اثر تیمارهای منطقه کشت و حلال الکلی و هیدروالکلی بر محتوای فنولی، توکوفرولی و خاصیت ضد اکسایشی عصاره برگ گیاه شنبلیله

اصغر ساویز[1*]

۱- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران.

(تاریخ دریافت: ۹۵/۰٤/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۹/۲٤)

چکیده

اکسایش لیپید یکی از عمده ترین دلایل زوال مواد غذایی و ایجاد رادیکال های آزاد است که منجر به تشکیل ترکیبات سرطان زا و سمی بالقوه در مواد غذایی می شود. این عامل باعث شده که برای جلوگیری از اکسایش، از ضد اکسایش های مصنوعی در مواد غذایی استفاده کنند که اخیراً ضرر و عوارض جانبی این ضد اکسایش ها نیز در سلامتی انسان تایید شده است. یکی از اقدام ها باید برای جلوگیری از عوارض جانبی استفاده از ضد اکسایش های مصنوعی استخراج ضد اکسایش ها از مواد غذایی وگیاهی تازه است که حاوی ترکیبات فنولیک و ضد اکسایش درسطح بالا می باشند. در این مطالعه قدرت ضد اکسایشی عصاره برگ گیاه شنبلیله دو منطقه اردبیل و ساری مورد بررسی قرار گرفت. عصاره گیاه مذکور توسط دو حلال متانول و متانول /آب (۵۰:۵۰) که تحت تاثیر روش همزن قرارگرفته بود، استخراج گردید. مقدار ترکیبات فنولیک و توکوفرولی به ترتیب با روش فولین سیوکالچو و آلفا – توکوفرول و همچنین قدرت ضد اکسایشی عصاره ها با سه آزمون ۲ و ۲ دی فنیل- ۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH)، بتاکاروتن- لینولئیک اسید و شاخص پایداری اکسایشی (OSI) اندازه گیری شده و با ضد اکسایش مصنوعی تری بوتیل هیدرو کینون (TBHQ)مقایسه گردید. نتایج بدست آمده نشان داد که عصاره استخراج شده توسط حلال متانولی برگ گیاه شنبلیله منطقه اردبیل، با مقدار فنولیک و توکوفرولی بالا، درصد مهار رادیکال آزاد(DPPH) ٦۲/۵۰ ٪ درغلظت ppm۹۰۰ ، ۸۹/۵۲ ٪ بی رنگ شدن در سامانه بتاکاروتن در غلظتppm ۵۰۰ و در سامانه OSI با مقاومت در برابر اکسایش به مدت ٤/٦٦ ساعت، دارای بیشترین خاصیت ضد اکسایشی بود. همچنین در بعضی مواقع از لحاظ آماری با ضد اکسایش مصنوعی TBHQ تفاوت معنی داری نداشت. بنابراین برگ گیاه شنبلیله دارای خاصیت ضد اکسایشی خوبی بوده و نوع حلال، منطقه کشت و روش عصاره گیری هم بر روی قدرت ضد اکسایشی عصاره ها تاثیرگذار می باشد.

کلید واژگان : شنبلیله، منطقه کشت، ضد اکسایش، DPPH، شاخص پایداری اکسایشی(OSI)

*مسول مکاتبات: saviz67@yahoo.com

۱- مقدمه

بسیاری از اختلالات فیزیولوژیکی، آسیب های بافتی وبیماری های موثر در انسان در مطالعات علمی اخیر به گونه های شیمیایی ناپایدار و بسیار واکنش پذیر، به نام رادیکال های آزاد ویا گونه های اکسیژن واکنش پذیر نسبت داده شده است[۱]. ضد اکسایش ها ترکیباتی هستند که با دادن اتم هیدروژن به رادیکال های آزاد تشکیل شده، ازگسترش واکنش های زنجیره ای اکسایش جلوگیری می کنند. کارایی و درجه تاثیر یک ضد اکسایش به سهولت جدا شدن این اتم هیدروژن از آن مربوط می شود. بدیهی است که رادیکال آزاد به جا مانده از ضد اکسایش پس از دادن هیدروژن باید حتی الامکان خود سبب تولید رادیکال آزاد اسید چرب و آغاز اکسایش آن نشود و در ضمن سریعاً توسط اکسیژن اکسید نشود. ضد اکسایش هایی که درحال حاضر مورد استفاده قرارمی گیرند اساسا دارای ساختمان فنولی با یک یا چند عامل هیدروکسیل هستند. ضد اکسایش های فنولی هرسه ویژگی فوق الذکر را دارا می باشند که دلیل آن وجود رزونانس در رادیکال آزاد تشکیل شده در آنها می باشد[۲]. اکسایش لیپید یکی ازعمده ترین دلایل فساد در مواد غذایی است که منجر به تشکیل ترکیبات سمی بالقوه می شود. این امر منجر به استفاده از ضد اکسایش های مصنوعی به عنوان مواد افزودنی در غذا برای حفظ در برابر فساد مواد غذایی شده است[۳]. شواهد بسیار زیادی وجود دارد که سمی بودن و اثرات سوء تغذیه ای ضد اکسایش های مصنوعی اضافه شده به مواد غذایی از قبیل بوتیل هیدروکسی آنیزول (BHA)، بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT)، تری بوتیل هیدرو کینون (TBHQ) و پروپیل گالات (PG) را تایید می کند. علاوه براین خطر آسیب کبدی و ایجاد سرطان در حیوانات آزمایشگاهی از معایب استفاده از ضد اکسایش های مصنوعی است[٤]. باتوجه به این شرایط، برای جلوگیری از عوارض جانبی استفاده از ضد اکسایش ها ی مصنوعی، باید اقدام هایی انجام شود. یکی از این راه ها استخراج ضد اکسایش های طبیعی از گیاهان و میوه های تازه است، که حاوی ضد اکسایش درسطح بالا می باشند[۵]. بازیابی ترکیبات ضد اکسایشی از مواد گیاهی به طور معمول از طریق روش های عصاره گیری مختلف با در نظرگرفتن خواص شیمیایی آنها و توزیع نابرابر در محیط داخل سلول های گیاهی انجام می شود. استخراج با حلال ها، اغلب روش مورد استفاده برای جداسازی ترکیبات ضد اکسایشی گیاه است. با این حال، بازدهی عصاره، محتویات پلی فنولیک، و در نتیجه فعالیت ضد اکسایشی مواد گیاهی به شدت وابسته به روش عصاره گیری و طبیعت حلال استخراج می باشد، که دلیل آن حضور ترکیبات ضد اکسایشی مختلف، مواد شیمیایی با ویژگی های متنوع و تمایل قطبی است، که ممکن است در یک حلال خاص حل شوند یا حل نشوند[٦]. شرایط اقلیمی از جمله آب و هوا، خاک و ارتفاع نیز از عوامل تاثیر گذار بر روی رشد گیاه و تغییر در میزان ترکیبات شیمیایی آن ها می باشند [۷]. شنبلیله با نام علمی *Trigonella foenum-graecum L.* گیاهی نهاندانه، از دولپه ای های جدا گلبرگ است که جزء راسته گل سرخ، تیره نخود، زیر تیره پروانه داران و جنس تریگونلا[1] از گروه تریفولیا[2] است[۸]. اندام مورد استفاده آن دانه و برگ است. شنبلیله از گیاهان بسیار قدیمی است که دارای طیف وسیعی از اثرات درمانی می باشد. خاصیت ضد اکسایشی گیاه شنبلیله [۹] بخصوص دانه ی شنبلیله [۱۰] ثابت شده، ولی قدرت ضد اکسایشی برگ شنبلیله تاکنون اندازه گیری نشده است. هدف از این مطالعه، اندازه گیری مقدار ترکیبات فنولی، توکوفرولی و قدرت ضد اکسایشی عصاره های الکلی و هیدروالکلی برگ شنبلیله و تاثیر تیمار دو منطقه کشت اردبیل و ساری بر روی آن می باشد.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- مواد

