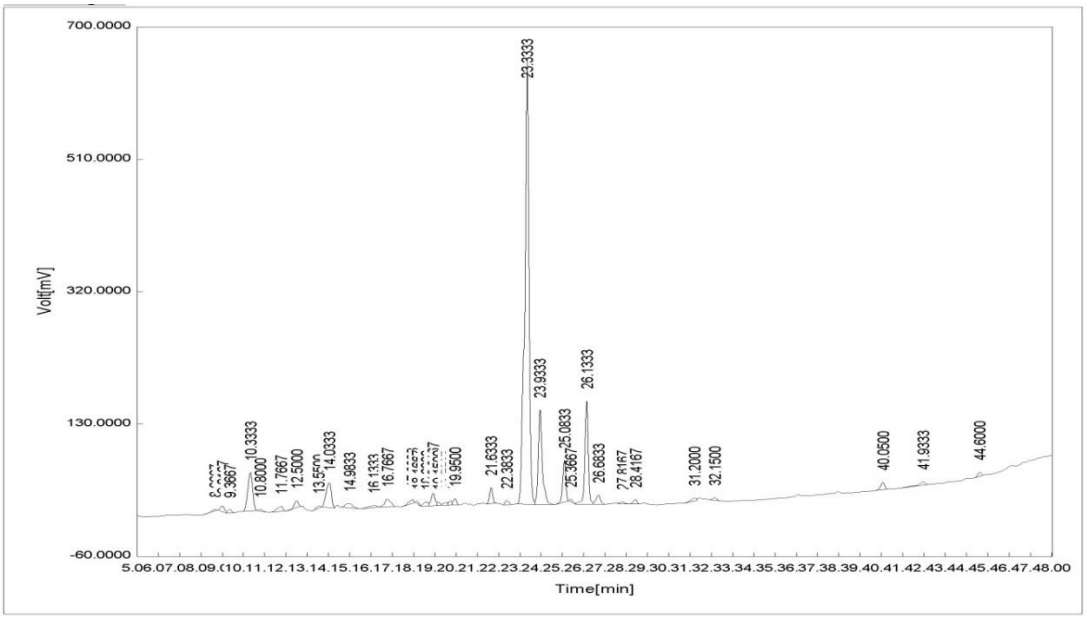
جدول ۱- فعالیت آنتی رادیکالی و مقدار کل ترکیبات فنولی عصاره های برگ نیم*

روش عصاره گیری	IC_{50}، $(\mu g / ml)$	مقدار کل فنول ها (کیلو گرم عصاره خشک / میلی گرم اکی والان های کافئیک اسید)
دکوکشن	۲۸/۹۴±۰/۰۰a	۲۳/۶۷±۰/۴۷a
پرکولاسیون	۱۹/۶۲±۰/۲۳a	۳۴/۲۱±۰/۱۵b
ماسریشن	۷۸/۸±۹/۴۳b	۳۷/۵۵±۰/۲۵c
BHT	۱۲/۹۸±۰/۰۵a	-

* اعداد میانگین سه تکرار ± انحراف معیار و حروف متفاوت در هر ستون نشان وجود اختلاف آماری معنی دار (P<۰/۰۵) می‌باشد.

