استخراج عصاره آنتی اکسیدانی از ضایعات کاهو به کمک اولتراسوند و ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی آن

ندا احمدی کمازانی[a*]، امیر حسین الهامی‌راد[b]، مهرداد قوامی[c]، مهدی مریدی فریمانی[d]، محمد آرمین[e]

[a] دانش آموخته دکترای تخصصی گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران
[b] دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران
[c] استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[d] دانشیار گروه فیتوشیمی، پژوهشکدهٔ گیاهان و مواد اولیهٔ دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
[e] دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۸/۱۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۹/۴

چکیده

مقدمه: علیرغم وجود خاصیت آنتی اکسیدانی بالا در ضایعات کاهو، هیچ گزارشی در مورد ارزیابی عصاره آنتی اکسیدانی آن در پایدارسازی روغن‌های خوراکی موجود نمی باشد. بنابراین اهداف این پژوهش، بررسی بازیابی عصاره آنتی اکسیدانی از برگ های خارجی کاهو به عنوان ضایعات این محصول از طریق استخراج اولتراسونیک و ارزیابی تأثیر آنتی اکسیداتیو عصاره مذکور بود.

مواد و روش‌ها: استخراج عصاره آنتی اکسیدانی از نمونه پودر شده ضایعات کاهو به کمک اولتراسوند با حلال اتانول/ آب (۷۰:۳۰ حجمی/ حجمی) در دمای $^{\circ}C$ ۵۰، زمان ۳۰ دقیقه، فرکانس ۴۰ کیلو هرتز و نسبت ماده جامد به حلال ۱:۲۰ (وزنی/ حجمی) صورت گرفت. راندمان استخراج، مقدار ترکیبات فنولیک کل و IC_{50} عصاره تعیین شد، سپس عصاره به روغن تالواولئین افزوده شد. آثار حفاظتی غلظت های مختلف عصاره (۰، ۴۰۰، ۸۰۰، ۱۰۰۰ و ppm۲۰۰۰) در پایدارسازی روغن تالواولئین از طریق پایش تغییرات اندیس‌های پراکسید، پاراآنیزیدین، توتوکس و نیز شاخص پایداری اکسیداتیو تحت اکسیداسیون تسریع یافته، ارزیابی و فعالیت آنتی اکسیدانی غلظت های مختلف عصاره در پایدارسازی روغن تالواولئین با آنتی اکسیدان‌های سنتتیک BHA و BHT (۲۰۰ ppm) مقایسه گردید.

یافته‌ها: راندمان استخراج، مقدار ترکیبات فنولیک کل و IC_{50} عصاره به ترتیب ٪۱/۲۰± ۳۰/۴۵، (mg GAE /100g DW) ۶/۲۹ ± ۶۰۰/۱۵ و ۱۷۴/۰۵ppm تعیین شد. نتایج نشان داد که این عصاره آنتی اکسیدانی (در غلظت ppm ۲۰۰۰) دارای عملکردی به خوبی آنتی‌اکسیدان BHT (۲۰۰ ppm) در به تأخیر انداختن فساد اکسیداتیو تالواولئین می باشد.

نتیجه‌گیری: عصاره آنتی اکسیدانی ضایعات کاهو می تواند به عنوان آنتی اکسیدان طبیعی جهت به تأخیر انداختن سرعت اکسیداسیون روغن‌های خوراکی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: *استخراج به کمک اولتراسوند، پایداری اکسیداتیو، تالواولئین، ضایعات کاهو، عصاره آنتی اکسیدانی*

* نویسنده مسئول مکاتبات
email: ahmadi.academic@gmail.com

مقدمه

آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک مانند بوتیل هیدروکسی آنیزول (BHA)، بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT) و ترشری بوتیل هیدروکینون (TBHQ) می‌توانند در بسیاری از مخاطرات سلامتی مانند سرطان سهیم باشند (Prior, 2004). علاوه بر این، قوی ترین آنتی اکسیدان سنتتیک (TBHQ) جهت کاربردهای غذایی در ژاپن، کانادا و اروپا مجاز نمی‌باشد. همچنین BHA از لیست ترکیبات GRAS[1] حذف شده است (Goli *et al*., 2005). به دلیل این نگرانی های مرتبط با ایمنی، یک تمایل رو به افزایش در میان متخصصین غذا جهت جایگزین نمودن آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک با انواع طبیعی که تصور می‌شود ایمن تر باشند وجود دارد (Yanishlieva & Marinova, 2001). تولید و فرآوری میوه‌جات و سبزیجات مقادیر قابل ملاحظه ضایعات تولید می‌نماید که می‌تواند به عنوان منبع سرشار از پلی‌فنول‌های آنتی‌اکسیدانی در نظر گرفته شود (Peschel *et al*., 2006; Wijngaard *et al*., 2009).

در حال حاضر ضایعات فوق الذکر، اغلب دور ریخته می‌شوند و به این ترتیب تولید کننده را متحمل هزینه می‌نمایند. استفاده از این ضایعات به عنوان منبعی از پلی فنول‌ها می‌تواند برای تولید کنندگان مواد غذایی از نظر اقتصادی دارای فواید قابل ملاحظه باشد (Kabir *et al*., 2015). همچنین بازیابی ترکیبات بیو اکتیو از ضایعات مذکور، یکی از مؤثرترین راهکارهای مدیریتی جهت ممانعت از آلودگی محیط زیست توسط آن‌ها است.

کاهو (*Lactuca sativa* L.)، سبزی برگی شکل مهم متعلق به خانواده Asteraceae محسوب می‌شود. عصاره‌های برگ کاهو حاوی ترکیبات با فعالیت‌های مهار رادیکال پراکسیل می‌باشند (Caldwell, 2003). عصاره کاهو فعالیت آنتی اکسیدانی قابل مقایسه با آلفا توکوفرول و کوئرستین را نشان می‌دهد (Souri *et al*., 2004). مطالعات زیادی در رابطه با تأثیر آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های کاهو وجود دارد.

Altunkaya و همکاران (۲۰۰۹)، فعالیت آنتی-اکسیدانی عصاره کاهو و سینرژیسم با آنتی اکسیدان‌های فنولیک را مطالعه نمودند. آن ها نشان دادند که کاهو یک منبع غنی از آنتی‌اکسیدان‌ها جهت‌جلوگیری از اکسیداسیون لیپید در سیستم لیپوزوم می باشد.

Im و همکاران (۲۰۱۰)، آثار ضد تخریب و زوال سیستم اعصاب عصاره‌های فنولی و مشتقات کافئیک اسید را در کاهوی Romaine مورد بررسی قرار دادند.

Edziri و همکاران (۲۰۱۱)، اثرات آنتی اکسیدانی، آنتی باکتریایی و آنتی ویروسی عصاره های کاهو واریته Longifolia را ارزیابی نمودند.

Tiveron و همکاران (۲۰۱۲)، فعالیت آنتی اکسیدانی سبزیجات برزیلی (از جمله کاهو) و ارتباط آن با ترکیب فنولی را بررسی نمودند.

Harsha و همکاران (۲۰۱۳)، خصوصیات آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ کاهو را در حفاظت از بیو مولکول‌هایی نظیر اسیدهای نوکلئیک، پروتئین و لیپید مورد ارزیابی قرار دادند.

Harsha و Anilakumar (۲۰۱۳)، عملکرد حفاظتی آنتی اکسیدان‌های کاهو در برابر سمیت ایجاد شده در سیستم اعصاب توسط آلومینیوم را بررسی نمودند.

Viacava و همکاران (۲۰۱۴)، فیتوکمیکال‌ها و فعالیت آنتی اکسیدانی را در کاهو واریته Butterhead مورد مطالعه قرار دادند.

L´opez و همکاران (۲۰۱۴)، ترکیب شیمیایی و ظرفیت آنتی اکسیدانی انواع مختلف کاهو regular-sized (Romaine) و (Little Gem و Mini Romaine) baby-sized را بررسی نمودند.

Pepe و همکاران (۲۰۱۵)، فعالیت ضدالتهابی و ترکیبات پلی‌فنولیک استخراج شده از کاهوی سبز را ارزیابی نمودند. نتایج آن‌ها نشان داد که کاهوی سبز دارای فعالیت‌های آنتی اکسیدانی و ضد التهابی قوی می‌باشد.

Viacava و همکاران (۲۰۱۵)، بهینه سازی پارامترهای تعیین کننده در طول استخراج آنتی اکسیدان‌ها از کاهو (butterhead lettuce) را جهت افزایش مقادیر ترکیبات فنولیک و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره بررسی نمودند.

همچنین برخی از محققین نشان داده اند که ضایعات کاهو می تواند به عنوان یک منبع مورد توجه و کم هزینه از آنتی اکسیدان‌های طبیعی جهت فراسودمند نمودن مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرد (Llorach *et al*., 2004).

[1] Generally Recognised As Safe

Ozgen و Sekerci (۲۰۱۱)، نشان دادند که برگ‌های خارجی تر هم در کاهوی قرمز و هم در کاهوی سبز، میزان فنولیک کل و ظرفیت آنتی اکسیدانی قابل ملاحظه بالاتری را نسبت به برگ‌های میانی و داخلی نشان می‌دهند درحالی که این برگ‌های خارجی معمولاً در طول فرآوری جدا می‌شوند.

Gomes و همکاران (۲۰۱۳)، بهینه‌سازی شرایط استخراج را به روش سطح پاسخ جهت بازیابی عصاره های حاصل از ضایعات کاهو به منظور کاربرد آن ها به عنوان آنتی اکسیدان‌های غذایی یا دارویی مورد بررسی قرار دادند.

در سال‌های اخیر، تعداد مطالعات و تحقیقات در مورد کاربرد عصاره‌های آنتی اکسیدانی بازیابی شده از ضایعات در مواد غذایی و به ویژه روغن‌ها و چربی‌های خوراکی افزایش یافته است، با این حال، علیرغم وجود خاصیت آنتی اکسیدانی بالا در ضایعات کاهو، هیچ گزارشی در مورد کاربرد عصاره آنتی اکسیدانی ضایعات در پایدارسازی روغن‌های خوراکی موجود نمی باشد. بنابراین اهداف این پژوهش، بررسی بازیابی عصاره آنتی اکسیدانی از برگ‌های خارجی کاهو به عنوان ضایعات این محصول توسط تکنیک استخراج سبز، نوین و کارآمد اولتراسوند و ارزیابی تأثیر آنتی‌اکسیداتیو عصاره مذکور طی اکسیداسیون تسریع یافته روغن‌های خوراکی و مقایسه آن با آنتی اکسیدان‌های سنتتیک تجاری BHT و BHA بود. از آنجا که چربی های حیوانی نظیر تالو از لحاظ آنتی اکسیدان‌های طبیعی ضعیف هستند، بدون شک مطالعه فعالیت عصاره آنتی اکسیدانی ضایعات کاهو در آنها الگوهای رفتاری مناسبی را ارائه خواهد کرد، ضمن اینکه از ترکیب دو فرآیند جزء به جزء کردن و پایدارسازی، روغنی (تالواولئین) حاصل می شود که نسبت به چربی جامد اولیه (تالو) درجه اشباعیت پایین تر و پایداری حرارتی بالاتری را دارا می باشد.

مواد و روش ها

- مواد شیمیایی

۲ و۲- دی فنیل-۱- پیکریل هیدرازیل[1] (DPPH) از شرکت سیگما (St. Louis, MO, USA) و معرف فولین سیو کالتیو، پاراآنیزیدین و آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک BHT و BHA از شرکت مرک (Darmstadt, Germany) خریداری گردید. همه معرف‌ها و مواد شیمیایی، دارای خلوص آزمایشگاهی[2] بودند.