گیاه شنبلیله از دو منطقه اردبیل و ساری در سال ۱۳۹۲ تهیه گردید. برگ های آن را جدا کرده، سپس توسط دستمالی برگ های شنبلیله تمیز شد و در سایه در دمای اتاق خشک گردید. بعد از اینکه برگ ها بطور کامل خشک شدند، توسط خرد کن کاملاً به صورت پودر در آمدند. تمامی محلول های شیمیایی و معرف های بکار رفته در این تحقیق، ساخت مرک آلمان بود.

۲-۲- استخراج

پودر آماده شده از برگ های گیاه شنبلیله با نسبت ۱به ۵ با دو حلال متانول خالص و متانول /آب (۵۰:۵۰) مخلوط شده و دور از نور به مدت ٤۸ ساعت در همزن با سرعت ۲۰۰ دور

1. Trigonella
2. Trifolia

در دقیقه قرار داده شد. سپس سه مرحله سانتریفوژ و در هر مرحله فازهای آبی جمع آوری شده، با کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف شد. در ادامه توسط روتاری اواپراتور (حداکثر دما ۵۰ درجه سانتی گراد) حلال تبخیر و عصاره برگ گیاه شنبلیله بدست آمد. عصاره حاصل تا زمان انجام آزمایش در دمای ۱۸- درجه سانتی گراد نگهداری شد[۱۱].

۲-۳- اندازه گیری ترکیبات فنولی

میزان کل ترکیبات فنولی عصاره به روش فولین - سیوکالچو[1] اندازه گیری شد. در این روش معرف فولین در حضور ترکیبات فنولی در محلول قلیایی، احیا و رنگ آبی در محلول تولید می شود[۱۲].

۲-٤- اندازه‌گیری ترکیبات توکوفرولی

میزان کل ترکیبات توکوفرولی عصاره بر مبنای α - توکوفرول و با روش رنگی توصیف شده توسط ونگ و همکاران[2] (۱۹۹۸) اندازه گیری شد.

۲-۵- ارزیابی فعالیت ضد اکسایشی

۲-۵-۱- آزمون DPPH[3]

۲ و ۲ دی فنیل- ۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH) ترکیبی است بنفش رنگ که به دلیل حضور گروه های فنیل در ساختارش به راحتی به صورت رادیکال در آمده و در واقع منبع رادیکال آزاد می باشد. توانایی دادن اتم هیدروژن یا الکترون توسط ترکیبات عصاره های مختلف در تست با میزان بی رنگ کردن محلول بنفش ۲ و ۲ دی فنیل- ۱- پیکریل هیدرازیل در متانول مورد سنجش قرار می گیرد. در این تحقیق به عنوان ترکیب رادیکالی پایدار از DPPH به عنوان معرف استفاده شد، بدین ترتیب که ۵۰ میکرولیتر از غلظت های مختلف عصاره ۱۰۰، ۳۰۰، ۵۰۰، ۷۰۰، ۹۰۰ میکروگرم در سی سی به ۵ میلی لیتر محلول ۰/۰۰٤ درصد DPPH در متانول اضافه گردید و به شدت هم زده شد، بعد از ۳۰ دقیقه گرمخانه گذاری در دمای معمولی اتاق، جذب نوری نمونه ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط اسپکتروفتومتری UV -Vis (UV Visible-2100-UNICO) مقابل شاهد خوانده شد[۱٤].

1. Folin–Ciocalteu
2. Wong et al

درصد مهار رادیکال آزاد DPPH با استفاده از فرمول زیر محاسبه می گردد:

$$I\% = (A_{blank} - A_{sample} / A_{blank}) \times 100$$

در این فرمول A_{blank} جذب نوری شاهد را که فاقد عصاره می باشد نشان می دهد و A_{sample} میزان جذب نوری غلظت های مختلف عصاره را بیان می کند.

