مجله شیمی کوانتومی و اسپکتروسکوپی
۸:۲۵ (۱۳۹۷) ۵۷-۷۲
Journal of Quantum Chemistry and Spectroscopy (JQCS)

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی و اتانولی تفاله انگور رقم عسگری با استفاده از اسپکتروسکوپی UV-Vis

سیدهاشم اخلاقی[1*]، مهری نعیمی مسرور[2]
دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سبزوار، گروه شیمی
دانش آموخته گروه مهندسی صنایع غذایی، سبزوار، ایران

تاریخ ثبت اولیه:۱۳۹۶/۱۱/۱۰، تاریخ دریافت نسخه اصلاح شده:۱۳۹۷/۰۱/۲۲ ، تاریخ پذیرش قطعی:۱۳۹۷/۰۲/۰۳

چکیده

در این پژوهش، عصاره های آبی و اتانولی تفاله انگور به روشهای اولتراسوند و پرکولاسیون استخراج شد. میزان کل ترکیبات فنولی موجود در عصاره ها به روش فولین سیوکالتیو و قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد به روش ۲و۲- دی فنیل-۱- پیکریل هیدرازیل و قدرت کیلیت کنندگی یون آهن به روش جذب فروزین تعیین گردید. تجزیه واریانس با برنامه آماری SAS نشان داد که اثر حلال، زمان، شدت و اثر متقابل [شدت×زمان] و [شدت×حلال] و [زمان ×حلال] بر روی قدرت رادیکال گیرندگی تفاوت معنی داری در سطح ۰/۰۱ (یک درصد) بین سطوح آزمایشی دارد. مقایسه میانگین تیمارها نشان داد که قدرت رادیکال گیرندگی ۵۰٪ استفاده از حلال آبی نسبت به حلال اتانولی بیشتر است. بالاترین قدرت رادیکال گیرندگی عصاره التراسوند در زمان ۴۰ دقیقه و کمترین قدرت آن در زمان ۳۰ دقیقه مشاهده گردید. افزایش شدت اولتراسوند سبب کاهش قدرت رادیکال گیرندگی شد طوری که بیشینه آن در شدت ۲۰ درصد و کمینه آن در شدت ۴۰ درصد مشاهده گردید.

واژه های کلیدی : ***تفاله انگور، ترکیبات فنلی، آنتی اکسیدان طبیعی، قدرت کیلیت کنندگی، رادیکال های آزاد***

۱. مقدمه

به طور کلی مواد مغذی ترکیباتی هستند که در داخل غذاها وارد شده و وظایف موادغذایی از طریق آنها به انجام می رسد، تاکنون شش دسته از مواد مغذی در تغذیه انسان شناخته شده اند: کربوهیدراتها، چربیها، پروتئین ها، ویتامین ها، عناصر معدنی وآب.

***عهده دار مکاتبات:** سیدهاشم اخلاقی
نشانی: گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران
تلفن:۰۹۱۵۱۷۰۶۱۸۳ **پست الکترونیک:**E-mail: hashemakhlaghi@hotmail.com

بنابراین رژیم غذایی با مقادیر زیاد میوه و سبزی و مقادیر کم کلسترول و چربی به طور معکوس با ظهور بیماری قلبی-عروقی، سرطان و ظهور بیماری‌های مزمن مرتبط است و طول عمر را افزایش می دهد. همچنین مشخص شده که ترکیبات فنولیک یکی از اصلی ترین گروه هایی هستند که از بیماریهایی مانند تصلب شرائین و سرطان جلوگیری می کند. بکارگیری اسیدهای فنولی طبیعی به عنوان ترکیبی که رادیکال های آزاد را درگیر می‌کنند به شدت مورد توجه محققان قرار گرفته‌است [۱]. آنتی‌اکسیدان‌های شیمیایی که بیشترین استفاده را در صنعت غذا دارند، شامل TBHQ، BHA ، BHT و پروپیل گالات می‌باشد. مطالعات بسیاری نشان داده اند که ترکیبات پلی فنولیک، آنتی‌اکسیدان‌های خوبی در برابر پراکسیداسیون چربی‌ها در فسفولیپیدها و سیستم های بیولوژیکی هستند. این قضیه عموماً پذیرفته شده که موقعیت تنش اکسیداتیو به وسیله گونه‌های مختلف اکسیژن فعال شده مانند رادیکال‌های سوپراکسید، هیدروکسیل و متوکسیل ایجاد می‌شود. رادیکال‌ها نقش مهمی در ایجاد بیماری‌های مختلف مانند اختلالات عصبی، سرطان و بیماری‌های قلبی عروقی دارند. از دیدگاه صنعتی و تغذیه‌ای اضافه کردن یک ماده برای کنترل فرایند اکسیداسیون و بهبود کیفیت محصولات غذایی ضروری به نظر می‌رسد. در این رابطه آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که با به تأخیر انداختن فرایند اکسیداسیون باعث افزایش نیمه عمرچربی‌ها می‌شوند. مطالعات نشان می‌دهند که دلیل محافظت آنتی‌اکسیدان‌ها از چربی‌ها احتمالاً به خاطر توانایی این ترکیبات در جمع کردن[1] رادیکالهای آزاد است. در حقیقت آنتی‌اکسیدان‌ها به وسیله‌ی واکنش با رادیکال‌های آزاد قبل از اینکه با اکسیژن یا با اسیدهای چرب واکنش دهند، از بین می‌روند.

درخت انگور که در ایران آن را تاک یا مو می‌نامند، از نظر گیاه‌شناسی دارای گونه‌های مختلف است که مهمترین آن‌ها گونه وینیفرا از جنس ویتیس و از خانواده ویتاسه می‌باشد. ارقام وینیفرا دارای بهترین کیفیت محصول بوده و در اکثر مناطق معتدل جهان کشت و بهره برداری می‌گردد[۲]. انگور رسیده میوه مفیدی در درمان یبوست ها، التهاب معده و روده، سیاه سرفه، سل ریوی، کم خونی و نقرس می‌باشد. هم‌چنین دفع‌کننده‌ی سموم بدن و تولیدکننده خون مفید و پاک کننده کلیه هاست. اخیراً دانشمندان به این موضوع پی برده‌اند که انگور و دانه‌های آن می تواند در جوانی و سلامت پوست نقش بسزایی داشته و برای سلامت قلب و ریه و کلیه مفید باشد[۲].