- ماده گیاهی

واریته Romaine (*Lactuca sativa L.*) کاهو در این مطالعه استفاده شده است. برگ‌های خارجی کاهو که معمولاً توسط فروشندگان و مصرف کنندگان دور ریخته می شود، جدا شده و به دقت با آب شهری، شستشو گردید. برگ‌های کاهو به قطعات کوچک برش داده شد. برگ های خرد شده کاهو در دمای ۶۰°C و در مدت زمان مناسب خشک شده (Ferreira, 2011) و توسط یک آسیاب برقی، خرد گردیدند. برای یکنواخت کردن اندازه ذرات، از الک با سایز مش ۴۰ استفاده شد. پودر کاهو به دست آمده تا پایان آزمایشات در ظروف شیشه‌ای تیره و در دمای یخچال (۴ °C) نگهداری شد.

- استخراج عصاره آنتی اکسیدانی از ضایعات کاهو به کمک اولتراسوند

استخراج عصاره آنتی اکسیدانی از نمونه های پودر شده ضایعات کاهو با حلال اتانول/ آب (۷۰:۳۰ حجمی/ حجمی) در حمام اولتراسوند (WUC-D10H, Wiseclean, Korea) در دمای ۵۰ °C، زمان ۳۰ دقیقه، فرکانس ۴۰ کیلو هرتز و نسبت ماده جامد به حلال ۱:۲۰ (وزنی/ حجمی) صورت گرفت. به منظور جلوگیری و به حداقل رساندن افت تبخیر حلال، از ظروف شیشه‌ای درب‌دار استفاده گردید. فیلتراسیون عصاره پس از استخراج از طریق کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صورت گرفت و عصاره با استفاده از تبخیر کننده دوار در ۴۰°C تغلیظ و خشک گردید. عصاره تغلیظ و خشک شده در ظروف محافظ در برابر نور در دمای ۴ °C تا زمان آزمایشات بعدی، نگهداری شد.

- تعیین راندمان استخراج[3]

راندمان استخراج عصاره آنتی اکسیدانی حاصل از ضایعات کاهو به صورت وزنی (گراویمتریک) تعیین شد.

[1] 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl Radical Scavenging Assay
[2] Analytical Grade
[3] Extractive Yield

شاخص مذکور (٪، وزنی/ وزنی) عصاره، طبق معادله ۱ محاسبه گردید:

$$Yield(\%) = (\frac{W_2}{W_1}) \times 100$$ معادله ۱

W_2: وزن عصاره تغلیظ و خشک شده

W_1: وزن پودر کاهو

- تعیین مقدار ترکیبات فنولیک کل[1]

مقدار ترکیبات فنولیک کل عصاره با استفاده از روش فولین سیوکالتیو[2] (Singleton & Rossi, 1965) با برخی اصلاحات تعیین شد. ۲۵ میکرولیتر عصاره با ۱۲۵ میکرولیتر معرف فولین سیو کالتیو رقیق شده (۱:۱۰) مخلوط شد. بعد از ۴ دقیقه، ۱۰۰ میکرولیتر محلول کربنات سدیم اشباع افزوده شد. مخلوط در تاریکی برای ۲ ساعت در درجه حرارت اتاق نگهداری شد. سپس میزان جذب در طول موج ۷۶۰ نانومتر توسط micro plate reader (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) و 96 well plate تعیین گردید. گالیک اسید به عنوان محلول استاندارد جهت کالیبراسیون مورد استفاده قرار گرفت و نتایج برحسب mg GAE /100g DW بیان شد.

- تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی مهار رادیکال DPPH و IC_{50}

توانایی عصاره ضایعات کاهو در مهار رادیکال آزاد DPPH به روش Shimada و همکاران (۱۹۹۲) با کمی اصلاحات انجام شد. برای این منظور، محلول‌هایی با غلظتهای مختلف (۳۰۰-۵۰ میکروگرم در میلی لیتر) از عصاره و نیز آنتی اکسیدان BHT در حلال متانول آماده شدند.۵۰ میکرو لیتر از محلول متانولی DPPH (با غلظت یک میلی مولار) به ۱۵۰ میکرولیتر از عصاره افزوده و مخلوط حاصله، همگن شد. لوله‌های آزمایش به مدت ۳۰ دقیقه در محل تاریک قرار گرفتند. سپس میزان جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط micro plate reader (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) و 96 well plate تعیین شد. فعالیت مهار رادیکال آزاد توسط BHT به عنوان کنترل مثبت تعیین گردید. جذب کمتر مخلوط واکنش، فعالیت بالاتر مهار رادیکال آزاد را نشان می‌دهد. رادیکال‌های آزاد پایدار صورتی هنگام افزودن آنتی‌اکسیدان به دی فنیل پیکریل هیدرازیل با رنگ زرد احیاء می‌شوند. پس از تعیین شدت جذب محلول شاهد، فعالیت آنتی اکسیدانی مهار رادیکال آزاد DPPH با استفاده از معادله ۲ محاسبه شد:

$$\%\ \text{inhibition of DPPH}' = \left(\frac{\text{Abs control} - \text{Abs sample}}{\text{Abs control}}\right) \times 100$$

معادله ۲

Abs control = جذب واکنش محلول شاهد (حاوی همه معرف‌ها به استثناء نمونه مورد آزمایش)

Abs sample = جذب در حضور عصاره مورد آزمایش

برای مقایسه فعالیت ضدرادیکالی عصاره ها از فاکتوری تحت عنوان IC_{50} استفاده می شود. طبق تعریف IC_{50} به غلظتی از عصاره اطلاق می‌گردد که در آن 50 درصد از رادیکالهای آزاد DPPH موجود در محیط واکنش مهار شوند. بنابراین هر چه این غلظت کمتر باشد، نشان دهنده این است که عصاره مورد نظر فعالیت ضد رادیکالی بیشتری دارد.

- مطالعات پایداری اکسیداتیو روغن

- استخراج چربی تالو و فراکسیونه نمودن آن

تالو (چربی ذخیره‌ای دم) گوسفند از مراکز عرضه داخلی خریداری گردید و پس از انتقال به آزمایشگاه، شستشو با آب و حذف بقایای گوشت، توسط بلندر کاملا خرد شد، سپس بسته‌بندی شده و تا زمان استخراج در فریزر نگهداری گردید. استخراج چربی تالو به روش ذوب کردن خشک (دمای ۸۰°C به مدت ۲ ساعت) توسط دستگاه تبخیر کننده دوار تحت شرایط خلاء انجام شد. جهت جداسازی فراکسیون مایع، از روش جزء به جزء کردن ۱ مرحله ای با حلال استون در دمای۵ °C استفاده گردید (قراچورلو، ۱۳۸۵). تالواولئین حاصل جهت استفاده به عنوان یک محیط پایه جهت ارزیابی خصوصیات آنتی اکسیدانی عصاره ضایعات کاهو در داخل ظروف شیشه‌ای درب دار در دمای یخچال (۵°C) تا زمان آزمایشات بعدی نگهداری گردید.

[1] Total Phenolic Content

[2] Folin– Ciocalteu assay

- آنالیز خصوصیات فیزیکو شیمیایی تالواولئین

خصوصیات فیزیکوشیمیایی تالواولئین شامل: نقطه ذوب[1] (AOAC, 920.157) (Firestone, 1990)، اندیس رفراکتومتری[2] (AOAC, 921.08) (Firestone, 1990)، اندیس یدی[3] (AOCS, Cd 1c-85) (Firestone, 1994)، اندیس صابونی[4] (AOCS, Cd 3-25) (Firestone, 1994)، اندیس پراکسید[5] (AOCS, Cd 8-53) (Firestone, 1994)، اندیس اسیدی[6] (AOCS, Cd 3d-63) (Firestone, 1994) و شاخص پایداری اکسیداتیو[7] (OSI) توسط دستگاه رنسیمت (Metrohm 743) در دمای ۱۱۰ °C و سرعت جریان هوای ۲۰ L/h (Farhoosh, 2007) تعیین شد.

جهت تعیین میزان و ترکیب اسیدهای چرب ابتدا متیله کردن نمونه‌های روغن طبق دستورالعمل ISO به شماره ۵۵۰۹ انجام شد (International standard, ISO, 2000). سپس متیل استر اسیدهای چرب توسط روش کروماتوگرافی گازی ISO با شماره ۵۵۰۸ شناسایی شدند (International Standard, ISO, 1990).

- پایداری تالواولئین غنی شده با عصاره ضایعات کاهو

به ظروف آزمایش حاوی ۱۰۰ میلی لیتر تالواولئین، عصاره ضایعات کاهو (۰ ppm، ۴۰۰ppm، ۸۰۰ ppm ، ۱۰۰۰ ppm و ۲۰۰۰ ppm) و آنتی اکسیدان‌های سنتتیک (۲۰۰ppm) BHT و (۲۰۰ppm)BHA افزوده شد. عمل اختلاط عصاره با روغن توسط همزن مغناطیسی صورت گرفت. سپس در آون با دمای ۹۰°C نگهداری گردید. پایداری روغن نسبت به اکسیداسیون هر ۲۴ ساعت یک بار در طول یک دوره ۵ روزه (۱۲۰ ساعته) از طریق آنالیز مقادیر اندیس پراکسید و اندیس پاراآنیزیدین[8] (AOCS, Cd 18-90) (Firestone, 1994)، ارزیابی شد. پس از سنجش اندیس‌های مذکور، اندیس توتوکس[9] محاسبه گردید. این اندیس بر اساس معادله ۳ محاسبه شد (Serjouie et al., 2010):

معادله ۳ $TV = AV + 2PV$

AV: اندیس آنیزیدین

PV: اندیس پراکسید

همچنین شاخص پایداری اکسیداتیو نمونه ها نیز قبل از آون گذاری، توسط دستگاه رنسیمت (Metrohm 743) تعیین شد. آزمایش با ۳ گرم نمونه روغن حاوی غلظت‌های مختلف عصاره (۰ ppm، ۴۰۰ ppm، ۸۰۰ ppm، ۱۰۰۰ppm و ۲۰۰۰ ppm) در ۱۳۰ °C و سرعت جریان هوای ۲۰ L/h انجام شد (Farhoosh, 2007).

- تجزیه و تحلیل آماری

جهت آنالیز آماری، همه آنالیزها در سه تکرار انجام و برحسب میانگین ± انحراف استاندارد بیان شد. آنالیز واریانس[10] (ANOVA) در مورد داده‌های آزمایشات صورت گرفت و با استفاده از بسته نرم افزاری سیستم آنالیز آماری[11] (SAS) نسخه (SAS Institute 2000) 9.2 و Statistix نسخه 8.0، آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار[12] (LSD) جهت مقایسه میانگین‌ها استفاده شد.

یافته‌ها

- راندمان استخراج، مقدار ترکیبات فنولیک کل، فعالیت آنتی اکسیدانی مهار رادیکال DPPH و IC_{50} عصاره ضایعات کاهو

راندمان استخراج، مقدار ترکیبات فنولیک کل و IC_{50} عصاره ضایعات کاهو در جدول ۱ نشان داده شده است. در این مطالعه، راندمان استخراج (٪ وزنی/ وزنی) که به عنوان شاخص تأثیر شرایط استخراج در نظر گرفته می‌شود، ۱/۲۰٪± ۳۰/۴۵ (گرم عصاره در ۱۰۰ گرم وزن خشک نمونه)، مقدار ترکیبات فنولیک کل (mg GAE/100g DW) ۶/۲۹ ± ۶۰۰/۱۵ و IC_{50} عصاره، ۱۷۴/۰۵ppm تعیین گردید.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی مهار رادیکال DPPH غلظت‌های مختلف عصاره ضایعات کاهو (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۲۰۰۰ ppm) همراه با محلول‌های استاندارد BHT به

[1] Melting Point [2] Refractive Index [3] Iodine Value [4] Saponification Value [5] Peroxide Value
[6] Acid Value [7] Oxidative Stability Index [8] *p* –Anisidine Value [9] Totox Value [10] Analysis of Variance
[11] Statistical Analysis System [12] Least Significant Difference

عنوان آنتی اکسیدان رفرنس (غلظت‌های ppm ۲۰۰ و ppm ۳۰۰) در نمودار ۱ نشان داده می شود.