۲-۵-۲- آزمون بی رنگ شدن بتاکاروتن – لینولئیک اسید

برای انجام آزمایش ابتدا یک محلول پایه از بتاکاروتن- لینولئیک اسید (سیگما- آلدریچ) به صورت زیر تهیه گردید: نیم میلی گرم بتاکاروتن در ۱ میلی لیتر کلروفرم حل شد و سپس ۲۵ میکرولیتر لینولئیک اسید و ۲۰۰ میلی گرم توئین ٤۰ به آن اضافه گردید و کاملاً مخلوط شد. سپس با روش تبخیر در خلاء، کلروفرم جدا گردیده و ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر اشباع شده از اکسیژن (۳۰ دقیقه تحت فشار ۱۰۰ میلی لیتر در دقیقه) همراه با تکان شدید به آن اضافه شد. ۲/۵ میلی لیتر از محلول تهیه شده فوق به لوله آزمایش منتقل شد و ۳۵۰ میکرولیتر از عصاره (غلظت ۲ گرم در لیتر در اتانول) به لوله آزمایش اضافه گردید. بعد از ٤۸ ساعت گرمخانه گذاری در دمای اتاق، جذب نوری نمونه ها در ٤۹۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتری UV -Vis (UV Visible-2100-UNICO) خوانده شد و میزان فعالیت ضد اکسایشی، از مقایسه جذب نوری نمونه ها با زمان صفر و از روی میزان پایداری رنگ زرد بتاکاروتن به درصد مورد سنجش قرار گرفت[۱۵].

$$\text{درصد مهار} = \left((A_{c(0)} - A_{c(24)}) - (A_{s(0)} - A_{s(24)}) / (A_{c(0)} - A_{c(24)})\right) \times ۱۰۰$$

که در این فرمول :

$A_{c(0)}$ = جذب خوانده شده برای شاهد در زمان صفر، $A_{c(24)}$ = جذب خوانده شده برای شاهد بعد از ۲٤ساعت، $A_{s(0)}$ = جذب خوانده شده برای نمونه در زمان صفر، $A_{s(24)}$ = جذب خوانده شده برای نمونه بعد از ۲٤ ساعت می باشد.

۲-۵-۳- شاخص پایداری اکسایشی (OSI)[4]

برای تعیین پایداری اکسایشی، ۶۰۰ ppm عصاره برگ شنبلیله به روغن کانولا بدون ضد اکسایش اضافه گردید. پایداری اکسایشی توسط دستگاه رنسیمت مدل ۷٤۳، تحت شرایط

4. Oxidative stability index

دمایی ۱۲۰ درجه سانتی گراد و سرعت جریان هوا ۲۰ لیتر در ساعت انجام گرفت[۱٦].

۲-٦- تجزیه و تحلیل آماری

در این تحقیق اطلاعات به دست آمده به صورت طرح کاملاً تصادفی در قالب فاکتوریل در ۳ تکرار انجام شد. داده های به دست آمده توسط نرم افزار SPSS آنالیز و میانگین ها در سطح ۰/۰۵ توسط آزمون دانکن مقایسه گردید. در نهایت نمودار ها با نرم افزار Excel رسم شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- اندازه گیری محتوای ترکیبات فنولیک عصاره برگ شنبلیله

از بین ترکیبات گیاهی که دارای خواص ضد اکسایشی می باشند، ترکیبات فنولی توزیع گسترده ای در بسیاری از گیاهان دارند. ویژگی های ضد اکسایشی ترکیبات فنولی عمدتاً ناشی از قدرت احیاء کنندگی و ساختار شیمیایی آنهاست که آنها را قادر به خنثی کردن رادیکال های آزاد، تشکیل کمپلکس با یون های فلزی و غیر فعال کردن مولکول های اکسیژن یگانه و سه گانه می سازد. ترکیبات فنولی از طریق اهداء الکترون به رادیکال های آزاد واکنش های اکسایش چربی را مهار می کنند[۱۷]. نتایج مقایسه میانگین ترکیبات فنولی کل عصاره برگ شنبلیله تحت اثر تیمارهای مختلف در جدول۱ آمده است. همانطورکه نتایج نشان می دهد عصاره ی به دست آمده از روش متانول- اردبیل (۱۱۵۸ ± ۱/۵۰ppm) بیشترین مقدار ترکیبات فنولیک را به خود اختصاص داده و با عصاره های دیگر اختلاف معنی داری دارد.

Table 1 compares the average amount of phenolic compounds extract of fenugreek.

Solvent- cultivated area	Phenolic value(ppm)
Methanol - Sari	972.4±2.7 [b]
Methanol - Ardebil	1158±1.50 [a]
Methanol / Water-Sari	836.73±1.50 [d]
Methanol / Water-Ardebil	942±1.38 [c]

Values (Mean ± SD) in the same column with different letters (a, b, c, etc.) are significantly different (Duncan, P<0/05).

۳-۲- مقدار ترکیبات توکوفرولی عصاره های برگ شنبلیله

توکوفرول از جمله اجزای بسیار مهم ترکیبات تشکیل دهنده مواد غیر قابل صابونی روغن های گیاهی می باشند. توکوفرول ها ضد اکسایشی هایی هستند که به طور طبیعی در گیاهان وجود دارند و از طریق واکنش با رادیکال های آزاد و سوق دادن واکنش های اکسایشی به مراحل پایانی، چربی ها و روغن ها را در برابر تخریب های مربوطه محافظت می نمایند. تعیین مقدار و شناسایی توکوفرول ها در عصاره های گیاهی به دلیل ویژگی های ضد اکسایشی و نیز آثار مثبت تغذیه ای آنها بر واکنش های سوخت و ساز بدن انسان بسیار حائز اهمیت است[۱۸]. با توجه به جدول ۲، مشاهده می گردد که متانول – اردبیل (٤۳۷/۳±۰/۱ ppm) بیشترین مقدار توکوفرول را به خود اختصاص داده اند. همانطور که در جدول ۲ دیده می شود روش های حاوی حلال متانول نسبت به حلال متانول/آب بیشترین مقدار توکوفرول را نشان می دهند. همچنین در بین دو منطقه، اردبیل در هر دو حلال استخراج نسبت به ساری دارای اختلاف معنی دار می باشد.