جداسازی ترکیبات فنولی به روش HPLC

با توجه به نتایج بدست آمده از آزمون تعیین میزان کل ترکیبات فنولی و همچنین بررسی روبش رادیکال های آزاد DPPH· (جدول ۱)، عصاره بدست آمده به روش پرکولاسیون به عنوان موثرترین عصاره در روبش رادیکال های آزاد انتخاب و جداسازی ترکیبات فنولی به روش HPLC با استفاده از این عصاره انجام شد. شکل ۵، کروماتوگرام HPLC ترکیبات فنولی عصاره را نشان می‌دهد. در جدول ۲، مقدار ترکیبات فنولی با ذکر مقدار هر یک عنوان شده است. با توجه به این جدول می‌توان دریافت که نیمبولید با مقدار ۲۸۹٦/۰۵ میلی گرم به ازاء ۱۰۰ گرم عصاره عمده‌ترین لیمونوید تری‌ترپن این عصاره و پس از آن اسیدهای فنولی و ۲ و۳-دهیدروسالانول به ترتیب با مقادیر ٦۳۵/۳۸ و ۵۳۱/۹٤ میلی گرم به ازاء ۱۰۰ گرم عصاره سایر ترکیبات فنولی عمده این عصاره هستند. مقدار کل ترکیبات فنولی عصاره بدست آمده به روش پرکولاسیون ۵۹۰۷/۷٦ میلی گرم به ازاء ۱۰۰ گرم عصاره است. همچنین گزارش شده است که نیمبولید ترکیب عمده در روغن بذر نیم نیز می‌باشد (کائوشیک بیسواز و همکاران ۲۰۰۲). تاکنون فقط تعداد محدودی تحقیق و بررسی در مورد جداسازی و تفکیک ترکیبات فنولی عصاره های استخراجی از برگ درخت نیم به انجام رسیده است. از آن جمله، مانیکاندان و همکاران در سال ۲۰۰۸ مشخص کردند که عصاره اتانولی برگ نیم، حاوی نیمبولید، کوئرستین و ۲ و۳-دهیدروسالانول بترتیب با مقادیر ۰/۰۵۲، ۰/۱٦ و ۰/۰۱ درصد و زمان بازداری ۱۸/۷۱، ۷/۲۸ و ۱۹/۱۰ دقیقه است. در حالیکه فراکسیون اتیل استاتی دارای غلظت بالایی از نیمبین و ۲ و۳-دهیدروسالانول، بترتیب با مقادیر ۰/۰۰۵ و ۰/۰۸۳ درصد و زمان بازداری ۲۲/۲۱ دقیقه و ۱۹/۰۱ دقیقه و فراکسیون متانولی غنی از نیمبولید و کوئرستین با مقادیر ۰/۰۵ و ۰/۵۷ درصد و زمان بازداری بترتیب ۱۸/۸۱ و ۷/۲۰ دقیقه بودند (مانیکاندان و همکاران ۲۰۰۸).



شکل ۵- کروماتوگرام ترکیبات فنولی عصاره پرکولاسیون برگ نیم

نیمبولید (زمان بازداری ۲۳/۳۳) با مقدار ۲۸۹٦/۰۵ میلی گرم به ازاء ۱۰۰ گرم عصاره عمده‌ترین لیمونوید تری‌ترپن و پس از آن اسیدهای فنولی و ۲ و۳-دهیدروسالانول به ترتیب با مقادیر ٦۳۵/۳۸ (زمان بازداری از ۱٤/۰۳ تا ۱۹/۷۵) و ۵۳۱/۹٤ (زمان بازداری ۲٦/۱۳) میلی گرم به ازاء ۱۰۰ گرم عصاره سایر ترکیبات فنولی عمده این عصاره هستند. مقدار کل ترکیبات فنولی عصاره بدست آمده ۵۹۰۷/۷٦ میلی گرم به ازاء ۱۰۰ گرم عصاره است.

جدول ۲- ترکیبات فنولی عصاره پرکولاسیون برگ نیم

ردیف	ترکیب	زمان بازداری (دقیقه)	مقدار (٪)	مقدار (عصاره mg/۱۰۰g)
۱	فلاونوئیدهای شناخته نشده	۹/۳۶	۰/۳٤۲	۲۰/۱۹
۲	کوئرستین	۱۰/۳۳	۵/۰۵	۲۹۸/۵۷
۳	اسید های فنولی	از ۱٤/۰۳ تا ۱۹/۷۵	۱۰/۷۵	٦۳۵/۳۸
٤	سیرینجیک اسید(استاندارد داخلی)	۱۹/۹۵	–	–
۵	نیمبولید	۲۳/۳۳	٤۹/۰۲	۲۸۹٦/۰۵
٦	۲و۳- دهیدروسالانول	۲٦/۱۳	۹/۰۱	۵۳۱/۹٤
۷	فلاونوئیدهای شناخته نشده	۲۷/۸۱	۰/۲۷	۱٦/۳٤

تست گرمخانه گذاری

عدد پراکسید (برحسب میلی اکی والان گرم در کیلوگرم روغن) برای تیمارهای مختلف در روزهای ۰، ٤، ۸ و ۱۲ و عدد TBA (مقدار مالون دی آلدهید موجود در یک کیلوگرم روغن) برای تیمار های مختلف در روزهای ۰، ۵، ۹ و ۱۳ بهمراه میزان فعالیت آنتی اکسیدانی متناظر به ترتیب در جداول ۳ و ٤ نشان داده شده است.