- آنالیز خصوصیات فیزیکوشیمیایی تالواولئین

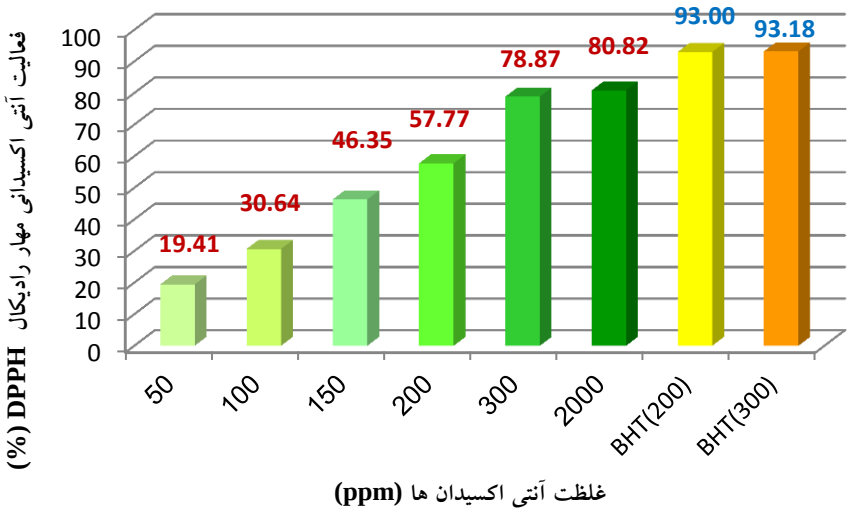
آنالیز خصوصیات فیزیکوشیمیایی تالواولئین در جدول ۲ نشان داده شده است.

نمودار ۲ پروفایل اسیدهای چرب روغن تالواولئین را نشان می‌دهد.

حضور میزان متناسب اسید اولئیک به عنوان اسید چرب تک غیر اشباع (۴۲/۱٪) و مقادیر بسیار کم اسید های چرب چند غیر اشباع یعنی اسید لینولئیک (۳/۱۴٪) و اسید لینولنیک (۱/۰۸٪) در روغن تالواولئین باعث گردیده که این روغن به عنوان یک محیط پایه جهت ارزیابی خصوصیات آنتی اکسیدانی عصاره های آنتی اکسیدانی در نظر گرفته شود.

جدول ۱- راندمان استخراج و مقدار ترکیبات فنولیک کل و IC_{50} عصاره اتانولی ضایعات کاهو

فاکتور	میزان
راندمان استخراج (g/ 100g DW)	۳۰/۴۵ ± ۱/۲۰
مقدار ترکیبات فنولیک کل (mg GAE /100g DW)	۶۰۰/۱۵ ± ۶/۲۹
IC_{50} (ppm)	۱۷۴/۰۵



نمودار ۱- فعالیت آنتی اکسیدانی مهار رادیکال DPPH (٪) غلظت های مختلف عصاره ضایعات کاهو در مقایسه با BHT به عنوان آنتی اکسیدان رفرنس

جدول ۲- خصوصیات فیزیکوشیمیایی تالواولئین

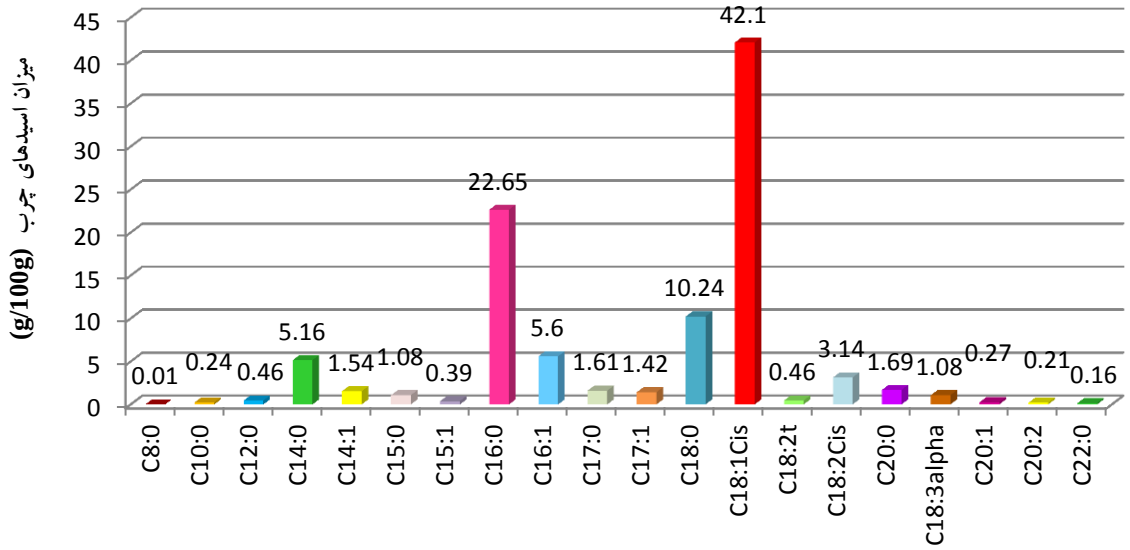
فاکتور	میزان
اندیس صابونی (mg KOH/g of oil)	۱۹۳/۰ ± ۰/۸۷
اندیس یدی $(gI_2/100g)$	۵۰/۰ ± ۰/۰۱
ضریب شکست (۲۵ °C)	۱/۴۵۷ ± ۰/۰۰۲
نقطه ذوب (°C)	۱۹/۰ ± ۰/۵۰
شاخص پایداری اکسیداتیو (h) (۱۱۰ °C)	۱/۰۲ ± ۰/۰۶
اندیس پراکسید (meq/kg)	۰/۴۲ ± ۰/۱۱
اندیس اسیدی (mg KOH/g of oil)	۰/۷۴ ± ۰/۲

- پایداری روغن تالواولئین غنی شده با عصاره آنتی‌اکسیدانی ضایعات کاهو

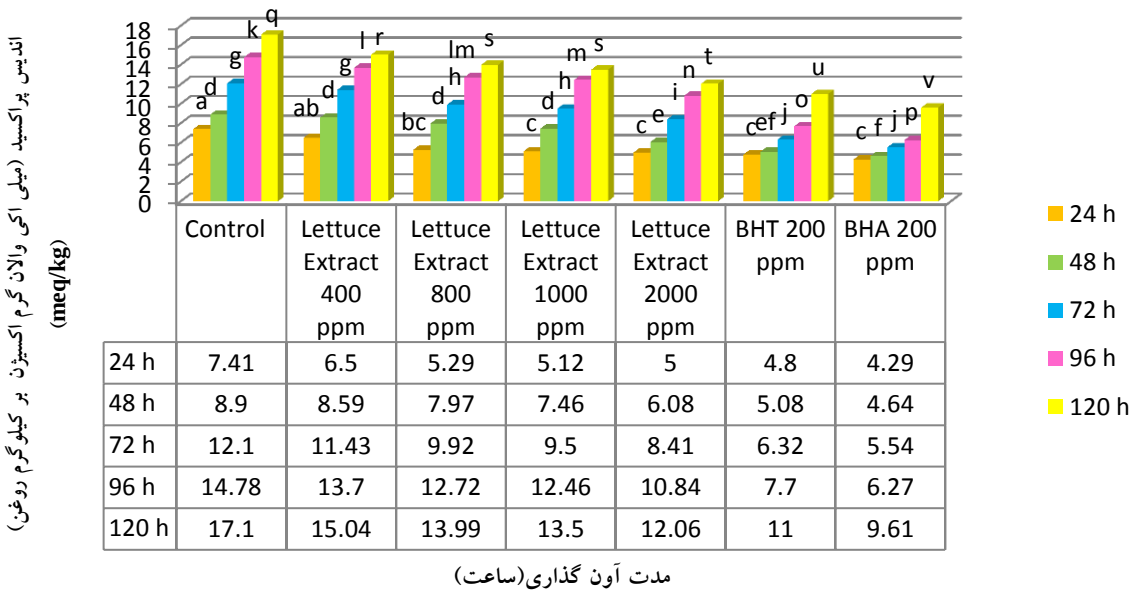
- تغییرات اندیس پراکسید

تغییرات اندیس پراکسید تیمارهای مختلف روغن تالواولئین طی ۱۲۰ ساعت نگهداری در دمای ۹۰°C در نمودار ۳ نشان داده شده است.

اندیس پراکسید نمونه های روغن تالواولئین حاوی ۱۰۰۰ppm، ۸۰۰ ppm، ۴۰۰ppm عصاره ضایعات کاهو و شاهد به ترتیب افزایش تا میزان ۱۳/۵، ۱۳/۹۹، ۱۵/۰۴ و ۱۷/۱ میلی اکی‌والان گرم اکسیژن بر کیلوگرم نمونه روغن را نشان دادند. ضمن اینکه اندیس پراکسید نمونه‌های حاوی ۲۰۰۰ ppm عصاره ضایعات کاهو، BHT ۲۰۰ ppm و BHA ۲۰۰ ppm پس از ۱۲۰ ساعت آون گذاری به ترتیب ۱۲/۰۶، ۱۱/۰ و ۹/۶۱ میلی اکی والان گرم اکسیژن بر کیلوگرم نمونه روغن تعیین گردید.



نمودار ۲- پروفایل اسید چرب روغن تالواولئین



	Control	Lettuce Extract 400 ppm	Lettuce Extract 800 ppm	Lettuce Extract 1000 ppm	Lettuce Extract 2000 ppm	BHT 200 ppm	BHA 200 ppm
24 h	7.41	6.5	5.29	5.12	5	4.8	4.29
48 h	8.9	8.59	7.97	7.46	6.08	5.08	4.64
72 h	12.1	11.43	9.92	9.5	8.41	6.32	5.54
96 h	14.78	13.7	12.72	12.46	10.84	7.7	6.27
120 h	17.1	15.04	13.99	13.5	12.06	11	9.61

نمودار ۳- میانگین مقادیر اندیس پراکسید نمونه های روغن تالواولئین در طول آزمون آون گذاری (۹۰ °C)

* میانگین اعداد با حداقل یک حرف لاتین یکسان، در سطح اطمینان ($P \leq ۰/۰۵$) معنی دار نمی باشند.