Table 2 compares the average amount of tocopherol extract of fenugreek.

Solvent- cultivated area	Tocopherol content (ppm)
Methanol - Sari	417.59±0.14 [b]
Methanol - Ardebil	437.3±0.1 [a]
Methanol / Water-Sari	119.79±0.14 [d]
Methanol / Water-Ardebil	127.73±0.29 [c]

Values (Mean ± SD) in the same column with different letters (a, b, c, etc.) are significantly different (Duncan, P<0/05).

از آنجائیکه هریک از مواد گیاهی دارای خواص منحصر به فرد بر حسب ساختار و ترکیبات می باشند، وقتی آنها با حلال ها ترکیب می شوند، رفتار مخلوط حاصل (سامانه حلال- ماده) غیر قابل پیش بینی می شود[۱۹]. سوتیلو و همکاران[1] (۱۹۹٤) استخراج فنولیک ها را از پوست سیب زمینی با استفاده از متانول و آب بررسی کردند و دریافتند که حلال متانول در ^{o}C ٤ عصاره گیر کارآمدتری از آب در ^{o}C ۲۵ است. محتوای فنولی روشهای استخراج متانولی و اتیل استات گزارش شده توسط آنوکوورو و همکاران[2](۲۰۱۱) برای عصاره پوست گیاه *Azadirachta indica* کمتر از محتوای فنولی روشهای استخراج متانولی و اتیل استات پوست *Azadirachta indica* ارائه شده توسط قیمرای و همکاران[3] (۲۰۰۹) و بر عکس محتوای فلاونوئیدی عصاره ای که توسط آنوکوورو و همکاران اندازه گیری شده بود بیشتر از محتوای فلاونوئید ی بود که توسط قیمرای و همکاران به دست آورده بودند، که می توان این مشاهدات را به موقعیت های جغرافیایی مختلف نسبت داد.

۳-۳- بررسی خاصیت ضد اکسایشی با روش DPPH

در این آزمون، رادیکال های آزاد DPPH با ضد اکسایش ها یا دیگر گونه های رادیکالی که دهنده ی هیدروژن می باشند، واکنش داده و به شکل کاهش یافته در می آید و رنگ آن از بنفش تیره به زرد روشن تبدیل شده و در نتیجه میزان جذب در طول موج ۵۱۷- ۵۱۵ نانومتر کاهش می یابد[۲۳]. ظرفیت به دام اندازی رادیکال های آزاد به روش DPPH در جدول ۳ نشان داده شده است. در تحقیق حاضر همانطور که مشاهده می شود ضد اکسایش مصنوعی TBHQ بیشترین مقدار(٦٤/۸۸±۰/۳۵ درصد) را به خود اختصاص داده و با عصاره های دیگر دارای اختلاف معنی داری می باشد و بعد از آن عصاره متانول- اردبیل با مقدار ٦۲/۵۰±۰/۰۲ درصد قرار گرفته که با دیگر عصاره ها دارای اختلاف معنی داری می باشد. این نتیجه در توافق با مطالعه اسماعیل زاده کناری و همکاران[4] (۲۰۱٤) و پینلو و همکاران[5] (۲۰۰٤) می باشد که عصاره متانولی بهترین عصاره برای مهار رادیکال آزاد ذکر شده بود. آنها دریافتند فعالیت ضد اکسایشی عصاره متانولی بیشتر از عصاره اتانولی و عصاره اتانولی بیشتر از عصاره آبی است و می تواند رادیکال آزاد DPPH زیادی را مهار کند. همانطور که در جدول مشاهده می گردد، فعالیت ضد اکسایشی همه عصاره ها با افزایش غلظت از ۱۰۰ppm تا ۹۰۰ ppm، افزایش می یابد. این نتایج در توافق با تحقیق اسماعیل زاده کناری و همکاران (۲۰۱٤) و ایگزیا و همکاران[6] (۲۰۱۲) می باشد که غلظت عصاره یک فاکتور موثر در افزایش فعالیت ضد اکسایشی ذکر شده بود.

معمولاً برای مقایسه فعالیت ضد رادیکالی عصاره های مختلف از فاکتوری تحت عنوان EC_{50} استفاده می شود. طبق تعریف EC_{50} به غلظتی از عصاره اطلاق می گردد که در آن ۵۰ ٪ از رادیکال های آزاد DPPH موجود در محیط واکنش مهار شوند[۲٦]. فاکتور EC_{50} نسبت معکوسی با فعالیت ضد اکسایشی دارد. بدیهی است که هر چه این عدد کوچکتر باشد قدرت ضد اکسایشی یا مهار رادیکال های آزاد بیشتر می باشد[۲۷]. همانطور که در شکل ۱ مشاهده می گردد، ضد اکسایش مصنوعی TBHQ کمترین مقدار EC_{50} (ppm ۷۷/۰٦±۰/٤۲) را به خود اختصاص می دهد. عصاره متانول- اردبیل با مقدار (۳۸۰/۵۸±۰/۷۳ppm) بعد از آن قرار دارد. اسماعیل زاده کناری و همکاران (۲۰۱٤) در بررسی که بر روی خاصیت ضد اکسایشی کنجاله کنجد انجام دادند، نشان داد که پایین ترین EC_{50} مربوط به ضد اکسایش مصنوعی BHA می باشد و بعد از آن عصاره استخراج شده به روش متانولی قرار می گیرد و همچنین عصاره های آبی/ الکلی بیشترین EC_{50} را به خود اختصاص داده بودند، یعنی کمترین فعالیت ضد اکسایشی را داشتند. همچنین با توجه به دو منطقه کشت، مشاهده می شود در هر دو روش متانولی و متانول /آبی اردبیل کمترین EC_{50} را به خود اختصاص داده است. در مطالعه اسویت و همکاران[7] (۲۰۰۷) در هندوستان روی اثرات ضد اکسایشی عصاره اتانولی نعناع نشان داد که EC_{50} آن برابر ۲۸/۵ میکروگرم در میلی لیتر و برای BHA برابر با۱۰/۱ میکروگرم در میلی لیتر بود در حالی که EC_{50} بدست آمده برای عصاره اتانولی نعناع ایرانی توسط کامکار و همکاران[8] (۱۳۸۸) برابر با ۱۲ میکروگرم در میلی لیتر بوده است. تحقیقات مذکور نشان می دهد که مناطق کشت هم بر روی قدرت ضد اکسایشی تاثیر دارد، که با نتایج این پژوهش هم خوانی دارد.