به منظور مقایسه بهتر بین تیمارهای مختلف از شاخص فعالیت آنتی اکسیدانی در مورد اندیس پراکسید و تیوباربیتوریک اسید استفاده شد. شاخص مذکور در مورد اندیس پراکسید با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید. در مورد اندیس تیوباربیتوریک نیز شاخص فعالیت آنتی اکسیدانی بطور مشابه محاسبه می‌گردد.

فرمول شماره ۳

$$\text{فعالیت آنتی اکسیدانی} = \frac{\text{اندیس پراکسید(شاهد)} - \text{اندیس پراکسید(نمونه)}}{\text{اندیس پراکسید(شاهد)}} \times 100$$

جدول ۳- اندیس پراکسید تیمارها و مقادیر متناظر فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره پرکولاسیون در روزهای مختلف*

پارامتر	غلظت (ppm) عصاره	روز ۰	٤	۸	۱۲
اندیس پراکسید (میلی اکی والان گرم در کیلوگرم روغن)	۰	۰/۲۵±۰/۰۰	٤۵/۸۵±۰/۵٦	۹۰/۱±۰/۳۵	۱۷۲/۳۷±۰/۳
	۸۰۰	۰/۲۵±۰/۰۰	۲۰/۸٦±۰/٤۷	٤۹/۲۷±۰/۰۸	۱۰۲/۹۳±۰/۰۰
	۱٤۰۰	۰/۲۵±۰/۰۰	۱۸/٦۵±۰/۱۲	٤۷/۲٦±۰/۰۹	۹۷/٦±۰/۰۱
	۲۰۰۰	۰/۲۵±۰/۰۰	۸/٦٦±۰/۰٦	۳٤/۱۲±۰/۰٤	۵۱/۸۷±۰/۰۳
فعالیت آنتی اکسیدانی	۸۰۰	۰/۰۰a	۵٤/۵۰±۰/٤۷b	٤۵/۳۱±۰/۱۸d	٤۰/۲۸±۰/۱۰g
	۱٤۰۰	۰/۰۰a	۵۹/۳۱±۰/٦۷c	٤۷/۵٤±۰/۱۷e	٤۳/۳۷±۰/۱۰h
	۲۰۰۰	۰/۰۰a	۸۱/۱۱±۰/۲d	٦۲/۱۳±۰/۱۳f	٦۹/۹±۰/۰٤i

*اعداد میانگین سه تکرار ± انحراف معیار و حروف متفاوت در هر ستون نشان وجود اختلاف آماری معنی دار ($P<۰/۰۵$) می‌باشد.

جدول ۴- اندیس TBA تیمارها مقادیر متناظر فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره پرکولاسیون در روزهای مختلف*

پارامتر	غلظت (ppm) عصاره	روز			
		۰	۵	۹	۱۳
اندیس TBA (مالون دی آلدهید در یک کیلوگرم روغن)	۰	۰/۰۱±۰/۰۰	۰/۰۵۶±۰/۰۰	۰/۰۱۴۸±۰/۰۰	۰/۰۵۶۲±۰/۰۲
	۸۰۰	۰/۰۱±۰/۰۰	۰/۰۴۲±۰/۰۰	۰/۰۹±۰/۰۰	۰/۲۷±۰/۰۰
	۱۴۰۰	۰/۰۱±۰/۰۰	۰/۰۳۳±۰/۰۰	۰/۰۷۱±۰/۰۰	۰/۰۲۲۵±۰/۰۰
	۲۰۰۰	۰/۰۱±۰/۰۰	۰/۰۳۲±۰/۰۰	۰/۰۷±۰/۰۰	۰/۱۹۱±۰/۰۰
فعالیت آنتی اکسیدانی	۸۰۰	۰/۰۰a	۲۴/۹۹±۰/۵۳b	۳۹/۱۸±۰/۳۴e	۵۱/۹±۱/۷۶f
	۱۴۰۰	۰/۰۰a	۴۱/۰۵±۱/۰۸c	۵۲/۰۲±۰/۰۸f	۵۹/۹۲±۱/۳۵g
	۲۰۰۰	۰/۰۰a	۴۲/۸۴±۰/۸۶d	۵۲/۷±۰/۰۸f	۶۵/۹۷±۱/۲۵h