ایران به علت برخورداری از شرایط جغرافیایی و اقلیمی مناسب، یکی از مهمترین مناطق پرورش انگور در جهان محسوب می‌شود. به طوری که ایران ششمین کشور تولید کننده انگور در جهان می‌باشد[۳]. مو گیاهی است از تیره‌ی آمپلی داسه[2] که آن را سارمانتاسه[3] و یا ویتاسه[4] نیز می‌نامند. این تیره، شامل ۱۰ جنس مختلف است که عده ای از آنان، جزو گیاهان زینتی بوده و جنس‌های دیگر، به‌استثنای جنس ویتیس[5] که از لحاظ تغذیه مورد توجه می‌باشد، فاقد اهمیت هستند. این رقم، بیشتر به مصرف تازه‌خوری می‌رسد و کاشت آن در اکثر نقاط ایران گسترش دارد. اندازه حبه نسبتاً کوچک (متوسط)، بدون دانه، شکل حبه بیضوی و کشیده، رنگ آن

[1] Scavenge
[2] Amplidaceae
[3] Sarmentaceae
[4] -Vitaceae
[5]-Vitis

سبز مایل به زرد، پوست حبه نازک و گوشت آن لطیف، پر آب و شیرین است. قابلیت حمل و نقل و نگهداری آن ضعیف بوده، وغالبا دارای خال های قهوه ای و هسته می‌باشند.

در تحقیقی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره های بدست آمده از باقی مانده‌های دانه‌های روغنی متفاوت با حلال هایی مانند متانل ۷۰٪، آب و اتیل استات مورد مطالعه قرار گرفت [۴]. کل ترکیبات فنلی به وسیله روش فولین سیکالتیو تعیین شده و بر عصاره های مختلف به نسبت ۳تا۱۹ درصد بود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره ها با روشهای (B- کاروتن – لینولئیک اسید و ESR) تعیین شد ولی ارتباط میان روش های استفاده شده برای خصوصیات فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات باقی مانده وابسته به قطبیت حلال ها می‌باشد.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی شش نوع چای سبز، زرد، سفید، سبزتیره و اولونگ بر اکسیداسیون روغن کانولا در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد مورد ارزیابی قرار گرفت [۵]. سنجش اکسیژن مصرفی و تغییرات اسیدهای لنولئیک و لینولنیک مشخص کرد که عصاره های اتانولی چای سبز، زرد و سفید به شدت مانع از اکسیداسیون شده و قابل مقایسه با BHT می‌باشند. محققان مذکور این امر را به وجود ترکیبات پلی فنولی طبیعی چای نسبت دادند. در مقابل، چای اولونگ اثر آنتی‌اکسیدانی متوسط و چای سیاه و چای سبز تیره فاقد اثر محافظت کنندگی یا دارای اثر اندکی بر روی روغن کانولا بودند.

در تحقیقی دیگر، فعالیت آنتی‌اکسیدانی پودر و عصاره مرزنگوش، نعناع، ریحان، و زیره سبز در نوعی کراکر مورد ارزیابی قرار گرفت [۶]. عصاره هر چهار گیاه (۰/۰۲درصد) در مقایسه با BHT و پودر آنها (۰/۵ درصد) در مقایسه با نمونه کنترل (بدون آنتی‌اکسیدان) نتایج بهتری در برداشت.

هدف از این پژوهش، مطالعه و استخراج ترکیبات فنولیک تفاله انگور رقم عسکری، درصد قدرت مهارکنندگی عصاره های حاصله به روش آبی و اتانولی، قدرت کیلیت کنندگی یون آهن به روش فروزین در عصاره‌های استخراجی به روش پرکولاسیون و اولتراسوند می باشد.

۲. مواد و روش ها

۲-۱. نمونه مورد آزمایش

برای این پژوهش، انگور عسگری تازه به عنوان ماده‌ی اولیه اصلی برای استخراج آنتی‌اکسیدان تفاله، در تابستان ۱۳۹۳از تاکستان های شهرستان کاشمر جمع آوری و فوراً به سبزوار انتقال و تا شروع آزمایش در یخچال نگهداری شد.

۲-۲. معرف ها و مواد شیمیایی

معرف فولین سیوکالتیو، معرف DPPH، اسید گالیک، آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی، کربنات سدیم، اتانول و متانول از شرکت مرک تهیه شدند.

۲-۳. تجهیزات

دسیکاتور، شیکرلوله‌ای، هم زن مغناطیسی، ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱ گرم مدل AND ژاپن، اسپکتروفتومتری UV-Vis از شرکت میلتون امریکا، سانتریفیوژ ساخت آلمان، دستگاه اولتراسوند ساخت آلمان، آون معمولی، پیپت های مدرج استریل، آبمیوه گیری خانگی از تجهیزات مورد استفاده در این پژوهش بودند.

۲-٤. مراحل انجام پژوهش

۲-٤-۱. آماده سازی عصاره ها

در این مطالعه ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در تفاله تازه انگور رقم عسگری با دو روش مختلف عصاره گیری با حلال (پرکولاسیون یا نفوذ) و روش اولتراسوند استخراج شدند.

۲-٤-۱-۱. استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی با حلال (پرکولاسیون)

جهت استخراج عصارهای آبی و اتانولی ابتدا ۲۰ گرم از تفاله تازه انگور آبگیری شده با ۱۰۰ میلی لیتر اتانول (۱: ۵ وزنی/حجمی) طی ۲۴ ساعت، توسط دستگاه همزن مغناطیسی در دمای اتاق مخلوط شدند(جهت ممانعت از تبخیر اتانول، روی بشر، فویل قرار داده شد) عصاره آبی پرکولاسیون هم به همین صورت تهیه شد. سپس محتویات ظرف استخراج، بعد از عبور از فیلتر پارچه‌ای به کمک کاغذ صافی واتمن شماره ۴۲ تحت خلاء طی دو تکرار صاف و سپس سانتریفوژ شد. عصاره استخراجی، به ظروف شیشه‌ای تیره منتقل و در یخچال نگهداری شد. برای تعیین راندمان عصاره گیری مقداری از عصاره در دمای کمتر از$^{\circ}$c۴۰خشک و وزن گردید.

۲-٤-۱-۲. استخراج با اولتراسوند

به منظور بهینه سازی عصاره‌گیری و با توجه به قطبیت متفاوت ترکیبات آنتی اکسیدان، استخراج عصاره با استفاده از آب و اتانول انجام شد. برای تهیه هر کدام از ۹ عصاره اولتراسوند اتانولی و آبی، هر بار ۲۰ گرم تفاله تازه را توزین و با ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر(۱ :۵ وزنی/ حجمی) با هم زن شیشه‌ای مخلوط کرده، و به مدت ۲۰، ۳۰ و۴۰ دقیقه با شدت های ۲۰، ۳۰ و۴۰ کیلو هرتز، به صورت نیمه مداوم (پالس) تحت تاثیر امواج التراسوند قرار داده شد. بعد از اتمام هر عملیات محتویات داخل بشر با کاغذ واتمن تحت خلاء صاف شد و عصاره صاف شده را به شیشه های تیره منتقل کرده و داخل یخچال نگهداری شد.

۲-٤-۲. انتخاب مناسب ترین حلال و روش استخراج

به منظور تعیین تاثیر نوع حلال و روش استخراج بر راندمان عصاره گیری و بازده استخراج ترکیبات فنولیک و انتخاب مناسبترین حلال و روش استخراج، نتایج حاصله از دو نوع حلال و دو روش استخراج در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار مورد تجزیه واریانس قرار گرفتند و مناسبترین حلال و روش براساس مقایسه میانگن، انتخاب شدند.

