مجله الکترونیک فرآوری و نگهداری مواد غذایی
جلد دوم، شماره سوم، پاییز ۸۹
۵۶-۴۳
http://ejfpp.gau.ac.ir

تعیین محتوای کل ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی و ارزیابی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی اوجی

یحیی مقصودلو[۱]، حدیثه ربیعی[۲] و *علیرضا صادقی‌ماهونک[۳]

[۱]دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آیت‌الله آملی،
[۲]دانشجوی کارشناسی‌ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آیت‌الله آملی،
[۳]استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۲ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۳

چکیده

امروزه به‌دلیل فعالیت ضدرادیکالی شناخته شده ترکیبات گیاهی و مشتقات آن‌ها، توجه بسیار زیادی به افزودن آن‌ها به سامانه‌های غذایی و بیولوژیکی به‌عنوان آنتی‌اکسیدان شده است. گیاه اوجی با نام علمی *Mentha aquatique* از گونه‌های متعلق به خانواده *Labiatae* و جنس نعناع می‌باشد که پراکندگی به‌نسبت وسیعی در مناطق شمالی ایران دارد. در این پژوهش، سنجش میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی کل به روش اسپکتروفتومتری صورت گرفت و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره با آزمون‌های مهار رادیکال‌های آزاد DPPH، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل و قدرت احیاءکنندگی مورد بررسی قرار گرفت و با آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT مقایسه شد. محتوای ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی کل به‌ترتیب ۱/۱±۵۲/۰۵ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم عصاره و ۰/۱۵±۸/۳۳ میلی‌گرم کوئرسیتین بر گرم عصاره بود. کارایی عصاره در هر آزمون متفاوت بود و فعالیت آنتی‌اکسیدانی وابسته به غلظت را نشان داد. مقادیر EC_{50} برای عصاره و BHT در آزمون ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل به‌ترتیب ۷۵ و ۱۳۷/۰۳ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. نتایج این مطالعه به‌خوبی نشان داد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی این سبزی با میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی کل رابطه مستقیم دارد. بدین‌ترتیب می‌توان گیاه اوجی را منبع مناسبی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی معرفی نمود و این اثر را ناشی از حضور ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی آن دانست.

واژه‌های کلیدی: فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فلاونوئیدها، عصاره متانولی، آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی

* مسئول مکاتبه: sadeghiaz@yahoo.com

مقدمه

ارزش تغذیه‌ای محصولات غذایی، طعم، بافت، پذیرش کلی و ثبات نگهداری این محصولات توسط لیپیدها تحت‌تأثیر قرار می‌گیرد. خاصیت غیراشباعی اسیدهای چرب، لیپیدها را در مقابل حمله اکسیژن حساس و آسیب‌پذیر می‌کند و در نتیجه باتغییرات شیمیایی پیچیده‌ای که به وقوع می‌پیوندد در نهایت طعم نامطلوب در ماده غذایی ایجاد می‌شود. علاوه‌بر نقشی که اکسیداسیون لیپید در فساد موادغذایی ایفا می‌کند، اهمیت آن در سلامت انسان به‌ویژه در ایجاد و پیشرفت بیماری‌هایی چون بیماری‌های قلبی- عروقی، تصلب شرایین، سرطان و فرآیند پیری بسیار مورد توجه و مطالعه قرارگرفته است [٤ و ١٩]. استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی و یا طراحی فرمولاسیون مواد غذایی به گونه‌ای که خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن موردنظر باشد بسیار مورد توجه قرار گرفته است تا بتوان بخشی از نیاز انسان امروزی را فراهم نماید. در این بین، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی همچون بوتیلات هیدروکسی تولوئن (BHT)، بوتیلات هیدروکسی آنیزول (BHA)، پروپیل گالات (PG) و ترت بوتیلات هیدروکسی کینون (TBHQ) به‌دلیل اثرات سوء جانبی آن‌ها محدود شده است [٥]. ترکیبات فلاونوئیدی متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که به‌طور گسترده در گیاهان آوندی انباشته شده‌اند. این مولکول‌ها برای تغذیه و سلامت انسان مورد توجه عمده‌ای قرار گرفته‌اند. در واقع این ترکیبات به کیفیت ارگانولیپتیکی فرآورده‌های مشتق شده گیاهی کمک می‌کنند و به‌علاوه نقش مفیدی را در سلامت انسان و جلوگیری از فرآیند پیری سلول نشان داده‌اند [١٢]. عصاره‌های حاصل از میوه‌ها، سبزیجات، غلات و دیگر مواد گیاهی غنی از ترکیبات فنولی، به‌طور فزاینده‌ای در صنعت مواد غذایی مورد توجه قرار گرفته‌اند. زیرا این ترکیبات قادر به تاخیر انداختن اکسیداسیون لیپیدها بوده و از این رو منجر به بهبود کیفیت و ارزش تغذیه‌ای مواد غذایی می‌شوند [١٩]. فعالیت بیولوژیک متنوع فلاونوئیدها و سایر ترکیبات فنولی از جمله اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی، و ضدالتهابی آن‌ها در بسیاری از مطالعات گزارش شده است. میوه‌های مختلف ظرفیت‌های آنتی‌اکسیدانی متفاوتی را براساس میزان پلی‌فنول‌ها، ویتامین‌های C و E، کاروتنوئیدها و فلاونوئیدها نشان داده‌اند [١٦]. همچنین اثبات شده است که منشاء بسیاری از مواد دارویی و درمانی به‌دلیل متابولیسم ثانویه در گیاهان است که ترکیبات فنولی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی و دارویی جزو متابولیت‌های ثانویه گیاهان به‌شمار می‌روند [٩]. بررسی‌ها نشان داده است که دریافت خوراکی آنتی‌اکسیدان‌ها از طریق مواد غذایی نقش مؤثری در حفظ و ارتقاء سلامت دارند. به‌عنوان مثال، ابتلا به بیماری عروق کرونر و برخی از سرطان‌ها با