1. Sotillo et al
2. Anokwuru et al
3. Ghimeray et al
4. Esmaeilzadeh Kenari et al
5. Pinelo et al
6. Xiea et al
7. Sweetie et al
8. kamkar et al

Table 3 The mean percentage of DPPH free radical scavenging extract of fenugreek both Sari and Ardebil.

Different concentrations of the extract / Ways of Extraction	100 ppm	300 ppm	500 ppm	700 ppm	900 ppm
Methanol-Sari	39.43±0.04 [p]	43.76±0.02 [n]	48.60±0.06 [k]	51.75±0.02 [h]	56.52±0.58 [d]
Methanol / water-Sari	35.58±0.02 [s]	36.91±0.06 [r]	44.68±0.04 [m]	49.74±0.02 [j]	52.05±0.04 [g]
Methanol-Ardebil	41.49±0.02 [o]	47.72±0.04 [l]	55.87±0.02 [e]	58.03±0.02 [c]	62.50±0.02 [b]
Methanol / water-Ardebil	35.66±0.02 [s]	38.09±0.02 [q]	45.46±0.02 [l]	50.80±0.04 [i]	52.76±0.60 [f]
TBHQ	64.88±0.35 [a]				

Values (Mean ± SD) in the same column with different letters (a, b, c, etc.) are significantly different (Duncan, P<0/05).

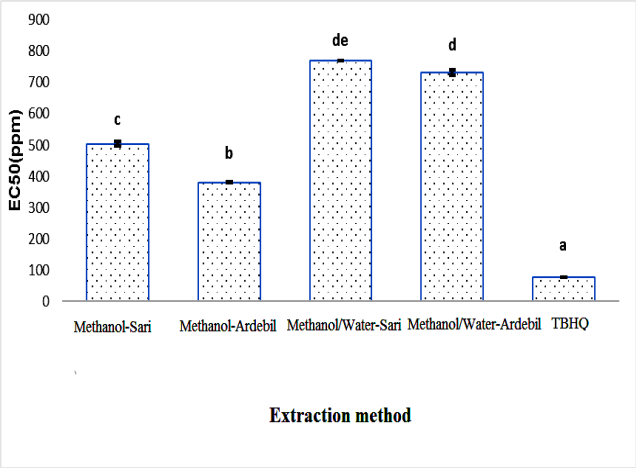

Fig 1 Comparison of EC50 (in ppm) extracts and synthetic antioxidant TBHQ (Duncan, P<0/05)

۳-٤- بررسی خاصیت ضد اکسایشی با بی رنگ شدن بتاکاروتن

در این روش فعالیت ضد اکسایشی، با آزمون بی رنگ شدن بتاکاروتن مورد سنجش قرار می گیرد، به این صورت که مواد ناشی از اکسایش اسید لینولئیک با بتاکاروتن برهم کنش داده و سبب کاهش رنگ شده و در نتیجه میزان جذب در طول موج ٤٩٠ نانومتر کاهش می یابد[١٥]. همانطور که در جدول ٤ مشاهده می شود درصد فعالیت ضد اکسایشی بر حسب بی رنگ شدن بتاکاروتن، ضد اکسایش مصنوعی TBHQ در ١٠٠ppmو غلظت ٥٠٠ ppm عصاره متانول- اردبیل به ترتیب ٨٨/٢٧ ٪ و٨٩/٥٢٪ بیشترین مقدار را دارا بوده و با هم اختلاف معنی داری ندارند. با توجه به جدول در هر چهار روش با افزایش غلظت تا ٥٠٠ ppm درصد مهار افزایش یافته و بعد از آن حالت نزولی مشاهده می گردد. نتایج بدست آمده از الگوی خاصی پیروی نمی کنند ولی با توجه به غلظت ها، روش های استخراج و منطقه کشت باهم تفاوت دارند. بتاکاروتن در گیاهان مختلف وجود دارد و پیش ساز ویتامین A بوده و یکی از مواد ضد اکسایشی قوی به شمار می‌رود که از تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در بدن جلوگیری می‌کند و از این رو در بدن عملکرد مستقل از ویتامین A دارد. برگ شنبلیله حاوی کاروتن و دارای خاصیت ویتامین A می باشد[٣٠]. بعلاوه بریور[1] (٢٠١١) نشان داد که یک ارتباط مثبت بین فعالیت ضد اکسایشی و ویتامین C و ویتامین E و بتاکاروتن (ویتامین A) وجود دارد. احتمالاً در این تحقیق دلیل کاهش درصد مهار بعد از غلظت ٥٠٠ppm به افزایش بیش از حد بتاکاروتن و ضد اکسایش های دیگر مرتبط باشد. چون ترکیبات ضد اکسایشی تا یک حد می توانند خاصیت ضد اکسایشی داشته باشند بعد از آن با افزایش غلظت، خاصیت پرواکسیدانی پیدا می کنند[٣٢و٣٣]. کامکار[2] در سال ١٣٨٨ با بررسی فعالیت ضد اکسایشی عصاره شوید ایرانی که با روش همزن - اتانول و با تست بتا کاروتن - لینولئیک اسید بود، مقدار درصد مهار را ٥٦٪ بدست آورد، در حالی که یانگ شین و همکارانش[3] (٢٠٠٩) در تایوان با همین روش عصاره گیری و با آزمون بتا کاروتن درصد مهار را برای عصاره شوید ٧٢/٢٣ ٪ بدست آوردند. کامکار و همکاران[4] در سال ١٣٩٠ با مطالعه فعالیت ضد اکسایشی عصاره متانولی پونه ایرانی بوسیله آزمون بتاکاروتن– لینولئیک اسید مقدار درصد مهار را ٨٤/٧٩ ٪ بیان کردند، در حالی که گولوس و همکاران[5](٢٠٠٧) در مطالعه خود روی خواص ضد اکسایشی عصاره متانولی پونه در تست بتا کاروتن قدرت مهاری عصاره را ٢٤٪ اعلام کردند. این پژوهش ها هم نشان می دهد که منطقه کشت بر روی قدرت ضد اکسایشی تاثیر گذار می باشد که با تحقیق حاضر هم خوانی دارد.