اولتراسوند احتمالاً آسانترین روش برای تخریب سلول‌ها و تولید عصاره‌ها می‌باشد. به منظور استخراج مواد، غشاء سلول‌ها باید شکسته شود، کاویتاسیون اولتراسوند، نیروهای برشی را ایجاد می‌کند که دیواره های سلول را به طور مکانیکی می‌شکند و انتقال

مواد را بهبود می‌بخشد، به همین دلیل روش التراسوند سریع‌تر و کامل‌تر از روش پرکولاسیون و سایر روش‌های غرقابی است. کاویتاسیون التراسوند هم چنین سبب کاهش اندازه ذرات می‌شود که سطح تماس را افزایش داده و در نتیجه انتشار حلال در بافت افزایش می یابد. راندمان عصاره گیری در طی ۲۴ ساعت با روش پرکولاسیون تقریباً برابر با ۱۵ دقیقه استخراج با روش اولتراسوند می‌باشد.

در ادامه آزمایش، حلال انتخاب شده براساس بهترین راندمان عصاره گیری و بالاترین مقدارکل ترکیبات فنولیک برای ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی مورد استفاده قرار گرفت. برای استخراج آنتی‌اکسیدان‌ها، حلال های با قطبیت متوسط بهتر از حلال‌های غیرقطبی و یا حلال های با قطبیت بالاست [۷].

۲-٤-۳. اندازه گیری مقدار کل ترکیبات فنولی

مقادیر ترکیبات فنلیک کل در نمونه های عصاره گیاهی توسط روش فولین سیوکالتو اندازه گیری شد. بر طبق این روش، در لوله آزمایش به ۰/۵ میلی لیتر عصاره ها با غلظت ppm ۱۰۰۰ و همچنین محلول های استاندارد گالیک اسید (۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ ppm با سه تکرار) مقدار ۰/۵ میلی لیتر معرف فولین سیوکالتو(رقیق شده با آب مقطر به نسبت ۱ به ۱۰) و نیز ۱/۵ میلی لیتر آب مقطر مخلوط شد و به شدت همزده و بعد از ۵ دقیقه مقدار۱ میلی لیتر کربنات سدیم ۷/۵٪ اضافه و مخلوط شد. بعد از ۲ساعت نگهداری در تاریکی و در دمای محیط آزمایشگاه، جذب نوری آن توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۰ نانومتر قرائت شد. مقادیر فنلیک کل در نمونه های عصاره با استفاده از منحنی استاندارد برحسب میلی گرم گالیک اسید در گرم عصاره خشک بیان شد.

۲-٤-٤. تعیین فعالیت آنتی رادیکالی به روش DPPH (۲و۲- دی فنیل-۱- پیکریل هیدرازیل)

جهت تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی از رادیکال آزاد و پایدار DPPH از شرکت سیگما امریکا استفاده شد. برای این منظور از عصاره های استخراجی در ۴ رقت ۱۰، ۲۰، ۳۰ و۴۰ میکرولیتر استفاده شد، بعلاوه ۳/۵ میلی لیتر معرف DPPH اضافه نموده و در آخر ۲ میلی لیتر کربنات سدیم اضافه، درب بندی و به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد، سپس جذب آنها در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط اسپکتروفتومتری (مدل میلتون، ساخت امریکا) قرائت شد و در نهایت درصد مهار رادیکال های آزاد DPPH با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$$RSC\% = (A_{blank}-A_{sample})/A_{blank}$$

A_{blank} : جذب شاهد (که حاوی ۲ ml آب مقطر در ۲ ml از محلول DPPH می باشد).

A_{sample} : جذب نمونه

در این روش رنگ ارغوانی رادیکالهای آزاد DPPH در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط آنتی‌اکسیدان کاهش یافته و به رنگ زرد تبدیل می‌شود. درجه بی رنگ شدن این ترکیب بیانگر قدرت به دام اندازی رادیکال آزاد توسط آنتی‌اکسیدان مربوطه می‌باشد.

نتایج اعداد به دست آمده به صورت IC_{50} گزارش گردید. IC_{50} غلظتی از عصاره است که میزان جذب نمونه شاهد را که شامل DPPH است به نصف کاهش دهد و یا به عبارتی دیگر فعالیت حذف کنندگی رادیکال بوده و بیانگر فعالیت آنتی‌اکسیدانی و درصد مهارکنندگی است.

۲-٤-۵. روش آماری

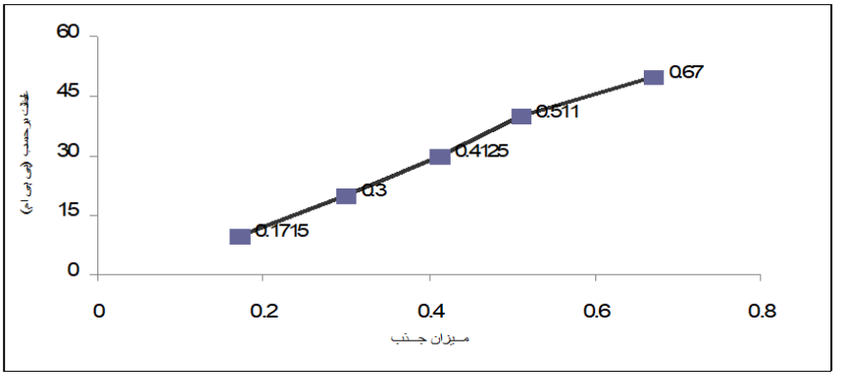
به منظور تعیین اثر حلال و روش استخراج مناسبتر ترکیبات فنولیک، قدرت آنتی رادیکالی و توانایی کیلیت کردن یون آهن با استفاده از معرف‌ها و همچنین برای مقایسه اثر حلال ×زمان، شدت× حلال، شدت× زمان بر روی قدرت رادیکال گیرندگی در سطح $p\leq0.01$ آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. داده ها به کمک نرم افزار SAS (9.1) مورد تجزیه وتحلیل آماری قرار گرفتند.