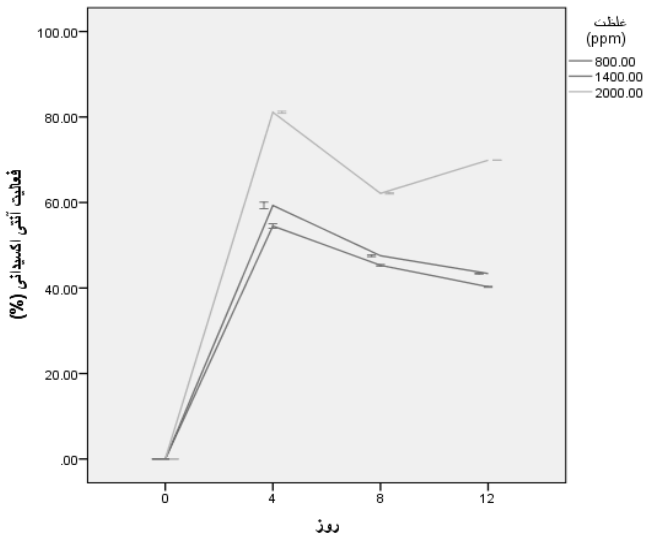
*اعداد میانگین سه تکرار ± انحراف معیار و حروف متفاوت در هر ستون نشان وجود اختلاف آماری معنی دار (P<۰/۰۵) می‌باشد.

بررسی اثر سطح عصاره در به تاخیر انداختن پراکسیداسیون روغن سویا

نتایج بررسی اثر آنتی اکسیدانی حاصل از عدد پراکسید حاکی از آن است که اثر روز، سطح عصاره افزوده شده و اثر متقابل این دو، در مجموع هر سه غلظت معنی دار است (P<۰/۰۵). این مسئله بیانگر این مطلب است که عصاره بدست آمده به روش پرکولاسیون در هر سه سطح (۸۰۰، ۱۴۰۰ و ۲۰۰۰ ppm) در به تاخیر انداختن پراکسیداسیون روغن سویا موثر است. همچنین می توان دریافت که با افزایش غلظت عصاره، فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره مذکور، در به تاخیر انداختن پراکسیداسیون روغن سویا به طور معنی داری افزایش می‌یابد. همچنین از نظر آماری، تغییر بین زمان های اندازه‌گیری (۰، ۴، ۸ و ۱۲) در فعالیت آنتی اکسیدانی اثر معنی داری داشته (P<۰/۰۵)، به طوری که تا روز ۴ روند فعالیت آنتی اکسیدانی، افزایشی و از روز ۴ تا روز ۱۲ این روند رو به کاهش بوده و بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی در روز ۴ و در غلظت ۲۰۰۰ ppm عصاره مشاهده شده است (شکل ۶).

بررسی اثر سطح عصاره در به تاخیر انداختن تولید محصولات ثانویه روغن سویا

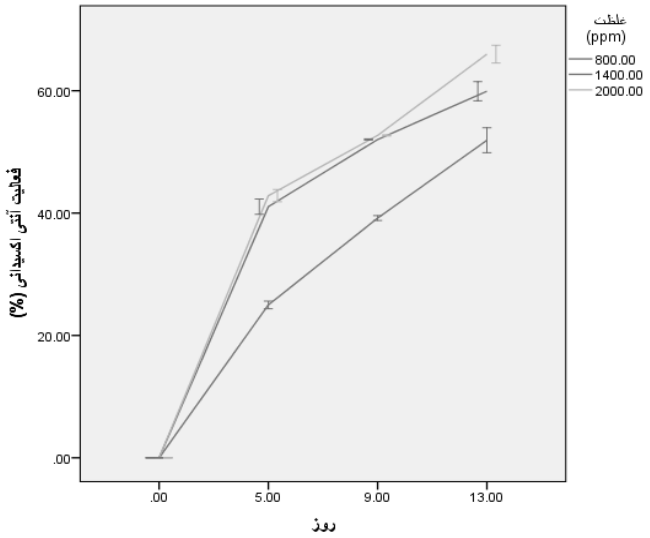
نتایج بررسی اثر آنتی اکسیدانی حاصل از عدد تیوباربیتوریک اسید حاکی از آن است که اثر روز، سطح عصاره افزوده شده و اثر متقابل این دو، در مجموع هر سه غلظت معنی دار است (P<۰/۰۵). این مسئله بیانگر این مطلب است که عصاره بدست آمده به روش پرکولاسیون، در هر سه سطح (۸۰۰، ۱۴۰۰ و ۲۰۰۰ ppm) در به تاخیر انداختن تولید محصولات ثانویه روغن سویا موثر است. همچنین می توان دریافت که با افزایش سطح عصاره، فعالیت آنتی اکسیدانی آن در به تاخیر انداختن تولید محصولات ثانویه روغن سویا به طور معنی داری افزایش می‌یابد. علاوه براین و از نظر آماری، تغییر بین زمان های اندازه‌گیری (۰، ۵، ۹ و ۱۳) در فعالیت آنتی اکسیدانی اثر معنی‌داری داشته (P<۰/۰۵) به طوری که روند فعالیت آنتی اکسیدانی تا روز ۱۳، افزایشی بوده و بیشترین میزان آن در غلظت ۲۰۰۰ ppm مشاهده شده است (شکل ۷).