1. Brewer
2. kamkar
3. Yung-Shin et al
4. kamkar et al
5. Golluce et al

Table 4 The mean percentage of beta-carotene bleaching extract of fenugreek both Sari and Ardebil. Values (Mean ± SD) in the same column with different letters (a, b, c, etc.) are significantly different (Duncan, P<0/05).

Different concentrations of the extract / Extract methods	100 ppm	300 ppm	500 ppm	700 ppm	900 ppm
Methanol-Sari	51.42±1.42 [i]	51.89±0.82 [hi]	81.90±1.64 [b]	52.37±0.82 [h]	62.37±0.82 [f]
Methanol / Water-Sari	80.94±0.81 [b]	54.28±1.43 [f]	81.89±0.82 [b]	46.66±0.82 [j]	66.18±082 [d]
Methanol-Ardebil	51.42±0.0 [i]	57.14±1.43 [g]	89.52±0.82 [a]	61.94±0.81 [f]	51.66±0.82 [i]
Methanol / Water-Ardebil	42.37±0.0 [l]	45.71±0.56 [k]	78.09±0.82 [c]	56.66±0.82 [g]	64.75±0.0 [e]
TBHQ	88.27±0.0 [a]				

۳-۵- بررسی شاخص پایداری اکسایشی عصاره های برگ شنبلیله

شاخص پایداری اکسایشی بعنوان زمان مورد نیاز، برحسب ساعت، برای رسیدن به حداکثر تغییرات هدایتی تعریف شده است. با این حال، این روش ممکن است در دماهای مختلفی در دامنه ۱۰۰ تا ۱٤۰ درجه سانتی‌گراد که برای بسیاری از روغن‌ها مناسب است، انجام می‌شود. در بین ویژگیهای کیفی روغن ها و چربی های خوراکی، پایداری اکسایشی از اهمیت ویژه ای برخوردار است. طی فرآیندهای حرارتی در صورت پایدار نبودن روغن در این دماها محصولات اولیه و ثانویه اکسایشی نظیر آلدهیدهای کوتاه زنجیر، هیدروپراکسیدها و مشتقات کتونی تولید می گردند[۳۸]. شکل ۲شاخص پایداری اکسایشی عصاره های برگ شنبلیله و ضد اکسایش مصنوعی TBHQ را روی روغن کانولا نشان می دهد. نتایج به دست آمده برای شاخص پایداری اکسایشی نشان می دهد که دو عصاره متانول - اردبیل (۰/۱۱±٤/٦٦ ساعت) و متانول - ساری (۰/۰۷±٤/٦٤ ساعت) با ضد اکسایش مصنوعی TBHQ (۰/۱۸±٤/۷۰ساعت) برابری کرده و از لحاظ آماری اختلاف معنی داری نداشته است. همچنین داده ها نشان می دهد که عصاره های متانولی اختلاف معنی داری با عصاره های هیدروالکلی دارد.

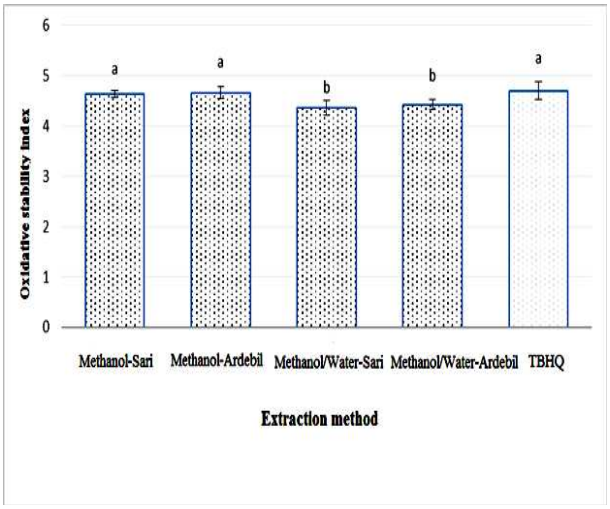

Fig 2 oxidative stability index of fenugreek extract and compare them with synthetic antioxidant TBHQ

٤- نتیجه گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که عصاره برگ شنبلیله حاوی مقادیر قابل توجهی ترکیبات فنولیک و توکوفرولی می باشد. از آنجا که ترکیبات فنولیک و توکوفرولی دارای قدرت ضد اکسایشی می باشند و بین این ترکیبات و خاصیت ضد اکسایشی رابطه مستقیم وجود دارد، پس می توان نتیجه گرفت که عصاره برگ شنبلیله دارای قدرت ضد اکسایشی مناسبی است. بنابراین می توان این گیاه را منبع جدیدی از ضد اکسایش طبیعی ارئه نمود. همچنین آزمون های DPPH، بتاکاروتن – لینولئیک اسید و شاخص پایداری اکسایشی نشان دادند که عصاره متانولی برگ شنبلیله دارای قدرت ضد اکسایشی خوبی بوده و قابل مقایسه با ضد اکسایش های مصنوعی می باشد. در ضمن، بین دو منطقه کشت، عصاره های