۳. نتایج و بحث

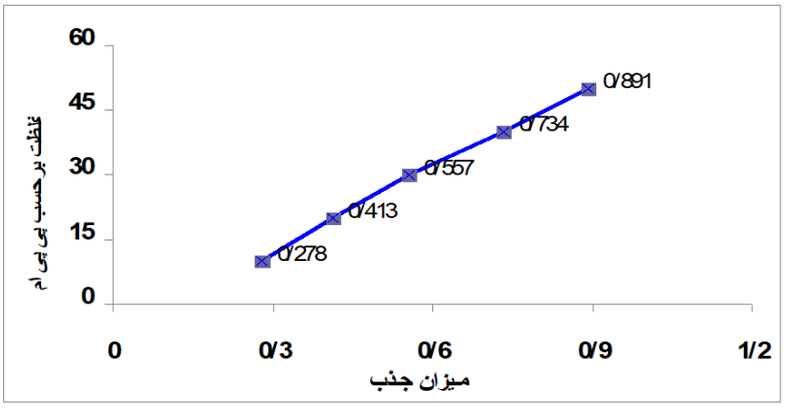
۳-۱. رسم منحنی استاندارد اسیدگالیک

محلولهای استاندارد در غلظت های مختلف اسید گالیک (۱۰، ۲۰ ، ۳۰ ، ۴۰ و ۵۰ ppm در متانول ۶۰ درصد و متانول خالص) تهیه شد. ۱۰۰ میکرولیتر از هر یک از محلول‌ها را در لوله آزمایش وارد کرده و سایر مراحل را بر اساس قسمت قبلی انجام دادیم. آزمون جذب برای هر یک از محلول های استاندارد در سه تکرار انجام شد. منحنی جذب اسید گالیک با توجه به غلظت های ساخته شده رسم شد و سپس مقدار کل ترکیبات فنولی برای هر یک از عصاره‌ها، براساس معادله خط منحنی جذب اسید گالیک محاسبه شد.

منحنی کالیبراسیون ترکیبات فنولی برحسب اسید گالیک با متانول خالص و متانول ۶۰٪ در شکل های۱ و۲ نشان داده شده است. با توجه به معادله رگرسیون بدست آمده برای اسید گالیک در دو حلال متانول ۶۰٪ ($y = 64.48x - 7.051$) و متانول خالص ($y = 82.32x - 3.998$) و با قرار دادن جذب هر یک از عصاره ها در این معادلات، مقدار کل ترکیبات فنولی بر حسب میلی گرم اسید گالیک به ازای ۱ گرم ماده خشک بدست آمد.



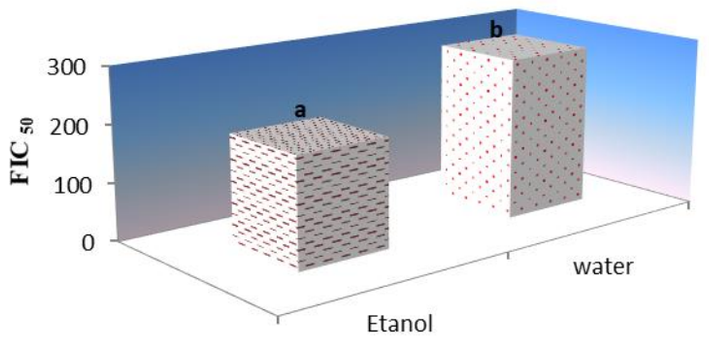
شکل ۱. نمودار اسید گالیک در متانول خالص



شکل۲. نمودار اسید گالیک در متانول ۶۰٪

۳-۲. ترکیبات فنلی حاصل از عصاره پرکولاسیون

اندازه گیری ترکیبات فنولیک با حلال آبی و اتانولی، تأثیر معنی‌دار نوع حلال و نوع روش استخراج را بر میزان ترکیبات فنولیک استخراج شده نشان داد($p<۰/۰۵$). براین اساس می‌توان نتیجه گیری کرد که میزان ترکیبات فنولی عصاره‌های مذکور با افزایش قطبیت حلال افزایش می‌یابد. حلال آب علاوه بر راندمان بالا، ترکیبات فنولی بیشتری را نسبت به حلال اتانولی استخراج کرد (شکل ۳). در واقع حلال آب مواد جامد قابل استخراج بیشتری را در خود حل کرده است اما همه این ترکیبات لزوماً ترکیبات فنولی نیستند.



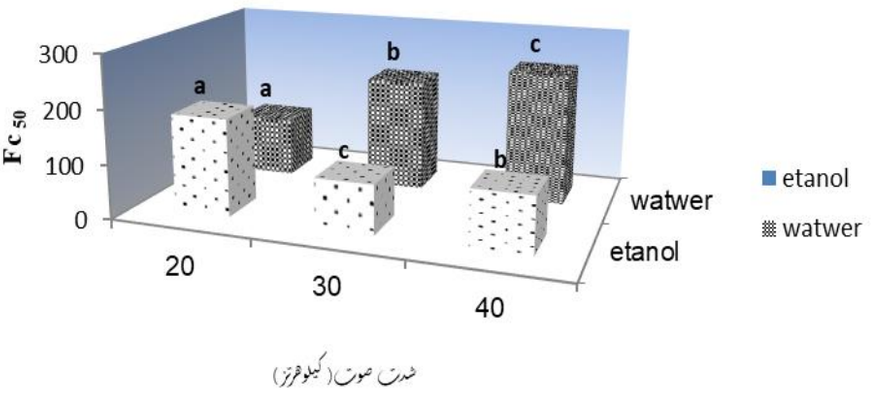
شکل۳. میزان ترکیبات فنولی به روش پرکولاسیون در دو حلال آبی و اتانولی

۳-۳. ترکیبات فنلی حاصل از عصاره التراسوند

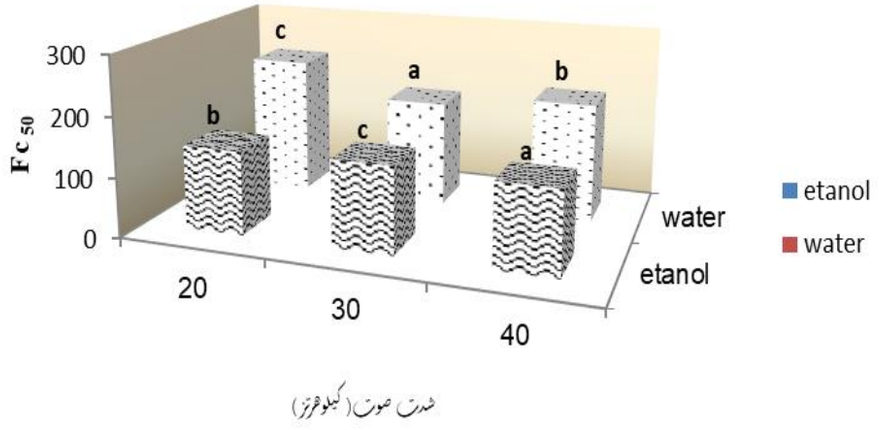
نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر حلال، زمان و شدت بر روی قدرت رادیکال گیرندگی در سطح ۰/۰۵ معنادار است. همچنین اثر متقابل (حلال+زمان) و (حلال+ شدت) و (شدت+ زمان) بر روی قدرت رادیکال گیرندگی$p<۰/۰۵$ معنی دار بوده است. همان طور که در جدول۱ نشان داده شده است، بین دو فاکتور مورد بررسی یعنی استخراج آبی و اتانولی در زمان‌ها و شدت‌های مختلف، تاثیرات معناداری موجود بوده است، بطوریکه اثر شدت های مختلف اولتراسوند در زمان های مختلف بر عصاره اتانولی در

سطح مورد بررسی دارای تغییراتی بود. همچنین با توجه به جدول دانکن، میزان ترکیبات فنولی تفاله انگور در زمان ها و شدت های مختلف تفاوت معنا داری داشت($p<۰/۰۵$).