- تغییرات اندیس پاراآنیزیدین

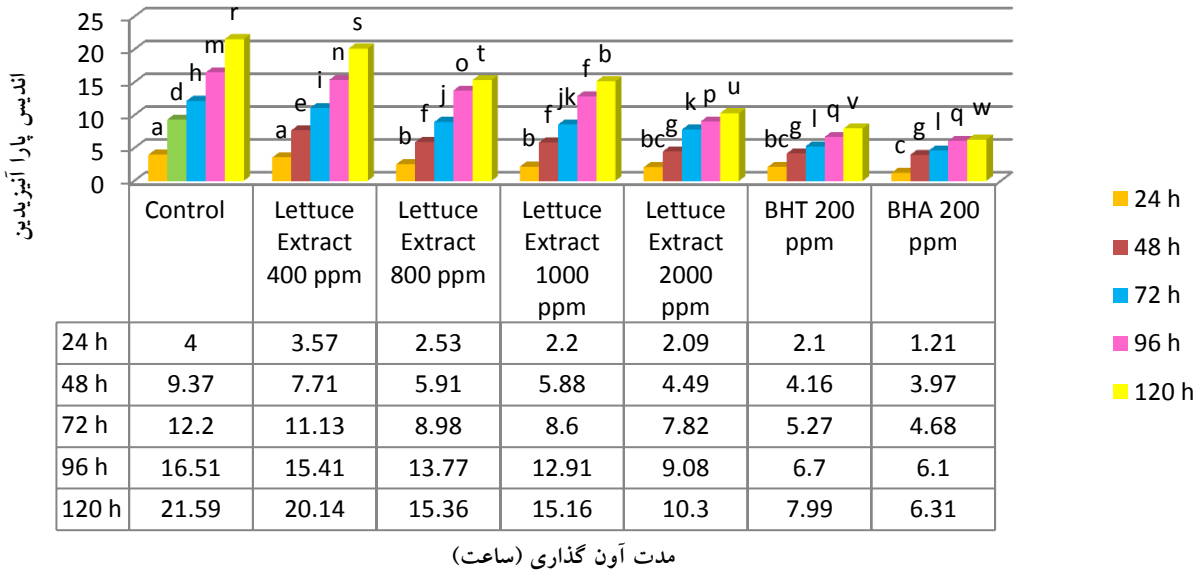
نمودار ۴ مقادیر اندیس پاراآنیزیدین را در طول نگهداری روغن تالواولئین طی یک دوره ۵ روزه در ۹۰°C در حضور غلظت‌های مختلف عصاره ضایعات کاهو، BHT ۲۰۰ppm، BHA ۲۰۰ppm و شاهد نشان می‌دهد. اندیس پاراآنیزیدین نمونه های روغن تالواولئین حاوی ۱۰۰۰ppm، ۸۰۰ ppm، ۴۰۰ppm عصاره ضایعات کاهو و شاهد به ترتیب افزایش تا میزان ۱۵/۱۶، ۱۵/۳۶، ۲۰/۱۴ و ۲۱/۵۹ را نشان دادند. اندیس پاراآنیزیدین نمونه های حاوی ۲۰۰۰ ppm عصاره ضایعات کاهو، BHT ۲۰۰ ppm و BHA ۲۰۰ ppm پس از ۱۲۰ ساعت آون‌گذاری به ترتیب ۱۰/۳، ۷/۹۹ و ۶/۳۱ تعیین شد.

- تغییرات اندیس توتوکس

وضعیت کلی اکسیداسیون نمونه‌های روغن توسط اندیس توتوکس طی یک دوره آون‌گذاری ۵ روزه در دمای ۹۰° C در حضور غلظت‌های مختلف عصاره ضایعات کاهو، BHT ۲۰۰ppm، BHA ۲۰۰ ppm و شاهد نیز ارزیابی گردید (نمودار ۵). اندیس توتوکس نمونه‌های روغن تالواولئین حاوی ۱۰۰۰ ppm، ۸۰۰ ppm، ۴۰۰ ppm عصاره ضایعات کاهو و شاهد به ترتیب افزایش تا میزان ۴۲/۱۶، ۴۳/۳۴، ۵۰/۲۲ و ۵۵/۷۹ را نشان دادند. اندیس توتوکس نمونه‌های روغن حاوی ۲۰۰۰ ppm عصاره ضایعات کاهو، BHT ۲۰۰ ppm و BHA ۲۰۰ ppm پس از ۱۲۰ ساعت آون گذاری به ترتیب ۳۴/۴۲، ۲۹/۹۹ و ۲۵/۵۳ تعیین گردید.

- تغییرات شاخص پایداری اکسیداتیو تحت آزمون رنسیمت

نمودار۶، شاخص پایداری اکسیداتیو نمونه‌های روغن تالواولئین در دمای ۱۳۰ °C را نشان می‌دهد. شاخص پایداری اکسیداتیو نمونه‌های روغن تالواولئین حاوی ۲۰۰۰ppm، ۱۰۰۰ ppm، ۸۰۰ ppm، ۴۰۰ppm عصاره ضایعات کاهو به ترتیب ۱/۹۳، ۰/۹۶، ۰/۹۴ و ۰/۴۷ ساعت در مقایسه با نمونه شاهد (۰/۲۶ ساعت) تعیین گردید. شاخص مذکور در نمونه‌های حاوی BHT و BHA، به ترتیب ۶/۰۸ و ۶/۷۲ ساعت تعیین شد.

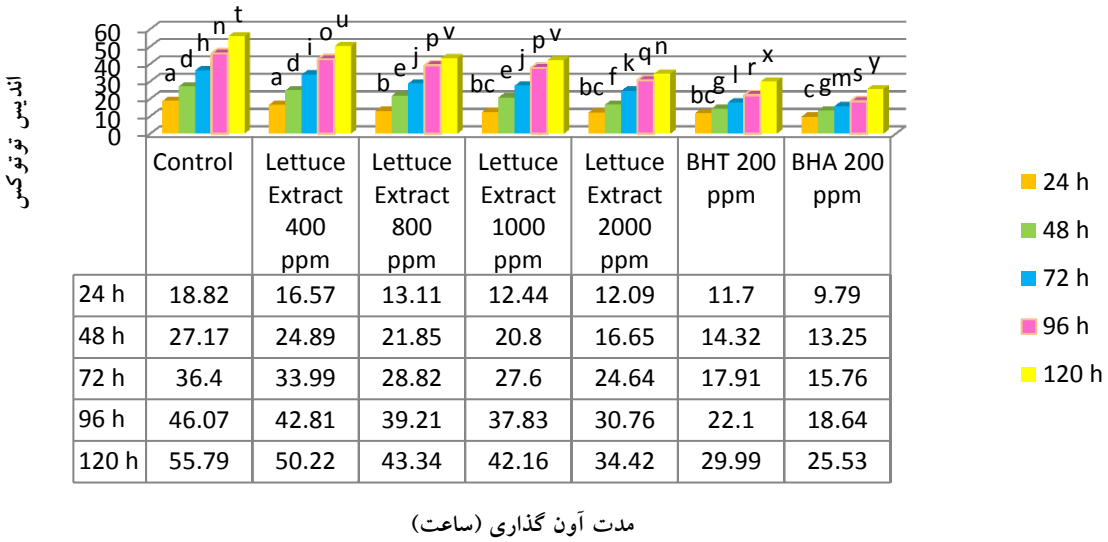


	Control	Lettuce Extract 400 ppm	Lettuce Extract 800 ppm	Lettuce Extract 1000 ppm	Lettuce Extract 2000 ppm	BHT 200 ppm	BHA 200 ppm
24 h	4	3.57	2.53	2.2	2.09	2.1	1.21
48 h	9.37	7.71	5.91	5.88	4.49	4.16	3.97
72 h	12.2	11.13	8.98	8.6	7.82	5.27	4.68
96 h	16.51	15.41	13.77	12.91	9.08	6.7	6.1
120 h	21.59	20.14	15.36	15.16	10.3	7.99	6.31

مدت آون گذاری (ساعت)

نمودار ٤- میانگین مقادیر اندیس پارا آنیزیدین نمونه های روغن تالواولئین در طول آزمون آون گذاری (۹۰ °C)

* میانگین اعداد با حداقل یک حرف لاتین یکسان، در سطح اطمینان ($P \leq$ ۰/۰۵) معنی دار نمی باشند.

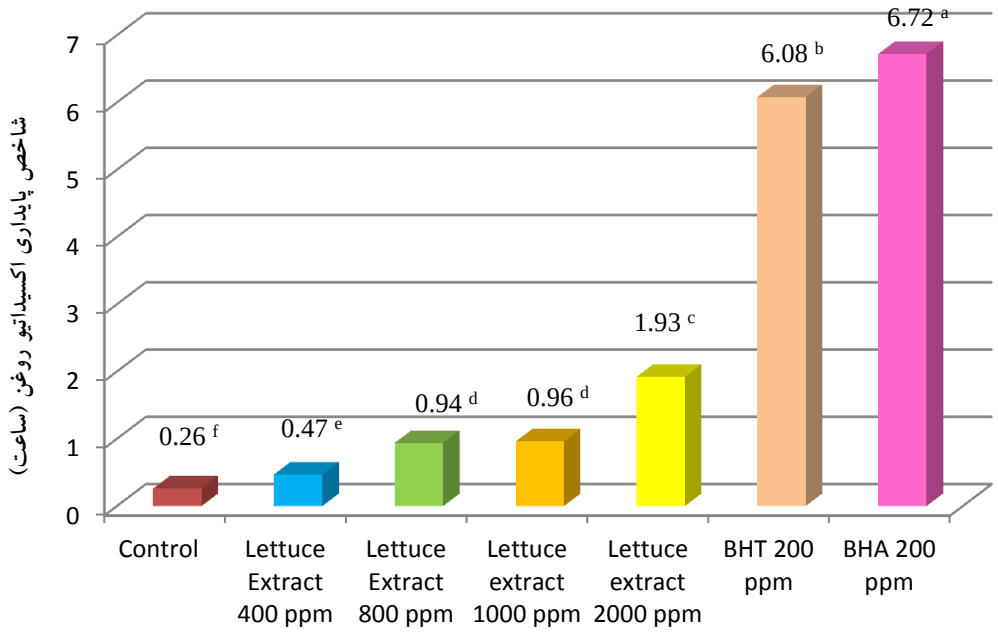


	Control	Lettuce Extract 400 ppm	Lettuce Extract 800 ppm	Lettuce Extract 1000 ppm	Lettuce Extract 2000 ppm	BHT 200 ppm	BHA 200 ppm
24 h	18.82	16.57	13.11	12.44	12.09	11.7	9.79
48 h	27.17	24.89	21.85	20.8	16.65	14.32	13.25
72 h	36.4	33.99	28.82	27.6	24.64	17.91	15.76
96 h	46.07	42.81	39.21	37.83	30.76	22.1	18.64
120 h	55.79	50.22	43.34	42.16	34.42	29.99	25.53

مدت آون گذاری (ساعت)

نمودار ۵- میانگین مقادیر اندیس توتوکس نمونه‌های روغن تالواولئین در طول آزمون آون گذاری (۹۰°C)

* میانگین اعداد با حداقل یک حرف لاتین یکسان، در سطح اطمینان ($P \leq ۰/۰۵$) معنی دار نمی باشند.



نمودار ٦- شاخص پایداری اکسیداتیو حاصل از آزمون رنسیمت نمونه های روغن تالواولئین در دمای ۱۳۰ °C در حضور و غیاب آنتی اکسیدان ها

بحث

- راندمان استخراج، مقدار ترکیبات فنولیک کل و فعالیت آنتی اکسیدانی مهار رادیکال DPPH عصاره ضایعات کاهو

راندمان استخراج و ترکیب عصاره به روش استخراج و قطبیت حلال بستگی دارد (Li *et al.*, 2006). تکنیک استخراج یکی از فاکتورهای کلیدی جهت دستیابی به عصاره‌های آنتی اکسیدانی با کیفیت بالا می‌باشد. مسلم است که روش‌های ساده، سریع و سازگار با محیط زیست بایستی جهت استخراج انتخاب شوند. با این حال تکنیک استخراج انتخابی بایستی دارای ظرفیت بالا جهت استخراج فعال‌ترین مواد مؤثره بدون اثر تخریبی باشد. یک روش

کارآمد بایستی دارای خصوصیاتی از قبیل کوتاه نمودن زمان استخراج، کاهش مصرف حلال، افزایش بازده استخراج و تقویت کیفیت عصاره‌ها باشد (Nantitanon *et al*., 2010). در طول چند دهه گذشته، تحقیقات گسترده در مورد توسعه تکنیک‌های استخراج کارآمدتر و سازگارتر با محیط زیست صورت گرفته است. از میان آن ها، استخراج به‌کمک اولتراسوند یکی از گسترده ترین تحقیقات هم در مقیاس صنعتی و هم در مقیاس آزمایشگاهی احتمالاً به دلیل تجهیزات نسبتاً ارزان، سادگی انجام و کارآیی بالا می‌باشد (Esclapez *et al*., 2011).