برگ گیاه شنبلیله اردبیل نسبت به ساری دارای خاصیت ضد اکسایشی خوبی بودند. در کل، مطالعه حاضر این نظریه را تایید می کند که مقدار فنولیک، ترکیبات ضد اکسایشی و وسعت فعالیت ضد اکسایشی عصاره ها به نوع و بخش گیاه، حلال مورد استفاده برای استخراج و منطقه کشت بستگی دارد. لذا به نظر می رسد که برای استفاده عملی از خواص ضد اکسایشی این گیاه در بخش- های مختلف، باید تحقیقات بیشتری در زمینه ارزیابی قدرت ضد اکسایشی عصاره آن در مدل های غذایی انجام شود.

۵- منابع

[1] Subhasree, B.; Baskar, R.; Keerthana, R.L.; Susan, R. L.; Rajasekaran, P. ;(2009); Evaluation of antioxidant potential in selected green leafy vegetables. Food Chemistry. 115:1213-1220.

[2] Fatemi,H.;(1389); Food Chemistry, Tehran Publishing Company Publication, Eighth Edition

[3] Tawaha, K.; Alali, F. Q.;Gharaibeh,M.; Mohammmad, M.; EL-Elimat,T.; (2007); Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. Food Chemistry. 104: 1372-1378.

[4] Gao, J.J.;Igalashi, K.;Nukina, M.; (1999);Radical scavenging activity of phenyl propanoid glycosides in Caryopteris incana. Bioscience Biotechnology Biochemistry. 63:983-988.

[5] Zahida,W.N.;(2009); Extraction of antioxidant compounds from red pitaya using Soxhlet extraction method.Thesis of Faculty of Chemical & Natural Resources Engineering University Malaysia Pahang.

[6] Sultana, B.; Anwar, F.; Ashraff, M.;(2009); Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. Molecules.14:2167-2180.

[7] Cao, G.; Prior, R. L.; (1998);Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum; Clinical Chemistry.;44:1309–1315.

[8] Hasanzadeh, A.; Rezazadeh, Sh.; Shamsa, S.; Dolatabadi,R.;Zaringhalam,j.;(1389); A review of the medical and phytochemical properties of fenugreek; Journal of Medicinal Plants; ninth year; Volume II, No. thirty-fourth.

[9] Kaviarasan, S.; Naik, G. H.; Gangabhagirathi, R.; Anuradha, C.V.; Priyadarsini K.I.; (2007); Priyadarsini b, in vitro studies on antiradical and antioxidant activities of fenugreek (Trigonella foenum graecum) seeds; Food Chemistry; 103:31–37.

[10] Dua, A.; Vats, S.; Singh, V.; Mahajan, R.; (2013); Protection of biomolecules against in vitro oxidative damage by the antioxidants from methanolic extract of trigonella foenum-graecum seeds; International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research (IJPSR); 4(8): 3080-3086.

[۱۱] Esmaeilzadehkenari, R.; Mehdipour,S.; (1391) ; Kiwi peel extract antioxidant effect on the stabilization of sunflower oil; Research Journal of Food Science and Industry; Volume 8; Issue 2; S.250-245.

[12] Capannesi, C.; Palchetti, I.; Mascini, M.; Parenti, A.; (2000); Electrochemical sensor and biosensor for polyphenols detection in olive oils; Food Chemistry; 71: 553-562.

[13] Wong, M.L.; Timms, R.E.; (1998); Colorimetric determination of total tocopherols in palm oil, olein and stearin journal of Am; Oil Chem; Soa; 65: 258-261.

[14] Burits, M.; Bucar, F.; (2000); Antioxidant activity of Nigella sativa essential oil; Phytotheraphy Research; 14: 328–323.

[15] Dapkevicius, A.; Venskutonis, R.;Van Beek, T. A.; Linssen, P.H.; (1998); Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania;Science Food Agric;77: 140–146.

[16] Farhoosh, R.; (2007); The effect of operational parameters of the Rancimat Method on the determination of the oxidative stability measures and shelf-life predication of soybean oil; Journal of American Oil Chemists Society.

[17] Ahmadi, F.; Kadivar, M.; Shahedi, M.; (2007); Antioxidant activity of Kelussia odoratissima Mozaff in model and food systems; Food Chemistry; 105: 57-64.

[18] Gohari ardebili,A.;(1388); Physicochemical properties and oxidative stability pumpkin seed oil, canola oil seeds, paper and its effect on sharply during deep frying; thesis; Ferdowsi University of Mashhad; 26.

[19] Pinelo, M.; Rubilar, M.; Jerez, M.; Sineiro, J.; Nu˜nez, M.J. ; Agric, J.; (2004) ; Food Chemistry; 53:2111–2117.

[20] Sotillo, R. D.; Hadley, M.; Holm, E. T.; (1994); Phenolics in aqueous potato peel extract: Extraction, identification and degradation; J. Food Sci, 59(2): 649-651.

[21] Anokwuru, C.P.; Anyasor, G.N.; Ajibaye, O.; Fakoya, O.; Okebugwu, P.; (2011);Effect of extraction solvents on phenolic, flavonoid and antioxidant activities of three Nigerian medicinal plants; Nature and Science.;9(7)

[22] Ghimeray, A.K.; Jin, C.; Ghimine, B.K.; Cho, D.H.; (2009);Antioxidant activity and quantitative estimation of azadirachtin and nimbin in azadirachta indica A. Juss grown in foothillsof Nepal; African Journal of Biotechnology; 8 (13): 3084-3091.

[23] Dordevic, S.; Petrovic, S.; (2007); Antimicrobial, anti-inflammatory, anti-ulcer and antioxidant activities of Carlina acanthifolia root essential oil. J of Ethno pharmacology. 109: 458-63.