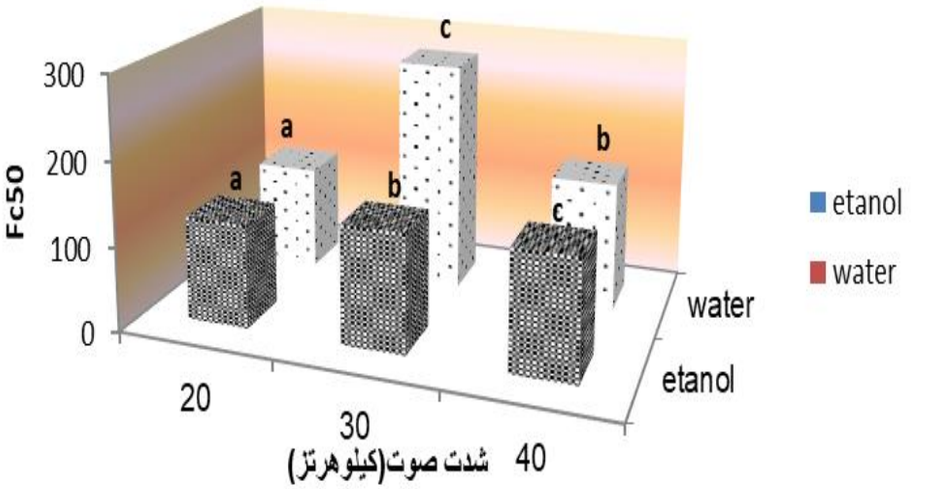
با توجه به جدول ANOVA در زمان ۲۰ دقیقه، با شدت صوت‌های مختلف بیشترین و کمترین میانگین مربوط به شدت ۲۰ و ۳۰ کیلوهرتز بود(به ترتیب ۰/۷±۱۶۲/۵ و ۰/۸۱±۹۲/۳). اما در استفاده از حلال آبی نیز در شدت ها و زمان های مختلف تاثیر معنا داری در سطح مورد بررسی در استخراج عصاره و قدرت فنلی داشت($p <۰/۰۵$). در تاثیرات متقابل زمان× شدت، صوت× نوع حلال(آب)، تفاوت های معنا داری مشاهده شد، بطوریکه در زمان ۲۰ دقیقه در شدت صوت های مختلف بیشترین و کمترین میزان حضور ترکیبات فنلی در شدت ۳۰ و ۲۰ کیلوهرتز بود(۲±۲۱۲/۲۶ و ۲±۱۴۲/۵)(عکس حلال اتانولی)(شکل ۴). در مقایسه میانگین بین دو حلال، همانطور که در شکل۴ نشان داده شده است در زمان ۲۰ دقیقه بیشترین میزان مهارکنندگی مربوط به نمونه اتانولی بوده و در شدت های بالاتر قدرت حلال آبی بالاتر می باشد.



شکل٤. میزان تغییرات Fc_{50} در زمان ۲۰ دقیقه و شدت صوت های



شکل۵. میزان تغییرات Fc_{50} در زمان ۳۰ دقیقه و شدت صوت های مختلف



شکل٦. میزان تغییرات Fc_{50} در زمان ٤٠ دقیقه و شدت صوت های مختلف

مقایسه میانگین تیمارها نشان داد که قدرت رادیکال گیرندگی ۵۰٪ عصاره ها در صورت استفاده از حلال آب نسبت به حلال اتانول بیشتر است. بالاترین قدرت رادیکال گیرندگی در زمان ۴۰ دقیقه و کمترین قدرت رادیکال گیرندگی در ۳۰ دقیقه مشاهده شد. علت اینکه حلال آبی قدرت رادیکال گیرندگی بالاتری نسبت به اتانول دارد این است که استفاده از آب برای استخراج، یک محیط کاملاً قطبی ایجاد می‌کند. در نتیجه برخی از ترکیبات فنولی با درجه قطبیت پائین کمتر استخراج می‌شوند. علاوه بر این عصاره های آبی حاوی ناخالصی‌هایی نظیر اسیدهای آلی، پروتئینها و قندهای محلول می باشند. اما اتانول و متانول همراه با آب توانائی بیشتری در استخراج ترکیبات فنولی دارند. با توجه به این موارد، علت میزان بالای استخراج ترکیبات فنولی در عصاره‌های متانولی نسبت به آب توجیه می‌شود.

عرب و همکاران در سال ۲۰۱۱ عمل استخراج با سه حلال متانول، اتانول، اتیل استات به روی دو رقم سبوس برنج ایرانی فجرو طارم انجام دادند و نتایج آنها نشان دادکه عصاره استخراجی با حلال متانول نسبت به دو حلال اتانول و اتیل استات دارای بازدهی بیشتر و بهتری بوده ومیزان رادیکال گیرندگی عصاره متانولی نیز ۹۳/۹۱ ٪ بوده است.

کالیتراکا و همکاران اثر حلال های مختلف را در استخراج ترکیبات مختلف هسته انگور مورد بررسی قرار دادند. آن ها دریافتند که استون و متانول به ترتیب سبب بیشترین استخراج پروسیانیدین ها و کاتچین ها در هسته انگور می گردند. این ترکیبات از مهم ترین ترکیبات آنتی اکسیدانی و دارای قدرت احیاکنندگی هسته انگور م ی باشند و لذا همانطور که مشاهده میشود سیستم های حلال حاوی استون ومتانول توانسته اند دراستخراج این ترکیبات بهترعمل نمایند.

جایاپراکاشا و همکاران با استخراج عصاره هسته انگور توسط دو سیستم حلال استونی و متانولی دریافتند که سیستم متانولی در مقایسه با سیستم استونی بازده بالاتری داشته ولی در استخراج ترکیبات فنولی ضعیف تر از سیستم استونی عمل می کند. با ثابت بودن پارامتر قطبیت در سیستم های حلال مورد استفاده، نتایج بدست آمده از این پژوهش تأییدی بر یافته های پیشین محققان می باشد.