همچنین حلال‌های غیر سمی با درجه خوراکی و سازگار با محیط زیست از قبیل اتانول، n- بوتانول و ایزوپروپانول توسط اداره غذا و دارو ایالات متحده (FDA) جهت اهداف استخراج توصیه می‌شود (Bartnik *et al*., 2006). مخلوطهای آب و اتانول به طور رایج جهت استخراج ترکیبات فنولیک از مواد گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Bahorun *et al*., 2004; Durling *et al*., 2007). دلیل این امر علاوه بر غیر سمی بودن و درجه خوراکی داشتن، حلالیت طیف وسیعی از ترکیبات فنولیک در مخلوطهای آبی اتانول می‌باشد (Alothman *et al*., 2009). بنابراین در این پژوهش، اتانول/ آب (V/V ۷۰:۳۰) به عنوان حلال استخراج عصاره آنتی اکسیدانی انتخاب شده است.

اغلب مطالعات انجام شده در مورد عصاره‌های آنتی‌اکسیدانی برگ‌های کاهو، از روش‌های متداول استخراج استفاده نموده اند. بنابراین گزارشی در مورد کاربرد استخراج اولتراسونیک جهت بازیابی آنتی اکسیدان‌ها از ضایعات کاهو موجود نمی‌باشد. تحقیقات زیادی کارآمدی تکنیک اولتراسوند را در جهت افزایش استخراج ترکیبات فنولیک عصاره‌های گیاهی نسبت به سایر روش‌های استخراج نشان می‌دهد (Nantitanon *et al*., 2010; Amirah *et al*., 2012; Da Porto *et al*., 2013; Tabaraki & Rastgoo, 2014). تقویت استخراج توسط اولتراسوند اساساً به پدیده کاویتاسیون مربوط می‌شود که شامل تشکیل، رشد و متلاشی شدن implosive میکروحباب‌ها در داخل فاز مایع در معرض اولتراسوند می‌باشد (Esclapez *et al*., 2011).

در این مطالعه، عصاره آنتی اکسیدانی حاصل از ضایعات کاهو یک فعالیت آنتی اکسیدانی وابسته به غلظت را در برابر رادیکال‌های DPPH نشان داد. بنابراین بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره کاهو در غلظت ppm ۲۰۰۰ تعیین شد. نتیجه ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی مهار رادیکال آزاد DPPH مشخص نمود که ترکیبات موجود در عصاره ضایعات کاهو قادر به مهار رادیکال‌های آزاد از طریق مکانیسم‌های الکترون یا هیدروژن دهندگی می‌باشند و از این رو بایستی قادر به ممانعت از آغاز واکنش‌های زنجیره‌ای اکسیداسیون در ماتریکس‌های مستعد اکسیداسیون (مانند غشاءهای بیولوژیکی) باشند و بالطبع ممکن است به عنوان عوامل درمانی مفید جهت تیمار صدمات پاتولوژیکی مرتبط با رادیکال‌ها در نظر گرفته شوند. مطالعاتی در مورد ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره های حاصل از سبزیجات مختلف موجود است.

Tiveron و همکاران (۲۰۱۲)، فعالیت آنتی اکسیدانی سبزیجات برزیلی و ارتباط آن‌ها را با ترکیبات فنولیک ارزیابی نمودند. آن‌ها نشان دادند که سبزیجات دارای بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی به ترتیب کاهو، زردچوبه، بولاغ اوتی و بروکلی می‌باشد.

Harsha و همکاران (۲۰۱۳)، نشان دادند که عصاره‌های آبی و اتانولی کاهو فعالیت‌های مهار رادیکال آزاد بالایی را ارائه می‌نماید و عصاره مذکور قادر به حفاظت بیومولکول‌هایی نظیر اسیدهای نوکلئیک، پروتئین و لیپید می باشد. ارزیابی آن ها نشان داد که عصاره کاهو یک منبع مهم آنتی اکسیدان‌های طبیعی است که در مهار پیشرفت استرس اکسیداتیو، مؤثر بوده و ترکیبات مسئول این ظرفیت آنتی اکسیداتیو، احتمالاً ترکیبات فنولیک موجود در عصاره می‌باشند.

Shyamala و همکاران (۲۰۰۵)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و اثر عصاره های سبزیجات برگی شکل روی پایداری روغن‌های حرارت دیده را طی نگهداری ارزیابی نمودند. آن‌ها نشان دادند که فعالیت‌های مهار رادیکال آزاد عصاره اتانولی برخی از سبزیجات برگی شکل (از قبیل کلم، برگ‌های گشنیز، hongone و اسفناج) کمتر از BHA است.

- مطالعات پایداری اکسیداتیو روغن

- آنالیز خصوصیات فیزیکوشیمیایی تالواولئین

از آنجا که فرآیند فراکسیون گیری چربی تالو دارای تأثیرات قابل توجهی بر برخی خصوصیات فیزیکوشیمیایی روغن حاصل (تالواولئین) می‌باشد، ویژگی‌های مذکور در تالواولئین مورد آنالیز قرار گرفت. اندیس صابونی (۱۹۳/۰ ± ۰/۸۷ mg KOH/g oil) به عنوان یک شاخص شیمیایی، معیاری از وزن مولکولی گلیسریدهای تشکیل دهنده ماده چرب است، بدین ترتیب که اندیس مذکور با وزن مولکولی گلیسریدهای تشکیل دهنده ماده چرب رابطه عکس دارد. الهامی راد و همکاران (۱۳۹۰)، اندیس صابونی چربی تالو را (mg KOH/g oil) ۲ ± ۱۹۴/۰ تعیین نمودند. اندیس یدی (۰/۰۱ ± ۵۰/۰) نیز یک شاخص شیمیایی برای روغن‌ها و چربی‌ها محسوب می‌شود و درجه غیر اشباعیت آن‌ها را نشان می دهد. سیمان پور و همکاران (۱۳۹۱)، اندیس یدی چربی تالو را $(gI_2/100g)$ ۴۷/۷۸ تعیین نمودند.

ضریب شکست (۱/۴۵۷ ± ۰/۰۰۲) به عنوان یک شاخص فیزیکی با طول زنجیر و نیز درجه غیر اشباعیت مرتبط است و با افزایش فاکتورهای مذکور، افزایش می‌یابد. الهامی راد و همکاران (۱۳۹۰)، ضریب شکست چربی تالو را ۱/۴۵۴±۰/۰۰۳ تعیین نمودند. نقطه ذوب (۱۹/۰±۰/۵۰ °C) نیز جزء خصوصیات فیزیکی ماده چرب محسوب می‌شود و از جمله فاکتورهای مؤثر بر آن، طول زنجیر و درجه غیر اشباعیت اسیدهای چرب روغن و چربی است که با افزایش طول زنجیر و کاهش درجه غیر اشباعیت، نقطه ذوب افزایش می یابد. الهامی راد و همکاران (۱۳۹۰)، نقطه ذوب چربی تالو را ۴۱/۰ ± ۳ °C تعیین نمودند. تالواولئین حاوی میزان بالای اسید چرب تک غیراشباع اولئیک اسید (۴۲/۱٪) با یک محدوده متعادل رفتار ذوبی است که می‌تواند به عنوان یک چربی با نقطه ذوب پایین در نظر گرفته شود.

کنترل اسیدیته و اندیس اسیدی، یکی از روش‌های تشخیص فساد و کهنگی روغن‌ها و چربی‌های خوراکی می‌باشد. مناسب بودن شرایط نگهداری تالو، حمل و نقل و استخراج چربی آن سبب گردیده است که اندیس اسیدی (۰/۷۴ ± ۰/۲ mgKOH/g oil) و درصد اسیدهای چرب آزاد (۰/۳۷۲٪) روغن فراکسیونه شده آن (روغن تالواولئین) در حد مناسب باشد. زیرا با نامناسب بودن شرایط نگهداری، حمل و نقل و استخراج و نیز فعالیت‌های آنزیماتیک، اسیدهای چرب آزاد سریعاً افزایش می‌یابد. درصد اسید چرب آزاد نمونه (۰/۳۷۲٪) کمتر از میزان تعیین شده توسط استاندارد کدکس است (۱/۲۵٪) (Codex Alimentarius Commission, 2001).

اندیس پراکسید روغن تالواولئین (۰/۱۱ ± meq/kg ۰/۴۲)، رنسیدیتی اکسیداتیو پائین را نشان می‌دهد که به دلیل غلظت بالای اسیدهای چرب اشباع و تک غیراشباع موجود است و این امر که چربی تالو با استفاده از تیمار حرارتی کم و تحت خلأ استخراج شده است.

- پایداری تالواولئین غنی شده با عصاره آنتی اکسیدانی ضایعات کاهو

با توجه به آنکه عصاره‌های اتانولی ضایعات کاهو، فعالیت‌های مهار آنتی اکسیدانی/ آنتی رادیکالی بالا را نشان می‌دهد، از این رو کارآیی آن‌ها در به تأخیر انداختن تخریب اکسیداتیو تالواولئین ارزیابی گردید. پایداری روغن معمولاً تحت شرایط اکسیداسیون تسریع یافته (C ۶۰ یا بیشتر) تعیین می شود زیرا شرایط محیط نیاز به یک زمان طولانی دارد. جهت ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره اتانولی ضایعات کاهو در تالواولئین، اندیس‌های پراکسید، پاراآنیزیدین و توتوکس و شاخص پایداری اکسیداتیو به عنوان اندیس های اکسیداسیون لیپید تعیین شد.

- تغییرات اندیس پراکسید

نتایج نشان داد که در طول دوره نگهداری در شرایط اکسایش تسریع شده، اندیس پراکسید در کلیه تیمارها افزایش یافته و یک روند صعودی داشته است. مطابق با نمودار ۳ میانگین اندیس پراکسید در نمونه شاهد با تمام تیمارهای مورد بررسی، اختلاف آماری معنی داری در سطح ($P \leq ۰/۰۵$) دارد. در تیمارهای روغن تالواولئین حاوی عصاره ضایعات کاهو، با افزایش غلظت عصاره‌ها اندیس پراکسید این تیمارها در تمام طول آزمایش مقاومت بیشتری در مقابل افزایش نشان داد.

در طول این ارزیابی ۵ روزه، فعالیت آنتی‌اکسیدانی غلظت‌های مختلف عصاره و آنتی اکسیدان‌های سنتتیک در روغن تالواولئین در درجات مختلف بروز می‌نماید. توانایی این آنتی‌اکسیدان‌ها در جلوگیری از تشکیل پراکسید در نمونه‌ها در طول دوره نگهداری به ترتیب زیر کاهش

می‌یابد:

شاهد< روغن تالواولئین حاوی ppm ۴۰۰ عصاره کاهو < روغن تالواولئین حاوی ppm ۸۰۰ عصاره کاهو < روغن تالواولئین حاوی ppm ۱۰۰۰ عصاره کاهو < روغن تالواولئین حاوی ppm ۲۰۰۰ عصاره کاهو< روغن تالواولئین حاوی ppm ۲۰۰ BHT < روغن تالواولئین حاوی ppm ۲۰۰ BHA.

BHA بالاترین توانایی را در جلوگیری از تشکیل پراکسید نشان داد زیرا BHA یک آنتی‌اکسیدان قوی‌تر است و نسبت به BHT در درجه حرارت بالا دارای پایداری بیشتر و فراریت کمتر می باشد.