میزان مصرف غذاهای غنی از پلی‌فنول‌ها رابطه معکوس دارد. این مطالعات منجر به توجه خاص و روز افزون به منابع طبیعی و جدید به‌منظور یافتن مولکول‌های آنتی‌اکسیدان شده است [۲۱، ۱۱].

اوجی یا نعناع قرمز (*Mentha aquatique*) گیاهی از خانواده *Labiatae* و جنس نعناع (*Mentha*) می‌باشد. نعنا قرمز گونه‌ای از نعنا است که در لبه رودخانه‌ها و در جریان آب‌های ملایم و کم‌عمق می‌روید و چون برگ‌های آن قرمز رنگ هستند به این نام خوانده می‌شود. اوجی، گونه‌ای از نعناع بدون کرک یا کرک‌دار با گل‌های آبی و ساقه‌ای ایستاده که کم و بیش پوشیده از کرک‌های برگشته به پایین است که در سرتاسر شمال ایران به حالت خودرو می‌روید [۲]. در گونه *M. aquatica* اسانس روغنی فرار وجود دارد و مقدار اسانس در گیاه قبل از گل کردن ۰/۰۷۹ درصد است که شامل ۵۵ درصد از انواع آلدئیدها می‌باشد. در این گونه، گیاه دارای ۰/۸ درصد اسانس است که شامل ۲۱/٤ درصد از استرها مانند منتیل استات و ۲۸/۵۳ درصد الکل‌های آزاد نظیر مانتول و ۰/۷۷ درصد کتون از جمله مانتون و به‌علاوه ٤۰ درصد منتوفوران است که جزء عمده اسانس را تشکیل می‌دهد [۱]. علی‌رغم پوشش انبوه گیاه اوجی در مناطق شمال کشور، مطالعات اندکی در زمینه ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره فنولی و فلاونوئیدی این سبزی خوراکی بومی صورت گرفته است. از آن‌جایی که اغلب بررسی‌های انجام شده در این زمینه روی اسانس صورت گرفته، بنابراین هدف از این پژوهش، بررسی خواص ضدرادیکالی، قدرت احیاءکنندگی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره متانولی در یک گونه نعناع ایرانی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره: در این پژوهش سبزی اوجی در فروردین‌ماه ۱۳۹۰ از حواشی مناطق مرطوب و جنگلی استان گلستان- گرگان جمع‌آوری گردید. سبزی‌ها پس از شستشو و خشک کردن در آون (Memert- UFE500 ساخت آلمان) با دما ٤۰ درجه سانتی‌گراد، توسط آسیاب صنعتی (توس شکن خراسان، مدل تی ۳۸۰۰)، به‌صورت آرد (تا مش ٤۰) درآمدند. برای تهیه عصاره فنولی از حلال متانول ۵۰ درصد (حجمی: حجمی) استفاده شد. میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر حلال با ۱۰ گرم پودر گیاه مخلوط گردید و به‌مدت ۲٤ ساعت در دما ۲۵ درجه سانتی‌گراد توسط انکوباتور شیکردار (ژال تجهیز- JTSL20) هم زده شد. پس از این مرحله، بخش جامد به‌وسیله کاغذ صافی واتمن شماره یک جدا گردید. عصاره به‌دست آمده به‌وسیله تبخیرکننده چرخشی تحت خلاء (IKA-RV05 Basic ساخت آلمان) در دما