جدول۱. میانگین ترکیبات فنلی حاصل از دو روش استخراج آبی و اتانولی

فاکتور	زمان	شدت صوت	میانگین
Fc_{50}^{1}	۲۰	۲۰	۱۶۲/۵±۰/۷^{a}
		۳۰	۹۱/۳±۰/۸۱^{c}
		٤۰	۱۰٤/۳±۰/۸۱^{b}
Fc_{50}^{1}	۳۰	۲۰	۱۳۹/٦٦±۰/۸۱^{b}
		۳۰	۱٤٤/۳۳±۰/٤۱^{a}
		٤۰	۱۳۹/٦±۰/۲۱^{b}
Fc_{50}^{1}	٤۰	۲۰	۱۲۲/۷۳±۰/۱^{c}
		۳۰	۲۹۹/٦٦±۰/۰۷^{a}
		٤۰	۲۰۱/۳۳±۰/۱۱^{b}
Fc_{50}^{2}	۲۰	۲۰	۱٤۹/۷۵±۰/۷^{c}
		۳۰	۲۱۲/٦۳±۰/۲۱^{a}
		٤۰	۱۹۱/۲۸±۰/۳^{b}
Fc_{50}^{2}	۳۰	۲۰	۱٦٦/۹۷±۰/۱^{c}
		۳۰	۲۲۹/٤۳±۰/٦۱^{a}
		٤۰	۲۰۹/٦±۰/۰۹^{b}
Fc_{50}^{2}	٤۰	۲۰	۱٤۸/۹۳±۰/۰۰^{a}
		۳۰	۲۱۱/۸±۰/۰۱^{c}
		٤۰	۱۹۰/٤٦±۰/۱۱^{b}

± مقادیر نشان دهنده انحراف معیار است.a-c : میانگین های دارای بالا نویس متفاوت با یکدیگر اختلاف معنی داری (کمتر از ۰/۰۵) دارند. Fc_{50}^{1}: حلال اتانولی.

Fc_{50}^{2}: حلال آبی.

جدول۲. مقایسه میانگین ترکیبات فنلی حاصل از دو روش استخراج آبی و اتانولی

فاکتور		درجه آزادی	Sum of Square	Mean Square	sig
	اثرخطی	۸	۹۴۱۳۵/۴[a]	۱۱۷۶۶۹/۹	۰/۰۰
Fc501	اثر متقابل	۱	۶۷۷۳۸۴/۱[b]	۶۷۸۳۴۸/۱	۰/۰۰
زمان		۲	۳۹۳۵۷/۶[c]	۱۹۶۷۸/۴	۰/۰۰
شدت صوت		۲	۷۰۷۱/۳	۳۵۳۵/۶	۰/۰۰
شدت صوت× زمان		۴	۵۱۷۱۵/۶	۱۲۹۲۸/۹	۰/۰۰
میزان خطا		۲۸	۷۸۲۷۷۸/۷		
	اثرخطی	۴	۲۰۲۶۴/۲[a]	۵۰۶۶/۰۵	۰/۰۱
Fc502	**اثر متقابل**	۱	۹۷۴۹۱۲/۸	۹۷۴۹۱۲/۸	۰/۰۰
زمان		۲	۱۸۶۷/۷	۹۳۳/۸	۰/۰۰
شدت صوت		۲	۱۸۳۹۶/۵	۹۱۹۸/۲	۰/۰۰
شدت صوت× زمان×حلال آبی		۴	۵۱۰۵۵/۳۵	۱۲۷۶۳/۸	۰/۰۰
میزان خطا		۲۸	۱۰۴۶۳۹/۵		

A:R^2= ۰/۹۴ B:R^2= ۰/۹۹ C: R^2= ۰/۸۰ Fc501: حلال اتانولی. Fc502: حلال آبی.

۳-٤. آزمون DPPH (IC_{50}) عصاره التراسوند

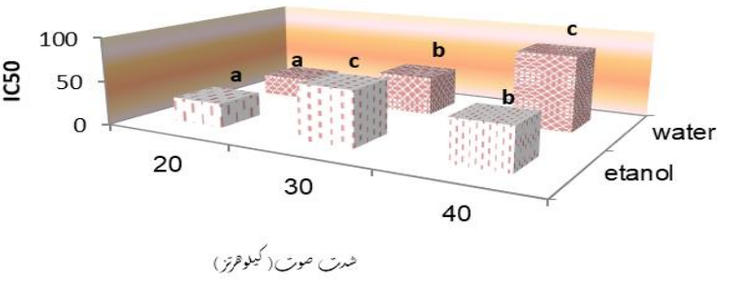
IC_{50} بیانگر غلظتی از عصاره است که برای مهار ۵۰ درصد رادیکالهای آزاد DPPH مورد نیاز می‌باشد. میزان کمتر، نشان دهنده قدرت آنتی اکسیدانی بالاتر عصاره مربوطه می باشد.

در زمان ها و شدت های مختلف، میزان IC_{50} متفاوتی بدست آمد بطوریکه در زمان ۲۰ دقیقه بیشترین قدرت آنتی اکسیدانی مربوط به شدت ۲۰ کیلوهرتز در حلال اتانولی و آبی بود. میزان میانگین به ترتیب۲۶/۸۱ و ۲۴/۶۴ بدست آمد. همچنین در زمان دوم و سوم نیز بیشترین قدرت آنتی اکسیدانی مربوط به شدت ۲۰ کیلوهرتز بود(کمترین میزان در سطح مورد بررسی $p<۰/۰۵$)، میزان IC_{50} در شدت ها و زمان‌های مورد بررسی در شکل های۷، ۸ و ۹ نشان داده شده است.

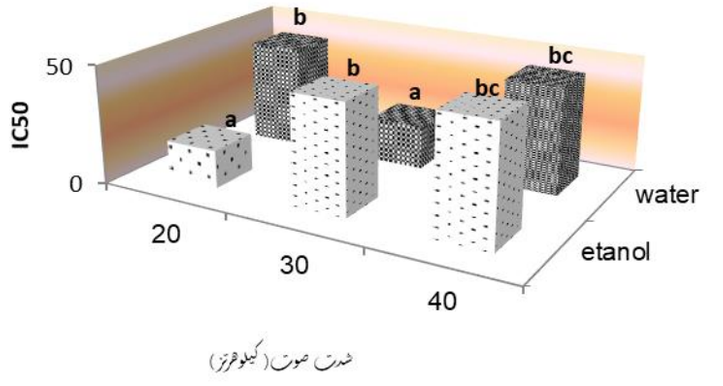
همان طور که در شکل۷ نشان داده شده است، با افزایش شدت صوت، قدرت آنتی اکسیدانی کاهش یافت. نتایج آنتالیز واریانس حاصله نشان داد که با افزایش میزان صوت و تغییر زمان بر روی مهار رادیکالی DPPH تاثیر معناداری در سطح مورد بررسی وجود داشت($P< ۰/۰۵$). بالاترین قدرت رادیکال گیرندگی در زمان ۴۰ دقیقه و کمترین قدرت رادیکال گیرندگی در زمان ۳۰ دقیقه مشاهده شد.

بالاتر بودن فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH را می‌توان به محتوای فنولی عصاره‌ها نسبت داد. در کل، افزایش غلظت ترکیبات فنولی به طورمستقیم میزان توانایی عصاره‌های مختلف را در مهار رایکال آزاد افزایش می‌دهد. در غلظت‌های بالاتر ترکیبات فنولی، به دلیل افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل موجود در محیط واکنش، احتمال اهداء هیدروژن به رادیکال‌های آزاد و به دنبال آن قدرت مهارکنندگی عصاره افزایش می یابد[۸] بنابراین می‌توان احتمال داد که در شدت‌های بالاتر فراصوت امکان تجزیه ترکیبات فنلی وجود دارد.