نمونه های روغن تالواولئین بدون آنتی اکسیدان (شاهد) به یک ماکزیمم اندیس پراکسید (۱۷/۱۰ meq/kg) پس از ۱۲۰ ساعت آون‌گذاری رسید. طی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت آون‌گذاری اختلاف معنی‌دار ($P \leq$ ۰/۰۵) در اندیس پراکسید بین نمونه شاهد و نمونه‌های روغن تالواولئین حاوی عصاره‌ها (با غلظت ppm ۸۰۰، ppm ۱۰۰۰ و ppm۲۰۰۰) و نیز آنتی اکسیدان های سنتتیک مشاهده شد و طی ۹۶ و ۱۲۰ ساعت آون‌گذاری، اختلاف معنی‌دار در اندیس پراکسید نمونه شاهد با آنتی اکسیدان‌های سنتتیک و همه غلظت‌های عصاره مشاهده گردید که نشان دهنده کند شدن سرعت تشکیل پراکسید می باشد.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره ضایعات کاهو (ppm۲۰۰۰) در مقایسه با BHA ضعیف تر است ولی در کند نمودن سرعت تشکیل پراکسید در روغن تالواولئین با BHT قابل مقایسه می باشد.

گزارشات مختلف آثار آنتی اکسیدانی عصاره‌های گیاهی را در روغن های خوراکی نشان می دهد.

Shyamala و همکاران (۲۰۰۵)، اثر آنتی‌اکسیداتیو عصاره اتانولی برخی از سبزیجات برگی شکل را روی روغن آفتابگردان و روغن بادام زمینی حرارت دیده بررسی نمودند و نشان دادند که اثر آنتی اکسیداتیو آن‌ها بالاتر از BHA می‌باشد. این ویژگی ممکن است به دلیل حضور ترکیبات فعال محلول در آب مانند فلاونوئیدها، ترپنوئیدها و پلی‌فنول‌ها در بخش برگی شکل سبزیجات باشد (Rahmat *et al*., 2003; Arumugam *et al*., 2006). آن‌ها دریافتند که سبزیجات برگی شکل منبع آنتی‌اکسیدان های قوی هستند که در درجه حرارت‌های بالا پایدارند و می‌توانند به عنوان جایگزینی برای آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک به کار روند.

Tynek و همکاران (۲۰۰۸)، تأثیر آب کلم را روی تغییرات اکسیداتیو روغن کلزا و لارد بررسی نمودند. پس از فرآیند حرارتی چربی‌ها در حضور آب کلم، تشکیل تری-آسیل گلیسرول‌های اکسید شده تا حدود ۴۰٪ در مقایسه با چربی حرارت دیده شاهد کاهش یافت.

Gomathi و همکاران (۲۰۱۱)، اثر آنتی‌اکسیداتیو عصاره برگ‌های Lettuce tree (*Pisonia morindifolia* R.Br.) و Tamarind tree (*Tamarindus indica* L.) و کارآیی آن‌ها را در پایداری روغن بادام زمینی در طول ۲۱ روز در دمای ۶۰° C ارزیابی نمودند. آن ها نشان دادند که عصاره متانولی برگ‌های Lettuce tree فعالیت ممانعت کنندگی بالایی (۳۷/۸۲ ±۰/۲ meq/kg) را در مقایسه با نمونه شاهد داراست. با این حال، نمونه‌های روغن محافظت شده با آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک BHA (±۰/۱ meq/kg ۲۳/۹) و BHT (۲۸/۸۶ ±۰/۱۱ meq/kg) ممانعت کنندگی بالاتری را در برابر پراکسیداسیون ارائه نمودند که از طریق مقادیر پائین تر اندیس پراکسید قابل تشخیص است.

Arawande و Ogunyemi (۲۰۱۲)، تأثیر عصاره‌های متانولی و آبی کاهوی آفریقایی (*Lactuca taraxacifolia*) در غلظت های ppm ۱۰۰ تا ppm ۲۰۰ را در مقایسه با آنتی اکسیدان سنتتیک BHT (ppm ۲۰۰) بر پایداری روغن هسته پالم تصفیه شده در طول ۱۲ ماه نگهداری در بطری های پلاستیکی شفاف در درجه حرارت اتاق (۲۷–۳۳° C) بررسی نمودند. آن‌ها نشان دادند که اسیدهای چرب آزاد، اندیس آنیزیدین و اندیس پراکسید روغن هسته پالم حاوی عصاره‌های متانولی و آبی کاهوی آفریقایی نسبت به نمونه حاوی BHT پایین تر است، ضمن اینکه عصاره آبی مذکور هم از نظر پایداری هیدرولیتیک و هم از نظر پایداری اکسیداتیو، دارای عملکرد بهتری می باشد.

Roy و همکاران (۲۰۱۲)، تأثیر آنتی اکسیدانی عصاره و پودر برگ های Mulberry (*Morus Indica* L.) را در روغن سبوس برنج در°C ۱۰۰ برای ۵ روز بررسی نمودند. آن‌ها در پایان دوره نگهداری، افزایش در میزان اندیس پراکسید را به ترتیب زیر نشان دادند:

روغن سبوس برنج> روغن سبوس برنج حاوی ppm ۲۰۰ عصاره توت> روغن سبوس برنج حاوی٪ ۰/۰۵پودر توت> روغن سبوس برنج تجاری> روغن سبوس برنج حاویBHT.

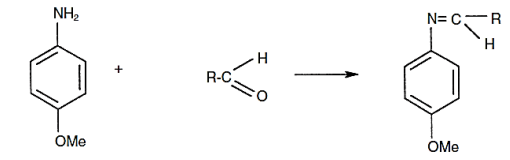
Taghvaei و همکاران (۲۰۱۴)، فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره برگ زیتون و عصاره برگ زیتون ریزپوشانی شده توسط صمغ عربی و مالتو دکسترین را در روغن سویا طی ۲۰ روز نگهداری در ۵۵°C مورد ارزیابی و مقایسه قرار دادند. براساس نتایج اندیس پراکسید، عصاره برگ زیتون یک فعالیت آنتی اکسیدانی مناسب را نشان داد اما بهترین اثر محافظتی در روغن سویا حاوی BHT ۲۰۰ ppm مشاهده گردید.

- تغییرات اندیس پاراآنیزیدین

سبزیجات برگی شکل سبز حاوی طیف وسیعی از فیتوکمیکال‌های بالقوه از قبیل آسکوربیک اسید، کاروتنوئیدها، ویتامین A و ترکیبات پلی فنولیک می باشند که آنتی‌اکسیدان‌های غذایی را تشکیل می‌دهند. این گیاهان علاوه بر آن که به‌عنوان منابع غنی آنتی‌اکسیدان‌ها در نظر گرفته می‌شوند، در ممانعت از رنسیدیتی در روغن‌های خوراکی نیز مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (Shyamala *et al*., 2005).

آنتی‌اکسیدان‌ها اساساً جهت به تأخیر انداختن تجمع فرآورده‌های اولیه اکسیداسیون و بالطبع بهبود پایداری اکسیداتیو در لیپیدها به کار می‌روند. فرآورده‌های اولیه پراکسیداسیون لیپید، هیدروپراکسیدها هستند که معمولاً تحت عنوان پراکسیدها از آن‌ها یاد می‌شود. بنابراین نتایج آزمون اندیس پراکسید، یک معرف آشکار اتواکسیداسیون لیپید می‌باشد. جهت تأیید بیشتر این نتایج، سایر پارامترهای اکسیداسیون از قبیل اندیس پاراآنیزیدین نیز اندازه‌گیری شد. اندیس پاراآنیزیدین به طور گسترده جهت اندازه‌گیری فرآورده‌های اکسیداسیون، عمدتاً کربنیل‌های غیرفرار تشکیل شده در طول تخریب اکسیداتیو روغن مورد استفاده قرار می‌گیرد. آلدئیدها در روغن (۲- آلکانال‌ها و ۲ و ۴- دی انال‌ها) و معرف پاراآنیزیدین با یکدیگر تحت شرایط اسیدی واکنش می دهند که منجر به تشکیل یک ترکیب با رنگ زرد می شود. از این رو افزایش در اندیس پاراآنیزیدین غلظت بالای آلدئیدها و نتیجتاً پایداری اکسیداتیو کم روغن را نشان می‌دهد (Anwar *et al*., 2004, Sultana *et al*., 2007; Omar *et al*., 2009).

در شکل ۱ واکنش پاراآنیزیدین با آلکان نشان داده شده است.



شکل ۱- واکنش پارا آنیزیدین با آلکان ها
(Pokorny, *et al*., 2001)

اندیس پاراآنیزیدین نمونه شاهد در اولین روز آزمایش، ۴ تعیین شد و به ۲۱/۵۹ در روز پنجم افزایش یافت. تمایل نمونه های روغن تالواولئین حاوی غلظت‌های مختلف آنتی‌اکسیدان نسبت به اکسیداسیون در طی مدت نگهداری به ترتیب زیر مشخص گردید :

شاهد > روغن تالواولئین حاوی ppm ۴۰۰ عصاره کاهو > روغن تالواولئین حاوی ppm ۸۰۰ عصاره کاهو > روغن تالواولئین حاوی ppm ۱۰۰۰ عصاره کاهو > روغن تالواولئین حاوی ppm ۲۰۰۰ عصاره کاهو > روغن تالواولئین حاوی BHT ۲۰۰ ppm > روغن تالواولئین حاوی BHA ۲۰۰ ppm.

طی ۲۴ساعت آون‌گذاری، اختلاف معنی‌دار ($P \leq ۰/۰۵$) در اندیس پاراآنیزیدین بین نمونه شاهد و نمونه های روغن تالواولئین حاوی عصاره ها (با غلظت ppm ۸۰۰، ppm ۱۰۰۰ و ppm ۲۰۰۰) و آنتی اکسیدان‌های سنتتیک مشاهده شد و طی ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت آون گذاری، اختلاف معنی‌دار ($P \leq ۰/۰۵$) در اندیس پاراآنیزیدین بین نمونه شاهد با آنتی اکسیدان‌های سنتتیک و همه غلظت‌های عصاره ملاحظه گردید که به مفهوم کاهش سرعت تجزیه پراکسید طی اکسیداسیون است. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره ضایعات کاهو (ppm ۴۰۰، ppm ۸۰۰، ppm ۱۰۰۰ و ppm ۲۰۰۰) نسبت به نمونه‌های حاوی آنتی اکسیدان سنتتیک BHA ضعیف‌تر بود، ضمن این که قابلیت عصاره ضایعات کاهو با غلظت ppm ۲۰۰۰ جهت کاهش اندیس پاراآنیزیدین به خوبی BHT تعیین گردید. اختلاف در فعالیت آنتی اکسیدانی ممکن است ناشی از تفاوت در ساختارهای شیمیایی باشد. پایداری

رادیکال‌های فنوکسی، سرعت واکنش‌های مرحله انتشار و واکنش‌های بعدی را کاهش داده و ازاین رو پایداری اکسیداتیو لیپیدها را افزایش می‌دهد (Ying *et al.*, 2010).

نمونه‌های حاوی عصاره فعالیت‌های آنتی اکسیدانی متفاوتی را در مهار اکسیداسیون لیپید بسته به غلظت عصاره از خود نشان دادند. تحقیقات متعددی کاربرد عصاره‌های گیاهی مختلف را جهت مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانی آن‌ها با آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک گزارش نموده است.

Mohd Nor و همکاران (۲۰۰۸)، خصوصیات آنتی‌اکسیداتیو عصاره‌های برگ (*Pandanus amaryllifolius*) را در مطالعات اکسیداسیون تسریع یافته و سرخ کردن عمیق بررسی نمودند. آن‌ها نشان دادند که عصاره مذکور، فرآیند اکسیداسیون را در پالم اولئین در آزمون‌های اندیس پراکسید و اندیس آنیزیدین به خوبی BHT به تأخیر می اندازد.

Gomathi و همکاران (۲۰۱۱)، نشان دادند که BHA و BHT در ممانعت از اکسیداسیون روغن بادام زمینی نسبت به عصاره برگ‌های (*Pisonia morindifolia* (R.Br. Lettuce tree و (*Tamarindus indica* L.) Tamarind tree مؤثرتر عمل می‌کنند. با این حال نتایج آن‌ها نشان داد که سبزیجات برگی شکل مذکور، علاوه بر عمل به عنوان منابع خوب آنتی‌اکسیدانی می‌تواند به عنوان جایگزینی برای آنتی اکسیدان‌های سنتتیک در پایدار نمودن بادام زمینی به کار رود.