درجه سانتی‌گراد ٤٠ تغلیظ و در نهایت توسط خشک‌کن انجمادی (Operun- FDB550 ساخت کره‌جنوبی) در دمای ٥٠- درجه سانتی‌گراد، خشک و به پودر تبدیل شدند. پودرهای فنولی به‌دست آمده تا زمان استفاده در ظروف غیرقابل نفوذ به هوا و رطوبت در فریزر با دما ١٨- درجه سانتی‌گراد (Whirlpool-WVG301 ساخت آمریکا) نگهداری شدند. همه مواد شیمیایی و حلال‌های مورد استفاده در این پژوهش با درجه خلوص بالا و از شرکت‌های مرک و سیگما تهیه شدند.

اندازه‌گیری میزان کل ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی: مقدار کل ترکیبات فنولی با روش فولین سیوکالتو اندازه‌گیری شد [٢٢]. به‌طور خلاصه ٢٠ میکرولیتر از محلول عصاره با ١/١٦٠ میلی‌لیتر آب مقطر و ١٠٠ میکرولیتر معرف فولین سیوکالتو مخلوط شد. بعد از گذشت ١ تا ٨ دقیقه، ٣٠٠ میکرولیتر محلول کربنات سدیم (٢٠ درصد) به آن‌ها افزوده شد. لوله‌های آزمایش بعد از تکان دادن درون حمام آب با دما ٤٠ درجه سانتی‌گراد قرارگرفته و پس از گذشت ٣٠ دقیقه جذب آن‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر (PG instrument Ltd- T80^{+}) در طول موج ٧٦٠ نانومتر خوانده شد. برای رسم منحنی استاندارد از اسید گالیک استفاده شد. میزان کل ترکیبات فنلی موجود در عصاره بر حسب معادل اسید گالیک و با استفاده از معادله به‌دست آمده از منحنی استاندارد محاسبه و نتایج بر حسب میلی‌گرم اسید گالیک در هر گرم عصاره بیان شد.

برای تعیین میزان کل ترکیبات فلاونوئیدی نیز از روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلرید استفاده شد [٧]. به‌طور خلاصه ٠/٥ میلی‌لیتر از محلول عصاره با ١/٥ میلی‌لیتر اتانول ٩٥ درصد، ٠/١ میلی‌لیتر آلومینیوم کلرید ١٠ درصد، ٠/١ میلی‌لیتر استات پتاسیم ١ مولار و ٢/٨ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط گردید. بعد از گذشت ٣٠ دقیقه نگهداری در دمای اتاق، جذب مخلوط در طول موج ٤١٥ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. کوئرستین به‌عنوان استاندارد برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد و مقدار کل ترکیبات فلاونوئیدی موجود در عصاره بر حسب میلی‌گرم کوئرستین در هر گرم عصاره بیان گردید.

میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH[1]: برای این منظور، محلول‌هایی با غلظت‌های مختلف از پودر فنولی عصاره و نیز آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT در حلال متانول آماده شدند. یک میلی‌لیتر از محلول متانولی DPPH (با غلظت یک میلی‌مولار) به ٣ میلی‌لیتر از عصاره افزوده و مخلوط به‌دست آمده

1- Diphenyl
2- Picrylhydrazyl

به‌شدت هم زده شد. لوله‌های آزمایش به‌مدت ۳۰ دقیقه در محل تاریک قرارگرفتند. بعد از این مدت میزان جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. لازم به ذکر است که در نمونه کنترل، عصاره با ۳ میلی‌لیتر متانول جایگزین شد. در نهایت درصد مهار رادیکال‌های DPPH توسط عصاره با فرمول زیر محاسبه گردید.