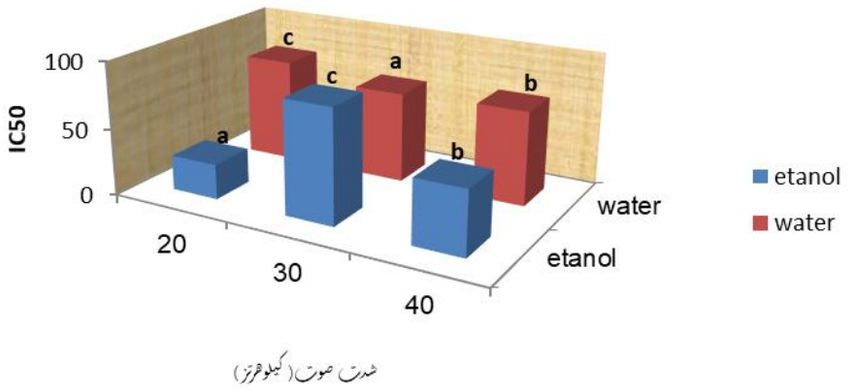
جایاپراکاشا و همکارن فعالیت به دام اندازی رادیکال های آزاد هسته انگور را مورد بررسی قرار دادند و بیان نمودند که عصاره هسته انگور به عنوان یک آنتی اکسیدان اولیه از به وجود آمدن رادیکال های آزاد جلوگیری کرده و نیز با رادیکالهای آزاد واکنش داده و آنها را پایدار می کند.



شکل۷. میزان مهارکنندگی رادیکال های آزاد(DPPH) در شدت های مختلف و در زمان ۲۰ دقیقه



شکل۸. میزان مهارکنندگی رادیکال های آزاد(DPPH) در شدت های مختلف و در زمان ۳۰ دقیقه



شکل۹. میزان مهارکنندگی رادیکال های آزاد(DPPH) در شدت های مختلف و در زمان ٤٠ دقیقه

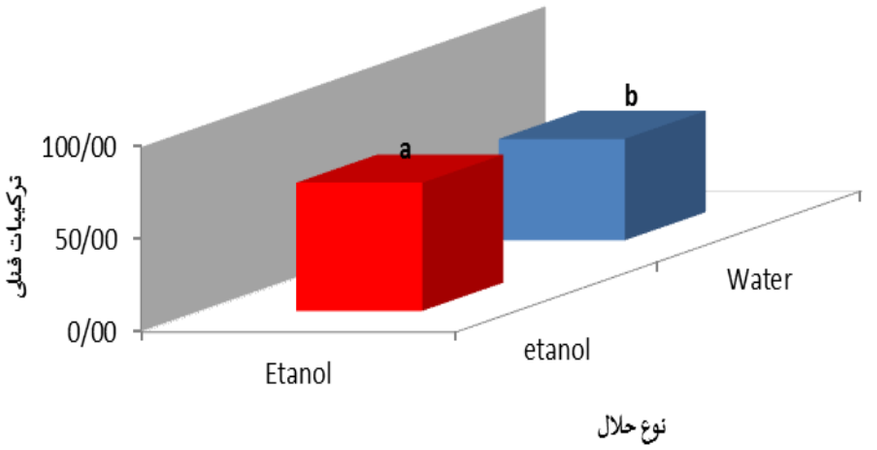
جدول۳. مقایسه میانگین و اثرات خطی و متقابل میزان مهارکنندگی رادیکال های آزاد(DPPH)حاصل از دو روش استخراج آبی و اتانولی

فاکتور		درجه آزادی	Sum of Square	Mean Square	Sig
	اثرات خطی	۸	۱۰٤٤۷/۷[a]	۱۳٤۳/٤	۰/۰۰
$IC50_1$	اثرات متقابل	۸	٥٦۲۸٦/۲	٥٦۲۸٦/۲	۰/۰۰
زمان		۲	۱۱۲٦/۳	٥٦۱/۸	۰/۰۰
شدت صوت		۲	۷۰۷۳/۳	۳٥۳٥/٦	۰/۰۰
شدت صوت× زمان		٤	٥۱۷٦٤/٦	۱۲۹۲۸/۹	۰/۰۰
میزان خطا			٦٦٤۰۱/۱		
	اثرات خطی	۱	۸٥۳٤/٤[b]	۲۱۰۸/۸	۰/۰۰
$IC50_2$	اثرات متقابل	۱	۷٤۸۹۹/۳	۷٤۸۹۹/۳	۰/۰۰
زمان		۲	٥۳۰۳/۷	۲۹۰۱/۸	۰/۰۰
شدت صوت		۲	۲٦۳۱/۷	۱۳۱٥/۸	۰/۰۰
شدت صوت× زمان		٤	٥۱۰٥٥/۳	۱۲۸٦۳/۸	۰/۰۰
میزان خطا		۱۸	۸/٦۷		

R^2: A =۰/۹۴ R^2: B =۰/۹۹ $Fc50_1$:حلال اتانولی. $Fc50_2$: حلال آبی.

۳-۵. آزمون DPPH (IC_{50}) عصاره پرکولاسیون

با توجه به شکل۱۰، میزان مهارکنندگی اتانول بیشتر از آب می‌باشد. بنابراین با توجه به تعریف مهارکنندگی رادیکالی، قدرت آنتی‌اکسیدانی پرکولاسیون آبی بیشتر از اتانولی می‌باشد. اما این روش نسبت به روش اولتراسوند از راندمان پایین تری برخوردار است. با افزایش غلظت ترکیبات فنولی به دلیل افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل موجود در محیط واکنش، احتمال اهداء هیدروژن به رادیکالهای آزاد و به دنبال آن قدرت مهارکنندگی عصاره افزایش یافت. همچنین قابل ذکر است که هر دو تیمارآبی و اتانولی در سطح مورد بررسی دارای اختلافات معناداری می باشند.



شکل ۱۰. میزان مهارکنندگی ترکیبات در دو حلال آبی و اتانولی

٤. نتیجه گیری

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر حلال، زمان و شدت بر روی قدرت رادیکال گیرندگی در سطح ۰/۰۵ معنادار است. همچنین اثر متقابل (حلال +زمان) و (حلال+ شدت) و (شدت+ زمان) بر روی قدرت رادیکال گیرندگی$p<۰/۰۵$ بین دو فاکتور مورد بررسی یعنی استخراج آبی و اتانولی در زمان‌ها و شدت‌های مختلف دارای تاثیرات معنا داری بوده است، بطوریکه اثر شدت های مختلف اولتراسوند در زمان های مختلف بر عصاره اتانولی در سطح مورد بررسی دارای تغییرات معنی‌داری بود.