Taghvaei و همکاران (۲۰۱۴)، نتایج آزمون اندیس پاراآنیزیدین در مورد مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره برگ زیتون با آنتی اکسیدان‌های سنتتیک را طی ۲۰ روز نگهداری در دمای $55^{\circ}C$ به صورت زیر اعلام نمودند (برحسب افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی) :

شاهد< روغن حاوی عصاره برگ زیتون ریزپوشانی شده با صمغ عربی< روغن حاوی عصاره برگ زیتون ریزپوشانی شده با صمغ عربی و مالتو دکسترین< روغن حاوی عصاره برگ زیتون ریزپوشانی شده با مالتو دکسترین< روغن حاوی عصاره برگ زیتون < روغن حاوی BHT (۱۰۰ ppm) < روغن حاوی BHT (۲۰۰ ppm). پس از BHT عصاره برگ زیتون، فعالیت آنتی اکسیدانی بهتری در مقایسه با عصاره‌های ریزپوشانی شده آن نشان داد.

- تغییرات اندیس توتوکس

این اندیس با در نظر گرفتن اندیس پراکسید و اندیس آنیزیدین به طور همزمان تصویر کامل تری از وضعیت اکسیداسیونی نمونه‌های روغن تالواولئین را نشان می‌دهد. بالا رفتن اندیس توتوکس، افزایش مقادیر محصولات اولیه و ثانویه اکسیداسیون لیپید را بازتاب می‌نماید. کاهش اندیس توتوکس به مفهوم کیفیت بهتر روغن می باشد. طی ۲۴ و ۴۸ ساعت آون‌گذاری، اختلاف معنی‌دار ($P \leq$ ۰/۰۵) در اندیس توتوکس بین نمونه روغن شاهد و نمونه های روغن حاوی عصاره ها (با غلظت ppm ۸۰۰، ppm ۱۰۰۰ و ppm ۲۰۰۰) و آنتی اکسیدان‌های سنتتیک مشاهده شد و طی ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت‌آون گذاری، اختلاف معنی دار در اندیس توتوکس نمونه شاهد با آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک و همه غلظت‌های عصاره ملاحظه گردید که نشانه کند شدن سرعت تشکیل محصولات اولیه و ثانویه اکسیداسیون لیپید به طور توأم می باشد.

-تغییرات شاخص پایداری اکسیداتیو تحت آزمون رنسیمت

روش رنسیمت بر پایه تغییرات هدایت الکتریکی ایجاد شده در آب دیونیزه پس از افزایش غلظت اسیدهای کربوکسیلیک فرار تولید شده در مراحل نهایی و فرآیند اکسیداسیون تسریع یافته روغن می باشد (Méndez *et al.*, 1996). زمان مورد نیاز جهت ایجاد یک افزایش ناگهانی در هدایت الکتریکی به دلیل تشکیل اسیدهای فرار عمدتاً اسید فرمیک، شاخص پایداری اکسیداتیو را تعیین می‌کند که می‌تواند به عنوان یک شاخص ارزیابی از مقاومت به اکسیداسیون یک روغن یا چربی تعریف گردد. سطوح بالاتر OSI، فعالیت‌های آنتی اکسیدانی بالاتر را نشان می دهد.

افزودن عصاره ضایعات کاهو و آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک به طور معنی‌داری ($P \leq$ ۰/۰۵) شاخص پایداری اکسیداتیو تالواولئین غنی شده را در مقایسه با نمونه شاهد بهبود می بخشد. همچنین پایداری اکسیداتیو نمونه های روغن با افزایش در غلظت عصاره‌ها بهبود می‌یابد. عملکرد

بهتر آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک در آزمون رنسیمت می‌تواند به مقاومت بالاتر آن‌ها در برابر تجزیه توسط حرارت یا افت به واسطه فراریت، که تحت عنوان حفظ کردن ویژگی[1] از آن یاد می‌شود، ارتباط داده شود (Fennema, 1996). مطالعات محدودی در مورد ارزیابی تأثیر ترکیبات دارای خاصیت آنتی اکسیدانی بر روغن تالواولئین موجود است.

الهامی راد و قوامی (۱۳۸۹)، اثرات سینرژیستی فسفولیپیدها (فسفاتیدیل کولین، فسفاتیدیل اتانول آمین و فسفاتیدیک اسید در غلظت‌های ٪۰/۰۱، ٪۰/۰۴ و ٪۰/۰۸ وزنی/ حجمی) را بر اسید گالیک (در غلظت ٪۰/۰۲ وزنی/ حجمی) در محیط تالواولئین با استفاده از روش رنسیمت در دمای ۱۵۰ °C مورد بررسی قرار دادند. نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد که فسفاتیدیل کولین و فسفاتیدیک اسید فاقد اثرات سینرژیستی بوده و حتی به عنوان پراکسیدان یا آنتاگونیست عمل کرده و سبب کاهش فعالیت آنتی‌کسیدانی اسید گالیک می شوند اما فسفاتیدیل اتانول آمین در همه غلظت‌ها دارای اثرات سینرژیستی مناسبی به ویژه در غلظت ٪۰/۰۸ وزنی/ حجمی در محیط تالواولئین می‌باشد. آن‌ها نشان دادند که شاخص پایداری اکسیداتیو تالواولئین در حضور اسید گالیک (٪۰/۰۲ وزنی/ حجمی) به تنهایی و در تیمار ترکیبی حاوی اسید گالیک (٪۰/۰۲ وزنی/ حجمی) و فسفاتیدیل اتانول آمین (٪۰/۰۸ وزنی/ حجمی) به ترتیب ۴/۸۲ و ۶/۴۲ ساعت می باشد.

الهامی راد و حداد خداپرست (۱۳۹۰)، خصوصیات آنتی اکسیدانی و حفظ کردن ویژگی فسفولیپیدها (فسفاتیدیل کولین، فسفاتیدیل اتانول آمین و فسفاتیدیک اسید در غلظت های ٪۰/۰۱، ٪۰/۰۴ و ٪۰/۰۸ وزنی/ حجمی) را در چربی فراکسیون گیری شده تالو گوسفند یعنی فراکسیون اولئین در ۱۸۰°C با استفاده از روش رنسیمت ارزیابی نمودند. آن‌ها نشان دادند که افزودن (٪۰/۰۴ وزنی/ حجمی) فسفاتیدیل کولین و فسفاتیدیل اتانول آمین، پایداری اکسیداتیو تالواولئین را تا حدی افزایش می دهد در حالی که در مورد فسفاتیدیک اسید هیچ اثر آنتی اکسیدانی مشاهده نگردید.

Elhamirad و Zamanipoor (۲۰۱۲)، شاخص پایداری اکسیداتیو تعدادی از فلاونوئیدها (کوئرستین و کاتکین) و اسیدهای فنولیک (گالیک اسید، تانیک اسید، الاجیک اسید و کافئیک اسید) افزوده شده به تالواولئین را در غلظت ٪۰/۰۱ (وزنی/ حجمی) در ۱۲۰، ۱۴۰، ۱۶۰ و ۱۸۰°C با استفاده از رنسیمت تعیین نمودند. نتایج آن ها نشان داد که شاخص پایداری اکسیداتیو کوئرستین (±۰/۰۵ ۱۰/۷۹، ±۰/۰۴ ۳/۶۱، ±۰/۰۰ ۱/۱۵ و ±۰/۰۲ ۰/۴۱ ساعت) و گالیک اسید (±۰/۰۱ ۳۱/۹۴، ±۰/۰۴ ۶/۴۴، ±۰/۰۲ ۱/۳۲ و ±۰/۰۱ ۰/۲۵ ساعت) دارای بالاترین شاخص پایداری اکسیداتیو به ترتیب در ۱۲۰°C ، ۱۴۰°C، ۱۶۰°C و ۱۸۰°C در میان دیگر ترکیبات می باشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به آن که در سال‌های اخیر، تکنیک‌های استخراج نوین، کارآمد و سبز از قبیل استخراج به کمک اولتراسوند که به طور قابل ملاحظه ای با کاهش مصرف حلال، تسریع فرآیند استخراج و سازگاری با محیط زیست توأم می‌باشد، توسعه یافته است، بنابراین عصاره آنتی‌اکسیدانی برگ‌های خارجی کاهو به عنوان ضایعات این محصول از طریق استخراج اولتراسونیک توسط حلال ایمن و غیر سمی اتانول/ آب (۷۰:۳۰ حجمی/ حجمی) بازیابی گردید. همچنین ارزیابی آثار حافظتی غلظت های مختلف عصاره آنتی‌اکسیدانی ضایعات کاهو از طریق پایش تغییرات اندیس‌های پراکسید، پاراآنیزیدین، توتوکس و نیز شاخص پایداری اکسیداتیو در نمونه‌های روغن تالواولئین تحت شرایط اکسیداسیون تسریع یافته مشخص نمود که عصاره آنتی اکسیدانی مذکور می‌تواند به عنوان منبع آنتی اکسیدان طبیعی جهت به تأخیر انداختن سرعت اکسیداسیون روغن‌های خوراکی مورد استفاده قرار گیرد. از طرف دیگر، بازیابی ترکیبات بیواکتیو از ضایعات کاهو می‌تواند یک راهکار مؤثر جهت مدیریت و کنترل آلودگی‌های زیست محیطی در زمینه دفع ضایعات گیاهی محسوب شود.

منابع

الهامی راد، ا. ح. و حداد خداپرست، م. ح. (۱۳۹۰). بررسی خصوصیات آنتی اکسیدانی و پایداری حرارتی فسفولیپیدها در محیط تالواولئین. مجله علوم غذایی و تغذیه، سال هشتم، شماره ۳، ص ۷۱-۶۴.

[1] Carry Through Property

الهامی راد، ا. ح.، قوامی، م. و حداد خداپرست، م. ح. (۱۳۹۰). بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی برخی ترکیبات فنولی در محیط تالواولئین. فصلنامه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه تربیت مدرس، دوره ۸، (۱)، ۳۳، ۲۵-۱۳.

الهامی راد، ا. ح. و قوامی، م. (۱۳۸۹). بررسی اثرات سینرژیستی فسفولیپیدها بر اسید گالیک در محیط تالواولئین. مجله علوم و فناوری غذایی، سال دوم، شماره اول، ص ۱۷-۹.

سیمان پور، م.، قراچورلو، م. و فهیم دانش، م. (۱۳۹۱). بررسی توزیع کلسترول در فراکسیون‌های مختلف چربی دنبه گوسفندی. مجله علوم غذایی و تغذیه، سال نهم، شماره ۳، ص۳۰-۲۱.

قراچورلو، م. (۱۳۸۵). ارزیابی کیفیت، فراکسیون‌گیری و بهبود خصوصیات کیفی چربی حیوانی جهت تولید روغن‌هایی با خصوصیات کاربردی مناسب در صنایع غذایی، پایان نامه دکترای رشته مهندسی کشاورزی علوم و صنایع غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، دانشکده علوم و مهندسی صنایع غذایی.

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

Altunkaya, A., Becker, E. M., Gökmen, V. & Skibsted, L. H. (2009). Antioxidant activity of lettuce extract (*Lactuca sativa*) and synergism with added phenolic antioxidants. Food Chemistry, 115, 163–168.

Amirah, D. M., Reddy, P. & Maksudur, R. K. (2012). Comparison of extraction techniques on extraction of Gallic acid from stem bark of Jatropha curcas, Journal of Applied Sciences, 12, 1106–1111.

Anwar, F., Bhanger, M. I. & Kazi, T. G. (2003). Relationship between Rancimat and active oxygen method values at varying temperatures for several oils and fats. Journal of the American Oil Chemists' Society, 80, 151-155.