درصد مهار رادیکال آزاد $= (A_c-A_s)/Ac\times100$

که در آن، A_c و A_s: به‌ترتیب جذب کنترل و جذب نمونه می‌باشند. EC_{50}: به غلظتی از عصاره اطلاق می‌گردد که در آن ۵۰ درصد از رادیکال‌های آزاد DPPH موجود در محیط واکنش مهار شوند. بنابراین هرچه این غلظت کم‌تر باشد، نشان‌دهنده این است که عصاره موردنظر فعالیت ضدرادیکالی بیش‌تری دارد [۱۸].

ارزیابی قدرت احیاءکنندگی عصاره: در این روش، محلول‌هایی با غلظت‌های مختلف از پودر عصاره فنولی به‌دست آمده از متانول ۵۰ درصد و نیز آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT به‌ترتیب در حلال استخراجی و متانول تهیه گردید. ۱ میلی‌لیتر از محلول عصاره یا آنتی‌اکسیدان سنتزی با ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات (pH=٦/٦ و M=۰/۲) و ۲/۵ میلی‌لیتر پتاسیم فری‌سیانید (۱۰ گرم در لیتر) مخلوط شد و به‌مدت نیم‌ساعت در حمام آب با دما ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس ۲/۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید ۱۰ درصد (وزنی: حجمی) به نمونه‌ها اضافه شد و به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱٦۵۰ g سانتریفوژ (Centurion- K2042 ساخت کانادا) شدند. از محلول روئی پس از سانتریفوژ ۲/۵ میلی‌لیتر به دقت برداشته و پس از افزودن ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر کلرید آهن (III) (۱ گرم در لیتر)، جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۰۰ نانومتر خوانده شد. میزان جذب بالا نشان‌دهنده قدرت احیاءکنندگی بالا عصاره‌ها می‌باشد [۲٦].

ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره: در این روش محلول‌هایی با غلظت‌های مختلف از پودر پودر عصاره فنولی به‌دست آمده از متانول ۵۰ درصد و نیز آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT به‌ترتیب در حلال استخراجی و متانول آماده شدند. ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول عصاره با ۱ میلی‌لیتر از معرف (اسید سولفوریک ۰/٦ مولار، فسفات سدیم ۲۸ میلی‌مولار و آمونیوم مولیبدات ٤ میلی‌مولار) را در لوله اپندورف ریخته و پس از دربندی به‌مدت ۱/۵ ساعت در حمام آب با دما ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از سرد کردن، جذب نمونه‌ها در طول موج ٦۹۵ نانومتر خوانده شد. در نمونه کنترل

به‌جای عصاره از ۰/۱ میلی‌لیتر حلال مصرفی استفاده شد. در این روش، منظور از EC_{50} غلظتی از عصاره است که در طول موج ٦٩٥ نانومتر جذبی معادل ۰/۵ را دارا باشد. بنابراین هرچه این غلظت کم‌تر باشد بیانگر فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتر عصاره است [۱۳].

آنالیز آماری: نتایج به‌دست آمده با استفاده از روش آنالیز واریانس (ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ($P<۰/۰۵$) صورت گرفت. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار SAS و رسم نمودارها با نرم‌افزار Excel انجام شد.