با توجه به جدول ANOVA در زمان ۲۰ دقیقه، با شدت صوت‌های مختلف، بیشترین و کمترین میانگین مربوط به شدت ۲۰ و ۳۰ کیلوهرتز بود(به ترتیب ۰/۷±۱۶۲/۵ و ۰/۸۱±۹۲/۳) (حلال اتانولی) ودرتاثیرات متقابل زمان× شدت و صوت× نوع حلال(آب)، تفاوت های معناداری مشاهده شد، بطوریکه در زمان ۲۰ دقیقه در شدت صوت‌های مختلف بیشترین و کمترین میزان حضور ترکیبات فنلی در شدت ۳۰ و ۲۰کیلوهرتز بود(۲±۲۱۲/۲۶ و ۲±۱۴۲/۵)(عکس حلال اتانولی). در زمان ۲۰ دقیقه بیشترین میزان مهار کنندگی مربوط به نمونه اتانولی بوده و در شدت‌های بالاتر قدرت حلال آبی بالاتر می باشد.

بررسی نتایج مقدار کل ترکیبات فنولیک عصاره اتانولی و آبی تفاله انگور نشان داد که در هر دو روش پرکولاسیون و اولتراسوند کارایی حلال اتانولی در استخراج این ترکیبات به طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر از حلال آبی است و عصاره اتانولی ترکیبات فنلی بیشتری نسبت به عصاره آبی دارد. با وجود این که حلال آب دارای راندمان عصاره گیری بالاتری نسبت به اتانل است، اما لزوماً این، به معنای استخراج بیشتر ترکیبات فنولیک نمی‌باشد. در حقیقت آب با توجه به قطبیت بالای خود، مواد جامد قابلیت استخراج بیشتری را نسبت به حلال اتانول استخراج کرده ولی حلال اتانول ترکیبات فنولیکی بیشتری را استخراج نموده است.

همچنین نتایج تجزیه واریانس حاکی از آن بود که روش استخراج تاثیر معناداری بر میزان کل ترکیبات فنولیک، بر حسب اسید گالیک دارد بدین صورت که روش اولتراسوند ترکیبات فنولیک بیشتری را نسبت به روش پرکولاسیون استخراج کرده است، استرس برشی حاصل از اولتراسوند باعث شکسته شدن مولکول‌های پلیمری بزرگ و استخراج بهتر ترکیبات فنولیک نسبت به روش پرکولاسیون می شود.

مقایسه میانگین تیمارها نشان داد که قدرت رادیکال گیرندگی ۵۰٪ عصاره‌ها در صورت استفاده از حلال آب نسبت به حلال اتانول بیشتر است. بالاترین قدرت رادیکال گیرندگی در زمان ۴۰ دقیقه و کمترین قدرت رادیکال گیرندگی در ۳۰ دقیقه مشاهده شد. علت اینکه حلال آبی قدرت رادیکال گیرندگی بالاتری نسبت به اتانول دارد این است که استفاده از آب برای استخراج، یک محیط کاملاً قطبی ایجاد میکند. در نتیجه برخی از ترکیبات فنولی با درجه قطبیت پائین کمتر استخراج می شوند. علاوه بر این عصاره های آبی حاوی ناخالصی‌هایی نظیر اسیدهای آلی، پروتئینها و قندهای محلول می‌باشند. اما اتانول و متانول همراه با آب توانائی بیشتری در استخراج ترکیبات فنولی دارند.

در زمان ها و شدت های مختلف میزانIC_{50} متفاوتی بدست آمد بطوریکه در زمان ۲۰ دقیقه بیشترین قدرت آنتی‌اکسیدانی مربوط به شدت ۲۰ کیلوهرتز در حلال اتانولی و آبی بود. میزان میانگین به ترتیب۲۶/۸۱ و ۲۴/۶۴ بدست آمد. همچنین در زمان دوم و سوم نیز بیشترین قدرت آنتی اکسیدانی مربوط به شدت ۲۰ کیلوهرتز بود(کمترین میزان در سطح مورد بررسی($p<۰/۰۵$). نتایج آنتالیز واریانس حاصله نشان داد که با افزایش میزان صوت و تغییر زمان بر روی مهار رادیکالی DPPH تاثیر معنا داری در سطح مورد بررسی داشت($p<۰/۰۵$). بالاترین قدرت رادیکال گیرندگی در زمان ۴۰ دقیقه و کمترین قدرت رادیکال گیرندگی در زمان ۳۰ دقیقه مشاهده شد.

بالاتر بودن فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزادDPPH را می‌توان به محتوای فنولی عصاره‌ها نسبت داد. در کل، افزایش غلظت ترکیبات فنولی به طور مستقیم میزان توانایی عصاره های مختلف را در مهار رایکال آزاد افزایش می‌دهد.

در شدت ۲۰ کیلوهرتز، افزایش زمان استخراج سبب افزایش IC_{50} شد. در حالیکه در شدت ۳۰ و۴۰ کیلو هرتز، افزایش زمان استخراج از ۲۰ به ۳۰ سبب کاهش IC_{50} و از ۲۰ به ۴۰ سبب افزایش IC_{50} گردید. که این میزان افزایش در شدت ۳۰ کیلو هرتز بیشتر از شدت ۴۰ کیلو هرتز بود. بیشترین میزان IC_{50} در شدت ۳۰ کیلو هرتز در زمان ۴۰ دقیقه مشاهده شد.

روند تغییرات اسید گالیک در شدت و زمان های مختلف با روند تغییرات IC_{50} متفاوت بود. به نحویکه در شدت های ۳۰ و۴۰ کیلو هرتز افزایش زمان از ۲۰ به ۳۰ سبب افزایش و از ۳۰ به ۴۰ سبب کاهش GAE شد. بیشترین GAE در شدت ۲۰ و زمان ۴۰ دقیقه مشاهده شد.

۵. مراجع

[1] G.M. William, C.X.Wang, and M. J. Latropoulos, *Food Chem. Toxicol*., 28 (**1990**) 799 -806.

[۲] ع. تفضلی، ج. حکمتی، پ. فیروز. انگور، انتشارات دانشگاه شیراز (**۱۳۷۳**) .

[۳] ش. زمردی، نگهداری، فراوری و کنترل کیفیت انگور، انتشارات سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی ارومیه (**۱۳۸٤**).

[4] Matthäus, B., Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(12) (**2002**) 3444-3452.

[5] Chen, S.H., Huang, T.C., Ho, C.T. and Tsai, P.J., Extraction, analysis, and study on the volatiles in roselle tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*(3) (**1998**) 1101-1105.

[6] Blumberg, L.M., Comprehensive two-dimensional gas chromatography: metrics, potentials, limits. *Journal of Chromatography A*, *985*(1-2) (**2003**) 29-38.

[7] Pokorny, J., Yanishlieva, N. and Gordon, M.. Antioxidant in food . CRC Press . 1st ed. New York, U. S. A. (**2001**), pp 380-391.

[8] Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C. and Jiménez, L., Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, *79*(5) (**2004**) 727-747.