شکل ۶- رونده پیشرفت فعالیت آنتی اکسیدانی با توجه به عدد پراکسید

از نظر آماری، تغییر بین زمان های اندازه‌گیری (۰، ٤، ۸ و ۱۲ روز) در فعالیت آنتی اکسیدانی اثر معنی داری داشته (P<۰/۰۵)، به طوری که تا روز چهارم روند فعالیت آنتی اکسیدانی، افزایشی و از روز ٤ تا روز ۱۲ این روند رو به کاهش بوده و بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره در روز چهارم در غلظت ۲۰۰۰ ppm مشاهده شد.

نتایج آنالیزهای آماری نشان می دهد که بین فعالیت آنتی اکسیدانی سطوح مختلف عصاره افزوده شده در روزهای ۵ و ۱۳ اختلاف معنی داری وجود دارد (P<۰/۰۵) اما در روز ۹ و بین دو غلظت ۱۴۰۰ و ۲۰۰۰ ppm اختلاف فعالیت آنتی اکسیدانی معنی دار نمی باشد (P>۰/۰۵). همچنین بین سطح ۸۰۰ ppm در روز ۱۳ با سطوح ۱۴۰۰ و ۲۰۰۰ ppm در روز ۹ نیز اختلاف معنی داری وجود نداشت (P>۰/۰۵).



شکل ۷- پیشرفت فعالیت آنتی اکسیدانی با توجه به عدد تیوباربیتوریک اسید

از نظر آماری، تغییر بین زمان های اندازه‌گیری(۰، ۵، ۹ و ۱۳ روز) در فعالیت آنتی اکسیدانی اثر معنی داری داشته (P<۰/۰۵)، به طوری که بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی در روز سیزدهم و در غلظت ۲۰۰۰ ppm مشاهده شد.