نتایج و بحث

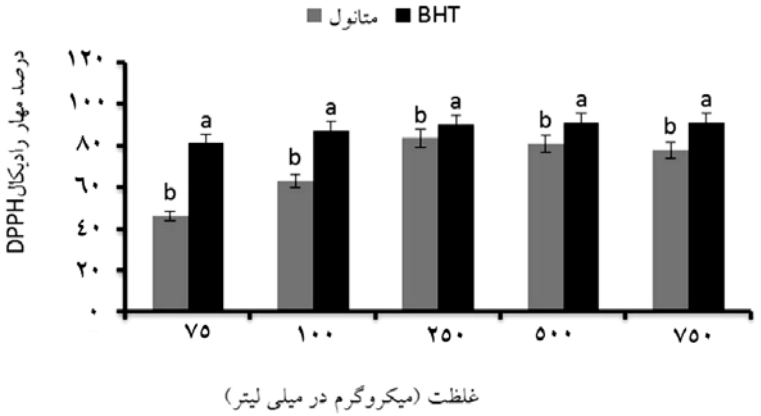
مقدار کل ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی: مقدار کل ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی عصاره متانولی به‌دست آمده از اوجی در جدول ۱ نشان داده شده است. با در نظر گرفتن معادله خط استاندارد گالیک اسید (R^2=۰/۹۹۷) و کوئرسیتین (R^2=۰/۹۹۹)، مقدار کل ترکیبات فنولی و فلا نوئیدی عصاره تعیین گردید. همان‌طورکه در جدول مشاهده می‌شود، این عصاره حاوی مقادیر بالایی از ترکیبات فلاونوئیدی است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت، بخش قابل‌ملاحظه‌ای از فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره احتمالاً مربوط به ترکیبات فلاونوئیدی آن‌ها خواهد بود. قابلیت استخراج ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات در عصاره خام به فاکتورهای زیادی از جمله قطبیت و pH حلال‌ها، زمان و دما استخراج و نیز نوع و ساختار شیمیایی ترکیبات فنولی بستگی دارد [۸].

جدول ۱- مقدار کل ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و بازدهی استخراج عصاره متانولی اوجی.

عصاره	مقدار کل ترکیبات فنولی (میلی‌گرم گالیک اسید/گرم عصاره)	مقدار کل ترکیبات فلاونوئیدی (میلی‌گرم کوئرسیتین/گرم عصاره)	بازدهی استخراج (درصد)
متانول ۵۰ درصد	۵۲/۰۵ ± ۱/۱	۸/۳۳ ± ۰/۱۵	۱۷/٤۲

نتایج به‌دست آمده از بررسی‌های انجام شده بر میزان استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی با حلال‌های مختلف از بافت‌های گیاهی، بیانگر وجود مقادیر بالایی از این ترکیبات در عصاره متانولی بود [۲۱،۱۷]. در بررسی میزان بازده استخراج و فنول کل عصاره‌های متانولی، استونی و آبی برگ‌های شاه‌توت، بیش‌ترین میزان بازدهی استخراج (۱۲/۳۵ درصد) و فنول کل (۹/۳۲ گرم گالیک اسید در ۱۰۰ گرم عصاره) به عصاره متانولی تعلق داشت [٦].

فعالیت به دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد DPPH: اندازه‌گیری میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH یکی از روش‌های معتبر، دقیق و آسان می‌باشد که در بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی در شرایط آزمایشگاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد. ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی به‌دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی از جمله ترکیبات مهم گیاهی محسوب می‌شوند که نقش مهمی در حذف رادیکال‌های آزاد و جلوگیری از تبدیل هیدروپراکسیدها به رادیکال‌های آزاد را دارند [۲۰]. درصد مهارکنندگی غلظت‌های مختلف عصاره متانولی در شکل ۱ نشان داده شده است. همان‌طورکه مشاهده می‌شود با افزایش غلظت در عصاره، فعالیت ضدرادیکالی افزایش می‌یابد. در تمامی غلظت‌های مورد بررسی عصاره متانولی و آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT در سطح احتمال ۰/۰۵ اختلاف معنی‌داری با هم داشتند. در محدوده غلظت ۷۵۰–۷۵ میکروگرم در میلی‌لیتر، آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT فعالیت ضدرادیکالی بالاتری نسبت به عصاره‌های فنولی اوجی داشت. در غلظت ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، عصاره فنولی اوجی دارای بالاترین فعالیت ضدرادیکالی (۸۳/۵۳ درصد) بود. در کل، افزایش غلظت ترکیبات فنولی به‌طور مستقیم میزان توانایی عصاره‌های مختلف را در مهار رایکال آزاد افزایش می‌دهد [۱۵]. در غلظت‌های بالاتر ترکیبات فنولی، به‌دلیل افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل موجود در محیط واکنش، احتمال اهداء هیدروژن به رادیکال‌های آزاد و به‌دنبال آن قدرت مهارکنندگی عصاره افزایش می‌یابد [۱۰]. فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولی به تعداد گروه هیدروکسیل در حلقه آروماتیک آن‌ها بستگی دارد [۲۷].