Anwar, F., Manzoor, M. & Bajwa, J. R. (2004). Antioxidant activity of solvent extracts of strawberry (*F. ananassa*) using various antioxidant assays. Pakistan Journal of Analytical and Environmental Chemistry, 5, 28–37.

Arawande, J. O. & Ogunyemi, O. Y. (2012). Effect of Methanol and Water Extract of African Lettuce (*Lactuca taraxacifolia*) on Stability of Refined Palm Kernel Oil. Official Journal of Nigerian Institute of Food Science and Techonology, 30, 1-7.

Arumugam, P. P., Ramamurty, P., Santhiya, S. T. & Ramesh, A. (2006). Antioxidant activity measured in different solvent fractions obtained from *Mentha spicata* Linn: An analysis by ABTS$^{\circ+}$ decolorization assay. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, 15, 20-24.

Bahorun, T., Luximon-Ramma, A., Crozier, A. & Aruoma, O. I. (2004). Total phenol, flavonoid, proanthocyanidin and vitamin C levels and antioxidant activities of Mauritian vegetables. Journal of the Science of Food and Agriculture, 84, 1553–1561.

Bartnik, D. D., Mohler, C. M. & Houlihan, M. (2006). Methods for the production of food grade extracts, United States Patent Application, 20060088627, April 27.

Caldwell, C.R. (2003). Alkylperoxyl radical scavenging activity of red leaf lettuce (*Lactuca sativa* L.) phenolics. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 4589–4595.

Da Porto, C., Porretto, E. & Decorti, D. (2013). Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. Ultrasonics Sonochemistry, 20, 1076–1080.

Durling, N. E., Catchpole, O. J., Grey, J. B., Webby, R. F., Mitchell, K. A., Foo, L. Y. & Perry, N. B. (2007). Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol–water mixtures. Food Chemistry, 101, 1417–1424.

Edziri, H.L., Smach, M.A., Mahjoub, M.A., Mighri, Z., Aouni, M. & Mastouri, M. (2011). Antioxidant, antibacterial, and antiviral effects of Lactuca sativa extracts. Journal of Industrial Crops and Products, 34, 1182– 1185.

Elhamirad, A. H. & Zamanipoor, M. H. (2012). Thermal stability of some flavonoids and phenolic acidsin sheep tallow olein. European Journal of Lipid Science and Technology, 114, 602–606.

Esclapez, M. D., García-Pérez, J. V., Mulet, A. & Cárcel, J. A. (2011). Ultrasound-assisted extraction of natural products, Food Engineering Reviews, 3,108–120.

Farhoosh, R. (2007). The effect of operational parameters of the Rancimat method on the determination of the oxidative stability measures and shelf-life prediction of

soybean oil. Journal of the American Oil Chemists' Society, 84, 205–209.

Fennema, O. R. (1996). Food Chemistry, Third Edition, Marcel Dekker, Inc.

Ferreira, A. (2011). Influence of spent coffee grounds on growth and chemical and biological properties of lettuce (*Lactuca sativa* L.). Master Thesis. School of Agriculture, Polytechnic Institute of Braganc¸ a, Portugal.

Firestone, D. (1990). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 15 th edn., Arlington, USA.

Firestone, D. (1994). Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society. AOCS Press, Champaign, IL.

Gomathi, R., Anusuya, N., Chitravadivu, Ch. & Manian, S. (2011). Antioxidant activity of lettuce tree (Pisonia morindifolia R.Br.) and tamarind tree (Tamarindus indica L.) and their efficacy in peanut oil stability. Food Science and Biotechnology, 20, 1669-1677.

Goli, A. H., Barzegar, M. & Sahari, M. A. (2005). Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*pistachia vera*) hull extracts. Food Chemistry, 92: 521-525.

Gomes, T., Delgado, T., Ferreira, A., Pereira, J. A., Baptista, P., Casal, S. & Ramalhosa, E. (2013). Application of response surface methodology for obtaining lettuce. (*Lactuca sativa* L.) by-products extracts with high antioxidative properties. Journal of Industrial Crops and Products, 44, 622– 629.

Harsha, S. N. & Anilakumar, K. R. (2013). Protection against aluminium neurotoxicity: A repertoire of lettuce antioxidants. Biomedicine & Aging Pathology, 3, 179-184.

Harsha, S. N., Anilakumar, K. R. & Mithila, M. V. (2013). Antioxidant properties of *Lactuca sativa* leaf extract involved in the protection of biomolecules. Biomedicine & Preventive Nutrition, 3, 367-373.

Im, S. E., Yoon, H., Nam, T. G., Heo, H. J., Lee, C. Y. & Kim, D.O. (2010). Anti neurodegenerative effect of phenolic extract and caffeic acid derivatives in romaine lettuce on neuron-like PC-12 cell. Journal of Medicinal Food, 13, 779–784.

ISO. (1990). Animal and vegetable fats and oils – determination of analysis by chromatography of methyl esters of fatty acids.

ISO. (2000). Animal and vegetable fats and oil – Preparation of methyl esters of fatty acids. 2nd .ed .5509.

Kabir, F., Tow, W.W., Hamauzu, Y., Katayama, S Tanaka, S. & Nakamura, S. (2015). Antioxidant and cytoprotective activities of extracts prepared from fruit and vegetable wastes and by-products. Food Chemistry, 167, 358–362.

Li, Y., Guo, C., Yang, J., Wei, J., Xu, J. & Cheng, S. (2006). Evaluation of Antioxidant Properties of Pomegranate Peel Extract in Comparison with Pomegranate Pulp Extract. Food Chemistry, 96, 254–260.

Llorach, R., Tomás-Barberán, F. A. & Ferreres, F. (2004). Lettuce and chicory byproducts as a source of antioxidant phenolic extracts. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 5109–5116.

L´opez, A., Javier, G.-A., Fenoll, J., Hell´in, P. & Flores, P. (2014). Chemical composition and antioxidant capacity of lettuce: comparative study of regular-sized (Romaine) and baby-sized (Little Gem and Mini Romaine) types, Journal of Food Composition and Analysis, 33, 39-48.

Mendez, E., Sanhueza, J., Speisky, H. & Valenzuela, A. (1996). Validation of the Rancimat test for the assessment of the relative stability of fish oils. Journal of the American Oil Chemists' Society, 73, 1033–1037.

Mohd Nor, F., Mohamed, S., Idris, N. A. & Ismail, R. (2008). Antioxidative properties of Pandanus amaryllifolius leaf extracts in accelerated oxidation and deep frying studies. Food Chemistry, 110, 319–327.

Nantitanon, W., Yotsawimonwat, S. & Okonogi, S. (2010). Factors influencing antioxidant activities and total phenolic content of guava leaf extract. LWT - Food Science and Technology, 43, 1095-1103.

Omar, K. A., Shan, L., Zou, X., Song, Z. & Wang, X. (2009). Effects of two emulsifiers on yield and storage of flaxseed oil powder by response surface methodology. Pakistan Journal of Nutrition, 8, 1316–1324.

Ozgen, S. & Sekerci, S. (2011). Effect of leaf position on the distribution of phytochemicals and antioxidant capacity among green and red lettuce cultivars. Spanish Journal of Agricultural Research, 9, 801–809.

Pepe, G., Sommella, E., Manfra, M., De Nisco, M., Tenore, G. C., Scopa, A., Sofo, A., Marzocco, S., Adesso, S., Novellino, T. & Campiglia, P. (2015). Evaluation of anti-inflammatory activity and fast UHPLC-DAD-IT-TOF profiling of polyphenolic compounds extracted from green lettuce (*Lactuca sativa*

L., var. Maravilla de Verano). Food Chemistry, 167,153-61.

Peschel, W., Sánchez-Rabaneda, F., Diekmann, W., Plescher, A., García, I., Jiménez, D., Lamuela- Raventós, R., Buxaderas S. & Codina C. (2006). An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. Food Chemistry, 97, 137–150.

Pokorny, J., Ysnishlieve, N. & Gordon, M. (2001). Antioxidants in Food. Practical application. Cambridge, CRC Press. Woodhead Publishing Limited. England.

Prior, R. L. (2004). Absorption and metabolism of anthocyanins: Potential health effects. In M. Meskin, W. R. Bidlack, A. J. Davies, D. S. Lewis, & R. K. Randolph (Eds.), Phytochemicals: Mechanisms of action (pp.1). Boca Raton, FL: CRC Press.

Rahmat, A., Kumar, V., Fong, L. M., Endrini, S. & Abdullah, S. H. (2003). Determination of total antioxidant activity in three types of local vegetables shoots and the cytotoxic effect of their ethanolic extracts against different cancer cell lines. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, 12, 292- 295.

Roy, L. C., Arabshahi- Delouee, S. & Urooj, A. (2012). Antioxidant efficacy of Mulberry (*Morus Indica* L.) leaves extract and powder in edible oil. International Journal of Food Properties, 13, 1-9.

Serjouie, A., Tan, C. P., Mirhosseini, H. & Che Man, Y. B. (2010). Effect of vegetable-basedoil blends on physicochemical properties of oils during deep – fat frying. American Journal of Food Technology, 5, 310–323.

Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K. & Nakamura, T. (1992). Antioxidative properties of xanthin on auto oxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. Agricultural and Food Chemistry, 40, 945-948.

Shyamala, B. N., Gupta, S., Lakshmi, A. J. & Prakash, J. (2005). Leafy vegetable extracts-antioxidant activity and effect on storage stability of heated oils. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 6, 239-245.

Souri, E., Amin, G., Farsam, H. & Andaji, S. (2004). The antioxidant activity of some commonly used vegetables in Iranian diet. Fitoterapia, 75, 585–588.

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

Sultana, B., Anwar, F. & Przybylski, R. (2007). Antioxidant potential of corncob extracts for stabilization of corn oil subjected to microwave heating. Food Chemistry, 104, 997–1005.

Tabaraki, R. & Rastgoo, S. (2014). Comparison between conventional and ultrasound-assisted extractions of natural antioxidants from walnut green husk. Korean Journal of Chemical Engineering, 31, 676-683.

Taghvaei, M., Jafari, S.M., Sadeghi Mahoonak, A., Mehregan Nikoo, A., Rahmanian, N., Hajitabar, J. & Meshginfar, N. (2014). The effect of natural antioxidants extracted from plant and animal resources on the oxidative stability of soybean oil. LWT - Food Science and Technology, 56, 124-130.

Tiveron, A. P., Melo, P. S., Bergamaschi, K. B., Vieira, T. M. F. S., Regitano-d'Arce, M. A. B. & Alencar, S. M. (2012). Antioxidant Activity of Brazilian Vegetables and Its Relation with Phenolic Composition. Search Results International Journal of Molecular Sciences, 13, 8943-8957.

Tynek, M., Szukalska, E. & Bartoszek, A. (2008). Influence of cabbage juices on oxidative changes of rapeseed oil and lard. European Journal of Lipid Science and Technology, 110, 1142–1149.

Viacava, G. E., González-Aguilar, G. & Roura, S. I. (2014). Determination of Phytochemicals and Antioxidant Activity in Butterhead Lettuce Related to Leaf Age and Position. Journal of Food Biochemistry, 38, 352–362.

Viacava, G. E., Roura, S. I. & Ag¨uero, M. V. (2015). Optimization of critical parameters during antioxidants extraction from butterhead lettuce to simultaneously enhance polyphenols and antioxidant activity. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 146, 47-54.

Wijngaard, H. H., Rößle, C. & Brunton, N. (2009). A survey of Irish fruit and vegetable waste and by-products as a source of polyphenolic antioxidants. Food Chemistry, 116, 202–207.

Ying, Z., Lei, Y., Yuangang, Z., Xiaoqiang, C., Fuji, W. & Fang, L. (2010). Oxidative stability of sunflower oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during accelerated storage. Food Chemistry, 118, 656–662.