نتیجه گیری کلی

در بین سه روش دکوکشن، پرکولاسیون و ماسریشن، بیشترین راندمان عصاره گیری با ۱۶/۸۱±۰/۰۰۱ درصد ($\frac{w}{w}$) مربوط به روش ماسریشن بود. مقدار کل ترکیبات فنولی در روش فولین سیوکالتیو برای سه عصاره فوق به ترتیب ۲۳/۶۷±۰/۴۷، ۳۴/۲۱±۰/۱۵ و ۳۷/۵۵±۰/۲۵ میلی گرم اکی والان اسید کافئیک به ازاء کیلوگرم ماده خشک بدست آمد که بیشترین مقدار مربوط به عصاره ماسریشن می باشد. در آزمون DPPH· مقدار IC_{50} BHT در متانول ۵۸/۹ میکرو مول معادل ۱۲/۹۸ ±۰/۰۵ میکروگرم بر میلی لیتر محاسبه شد. این درحالی است که مقادیر IC_{50} عصاره‌های دکوکشن، پرکولاسیون و ماسریشن بترتیب بترتیب ۲۸/۹۴±۰/۰۰، ۱۹/۶۲±۰/۲۳ و ۷۸/۸±۹/۴۳ میکروگرم بر میلی لیتر بدست آمد؛ بنابراین عصاره بدست آمده به روش پرکولاسیون علی رغم پایین تر بودن میزان کل ترکیبات فنولی نسبت به روش ماسریشن، به عنوان موثرترین عصاره در روبش رادیکال های آزاد مشخص شد. تعیین هویت ترکیبات فنولی عصاره بدست آمده به روش پرکولاسیون نشان می داد که نیمبولید عمده‌ترین لیمونوید تری‌ترپن و پس از آن اسیدهای فنولی و ۲و۳-دهیدروسالانول سایر ترکیبات فنولی این عصاره هستند. مقدار کل ترکیبات فنولی در این روش ۵۹۰۷/۷۶ میلی گرم به ازاء ۱۰۰ گرم عصاره بدست آمد. نتایج تست گرمخانه گذاری (۱۳ روز، دمای ۶۰°C) به منظور بررسی اثر آنتی اکسیدانی عصاره بدست آمده به روش پرکولاسیون نشان می داد که نمونه روغن سویا با غلظت ۲۰۰۰ ppm عصاره، بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی را تا روز چهارم در مهار تشکیل محصولات اولیه اکسیداسیون داشته در حالی که این غلظت قادر بود تشکیل محصولات ثانویه اکسیداسیون را تا روز سیزدهم مهار نماید.

منابع مورد استفاده

استاندارد ملی ایران، ۱۳۷۷. اندازه گیری عدد پراکسید در روغن‌ها و چربی‌های خوراکی به شماره ۴۱۷۹، چاپ اول، موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران.

مهران م، ۱۳۵۵. آزمایش روغن (تالیف واکس)، چاپ اول، انتشارات دانشگاه تهران، ۲۶۳ ص.

Amarowicz R, Naczk M and Shahidi F, 2000. Antioxidant activity of various fractions of non-tannin phenolics of canola hulls. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48: 2755-2759.

Anon, 1997. Spice constituents scavenging free radicals and inhibiting pentosidine formation in a model system. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry (Japan) 61: 263–266.

Ayres G H, 1949. Evaluation of accuracy in photometric analysis. Analytical Chemistry 21: 652–657.

Bandoniene D and Murkovic M, 2002. On line HPLC-DPPH screening method for evaluation of radical scavenging phenols extracted from apples (Malus domestica L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry 50: 2482-2487.

Biswas K, Chattopadhyay I, Ranajit K, Banerjee and Uday Bandyopadhyay, 2002. Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). Current Science Vol. 82, No. 11.

Cicco N, T Lanorte M, Paraggio M, Viggiano M and Lattanzio V, 2008. A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. Microchemical Journal 91: 107-110.

Howell J C, 1986. Food antioxidants: international perspectives-welcome and introductory remarks. Food and Chemical Toxicology 24: 997.

Ito N, Hirose M, Fukushima S, Tsuda H, Shirai T and Tatematsu M, 1986. Studies on antioxidants: their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenesis. Food and Chemical Toxicology 24: 1071-1082.

Jafari S, Shams Ardekani M, Khanavi M and Saeidnia S, 2012. Differentiation of *Azadirachta indica* A. *juss* and *Melia azedarach* L. by using pharmacognostical and preliminary phytochemical methods. Research in Pharmaceutical Sciences 7: 127-133

Manikandan P, Letchoumy P V, Gopalakrishnan M and Nagini S, 2008. Evaluation of Azadirachta indica leaf fractions for in vitro antioxidant potential and in vivo modulation of biomarkers of chemoprevention in the hamster buccal pouch carcinogenesis model, Food and Chemical Toxicology 46: 2332–2343.

Ramarathnam N, Osawa T, Ochi H and Kawakishi S, 1995. The contribution of plant food antioxidants to human health. Trends in Food Science and Technology 6: 75-82.

Prasad R B N, 2006. Neem seed oil. ProQuest Science Journals 17: 785-787.

Shahidi F, Naczk M, 2003. Phenolics in Food and Nutraceuticals. 2th ed., CRC Press, 576 p.

Sharma O P and Bhat T K, 2009. DPPH antioxidant assay revisited. Food Chemistry 113: 1202-1205.

Shon M Y, Kim T H and Sung N J, 2003. Antioxidants and free radical scavenging activity of phellinus baumii (phellinus of Hymenochaetaceae) extracts. Food chemistry 82: 593-597.