[24] Esmaeilzadeh Kenari, R.; Mohsenzadeh, F.; Raftani Amiri, Z.; (2014); Antioxidant activity and total phenolic compounds of Dezful sesame cake extracts obtained by classical and ultrasound-assisted extraction methods; Food Science & Nutrition; Open Access; Original Research.

[25] Xiea, J.-H.; Shena, M.-Y. ; Xiea, M.-Y. ; Niea, S.-P. ; Chena, Y.; Li, C.; et al.;(2012); Ultrasonic-assisted extraction, antimicrobial and antioxidant activities of Cyclocarya paliurus (Batal.) Iljinskaja polysaccharides; Carbohydr. Polym. 89:177–184.

[26] Rakic, S.; Petrovic, S.; Kukic, J.; Jadranin, M.; Tesevic, V.; Povrenovic, D. & Siler Marinkovic, S.; (2007); Influence of thermal treatment on phenolic compounds and antioxidantproperties of oak acorns from Serbia; Food Chemistry, 104: 830-834.

[27] Kamkar,A.;Torian,F.;Akhondzadeh basti,A.;Misaghi,A.;Shariatifar,N.;(1388); Evaluate and compare the antioxidant activity of chemical compounds Savory essential oil and alcoholic extract.

[28] Sweetie, R.; Kanatt, R.C.; Arun, S.; (2007); Antioxidant potential of mint (Mentha spicataL.) in radiation –processed lamb meat; Food Chemistry 100, 451-458.

[7] Kamkar.A.;Asadi,F.;Jabali javan.;A.;Jamshdi,R.;(1388); Evaluation of the antioxidant capacity of Iranian oil and peppermint extract; veterinary and laboratory; Volume 1, Issue 1.

[30] Nazar, A.N and Tinay, A.H; (2007); Functional properties of Fenugreek (Trigonella foenum graceum) protein concentration; J. Food Chemistry; 103: 582-589.

[31] Brewer, M,; (2011); Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications; Comprehensive reviews in food science and food safety; 10(4); 221-247.

[۳۲] Parizan, T.;Elhamirad, A.;Estiri,S.h.; Armin,M.;(1390); Antioxidant activity of methanol extract of senna leaves and its effect on the stability of soybean oil, magazine Journal of Food Science and Technology; the third year; the first number .

[33] GHanbarzadeh,B.;(1388); Compact chemical food, publishing: Ayizh.

[۳٤] Kamkar,A.;(1388); Iranian dill essential oil and extract antioxidant study, Journal of Gonabad University of Medical Sciences and Health Services, Volume 15, Issue 2.

[35] Yung-Shin, S.;Jau-Tien, L.; Yuan-Tsung, C.; China-Jung, C.; Deng-Jue, Y.; (2009); Evaluation of antioxidant ability of ethanolic extract from dill (Anethum graveolens L.) flower; Food Chemistry; 115(2): 515-521.

[36] Kamkar, A.; Shariatifar, N.;Jamshidi, A. ;Jabali javan, A.;Sadeghi, T. ;Zigham monfared, M.; (1390); The antioxidant activity of essential oil of oregano extract (Mentha longifolia) in vitro Iran; Journal of Medicinal plants eleventh year, the first period, especially a No. 8.

[37] Golluce, M.; Sahin, F.; Sokmen, M.; Ozer, H.; Daferera, D.; Sokmen, A.; Polissiou, M.; Adiguzel, A.; Ozken, H.; (2007); Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from Mentha longifolia L.ssp.longifolia; Food Chem; 103: 1449-1456.

[38] Márquez-Ruiz, G. M.; Martín-Polvillo, J.; Velasco and C. Dobarganes; (2008); Formation of oxidation compounds in sunflower and olive oils under oxidative stability index conditions; Eur. J. Lipid Sci. Technol, 110 (5): 465-471.

Effect of cultivated area treatments and alcoholic and hydro-alcoholic solvent on phenolic, tocopherol and antioxidant property content of Fenugreek leaf extract

Asghar Saviz [1*]

1. Department of Food Science and Technology, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran.

(Received: 2016/07/19 Accepted: 2016/12/14)

Lipid oxidation is one of the main reasons for the decline of food and the production of free radicals, which lead to the formation of potential carcinogenic and toxic compounds in food. This factor has led to use the synthetic anti-oxidation in food for preventing oxidation, which recently harm and side effects of these antioxidants has also been confirmed in human health. One of the measures to prevent side effects of the use of synthetic anti-oxidation is extraction of anti-oxidation of food and fresh plant, which contains phenolic compounds and the antioxidant at a high level. In this study, the anti-oxidant power of fenugreek leaf extract in two Ardebil and Sari areas were studied. The extract was extracted by methanol and methanol / water solvent (50:50) which had been affected by the mixer method. The amount of phenolic and tocopherols compounds was measured by using Folin–Ciocalteu and alpha – tocopherol, respectively, as well as anti-oxidant power of extracts was measured by three tests of 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), beta-carotene-linoleic acid and oxidative stability index (OSI), and they were compared with the tert-butyl hydroquinone (TBHQ). The results showed that the extract extracted of fenugreek leaf in Ardebil area by methanol solvent, with amount of phenolic and high tocopherols, the percentage of free radical scavenging (DPPH) 62.50% at concentration of 900 ppm, 89.52% bleaching at beta-carotene system at concentration of 500 ppm and at OSI system with resistance to oxidation for 4.66 hours, had the highest anti-oxidant property. Also, in some cases, there was no significant difference between it and the synthetic antioxidant TBHQ statistically. So, fenugreek leaf had good antioxidant property, and kind of solvent, cultivated area and extraction method is effective on antioxidant power of the extracts.

Keywords: Fenugreek, Cultivated area, Antioxidant, DPPH, Oxidative stability index (OSI)

[*]Corresponding Author E-Mail Address: saviz67@yahoo.com