Sidewell C G, Salwin H, Benca M and Mitchel J A, 1954. The use of thiobarbituric acid as a measure of fat oxidation. Journal of the American Oil Chemists' Society 31: 603-606.

Singleton V L and Rossi J A, 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic–phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture 16: 144–158.

Sithisarn P, Supabphol R and Gritsanapan W, 2005. Antioxidant activity of Siamese neem tree (VP1209). Journal of Ethnopharmacology 99:109–112.

Sithisarn P, Supabphol R and Gritsanapan W, 2006. Comparison of Free Radical Scavenging Activity of Siamese Neem Tree (*Azadirachta indica A. Juss var. siamensis Valeton*) Leaf Extracts Prepared by Different Methods of Extraction. Medical Principles and Practice 15: 219–222.

Sithisarn P, Carlsen Ch U, Andersen M L, Gritsanapan W and Skibsted L H, 2007. Antioxidative effects of leaves from Azadirachta species of different provenience. Food Chemistry 104: 1539–1549.

Sloane H J and William S G, 1977. Spectrophotometric accuracy, linearity and adherence to Beer's law. Applied Spectroscopy 31: 25–30.

Sultana B, Anwar F and Przybylski R 2007. Antioxidant activity of phenolic components present in barks of Azadirachta indica, Terminalia arjuna, Acacia nilotica, and Eugenia jambolana Lam. Trees. Food Chemistry 104: 1106–1114.

Suhaj M, 2004. Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. Journal of Food Composition and Analysis 19(6-7):531-537.

Wettasinghe M and Shahidi F, 1999. Antioxidant and free radical-scavenging properties of ethanolic extracts of defatted borage (*Borago officinallis L.)* seeds. Food chemistry 67:399-414.

Zheng W and Wang S Y, 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49: 5165–5170.

Xuan T D, Eiji T, Hiroyuki T, Mitsuhiro M, Khanh T D and Chung I-M, 2004. Evaluation on phytotoxicity of neem (*Azadirachta indica. A. Juss*) to crops and weeds. Crop Protection 23:335–345.

Characterization of phenolic compounds present in Neem leaf extracts using HPLC and determination of their antioxidant activity

F Rahmani[1*], M H Haddad khodaparast[2], A H Elhami Raad[3] and F Khanzadeh[4]

Received: June 25, 2013 Accepted: December 30, 2013
[1]MSc graduated student, Department of food science and technology, Islamic Azad University, Sabzevar Branch, Sabzevar, Iran
[2]Professor, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
[3]Assistant professor, Department of food science and technology, Islamic Azad University, Sabzevar Branch, Sabzevar, Iran
[4]MSc graduated student, Department of food science and technology, Islamic Azad University, Sabzevar Branch, Sabzevar, Iran
[*]Corresponding author: E-mail: f1991.rahmani@yahoo.com

Abstract
Indian Neem (*Azadirachta indica L.*) leaf was extracted by three different extraction methods (Decoction, Percolation and Maceration) using two different solvents; methanol 80% (v/v) and water. Determination of total phenolic content by Folin-Ciocalteu method revealed that methanol 80% (v/v) for 7 days (maceration method) cause the highest quantity of extracted phenolic compounds. Meanwhile, determination of radical scavenging activity of three different extracts by DPPH method indicated that methanol 80% (v/v) for 24 h (percolation method) cause the highest RSA and was considered as the most effective extract. Furthermore, qualitative and quantitative characterization of phenolic compounds of percolation extract as the effective extract using HPLC revealed that Nimbolide (2896.05 mg/100 g extract) is the main limonoid triterpen followed by phenolic acids and 2′, 3′-dehydrosalannol which are 635.38 and 531/94 mg/100g extract, respectively. Determination of antioxidative effects of percolation extract in refined soybean oil (without antioxidant) using accelerated oven test (13 days, 60°C) declared that soybean oil containing 2000 ppm of the percolation extract was more stable than other concentrations until 4th day in terms of hydroperoxide when the aforementioned concentration was able to make the oil more stable until 13th day in terms of aldehydes and ketones.

Keywords: Neem leaf, Phenolic compounds, Folin-Ciocalteu, Antiradical activity, HPLC