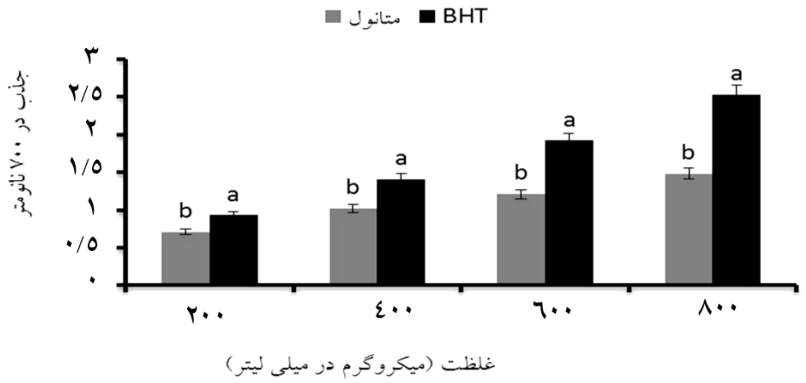


شکل ۱- مقایسه میانگین درصد مهار رادیکال‌های DPPH در غلظت‌های مختلف عصاره متانولی گیاه اوجی و آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT (حروف غیر مشابه در هر غلظت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است).

معمولاً برای مقایسه فعالیت ضدرادیکالی عصاره‌های مختلف از فاکتوری تحت عنوان EC_{50}[1] استفاده می‌شود. طبق تعریف EC_{50} به غلظتی از عصاره اطلاق می‌گردد که در آن ۵۰ درصد از رادیکال‌های آزاد DPPH موجود در محیط واکنش مهار شوند. بنابراین هرچه این غلظت کم‌تر باشد، نشان‌دهنده این است که عصاره مورد نظر فعالیت ضدرادیکالی بیش‌تری دارد. در این بررسی نیز مقدار EC_{50} برای عصاره متانولی اوجی تعیین و با آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT مقایسه گردید (جدول ۲). همانطورکه در جدول دیده می‌شود، کم‌ترین میزان EC_{50} متعلق به BHT بود. نتایج به‌دست آمده از بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های آبی، استونی و متانولی مارچوبه نشان داد، عصاره‌های استونی و متانولی نسبت به عصاره آبی فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری داشتند که این فعالیت با مقدار فلاونوئیدهای آن‌ها ارتباط مستقیمی داشت [۲۳]. همچنین در پژوهشی دیگر، نتایج به‌دست آمده از بررسی فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH توسط عصاره اتانولی ۷۰ درصد برگ خرمالو بیانگر آن بود که با افزایش غلظت عصاره از ۵۰۰-۱۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر، اثرات مهارکنندگی قابل‌توجهی مشاهده شد اما این تأثیر از نمونه کنترل روتین پایین‌تر بود. در این آزمون، فعالیت آنتی‌اکسیدانی خوب عصاره بر مهار رادیکال آزاد DPPH به نقش مستقیم عصاره در به دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد با اهداء یک اتم هیدروژن نسبت داده می‌شود. ترکیبات این عصاره توانایی اهداء الکترون‌ها را به رادیکال‌های آزاد فعال دارا بوده و در نتیجه واکنش زنجیره‌ای رادیکال آزاد را به پایان می‌رسانند [۲٤]. یافته‌های به‌دست آمده توسط سایر محققان بیانگر آن است که بین مقدار ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی عصاره‌های گیاهی با فعالیت ضدرادیکالی آن‌ها ارتباط مستقیم وجود دارد. این یافته‌ها نتایج این پژوهش را تأیید می‌نماید.

قدرت احیاءکنندگی آهن: روش احیاء آهن، روشی سریع و مناسب برای اندازه‌گیری قدرت احیاءکنندگی عصاره‌های گیاهی و ترکیبات شیمیایی است و می‌تواند به‌عنوان شاخصی از قدرت آنتی‌اکسیدانی مورد استفاده قرار گیرد. نتایج به‌دست آمده از قدرت احیاءکنندگی آهن توسط عصاره متانولی و آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT در شکل ۲ نشان داده شده است. در این آزمون با افزایش غلظت، میزان جذب نور افزایش یافته است که بیانگر افزایش در قدرت احیاءکنندگی و در نتیجه قدرت آنتی‌اکسیدانی غلظت‌های مورد استفاده می‌باشد.

1- Effective concentration

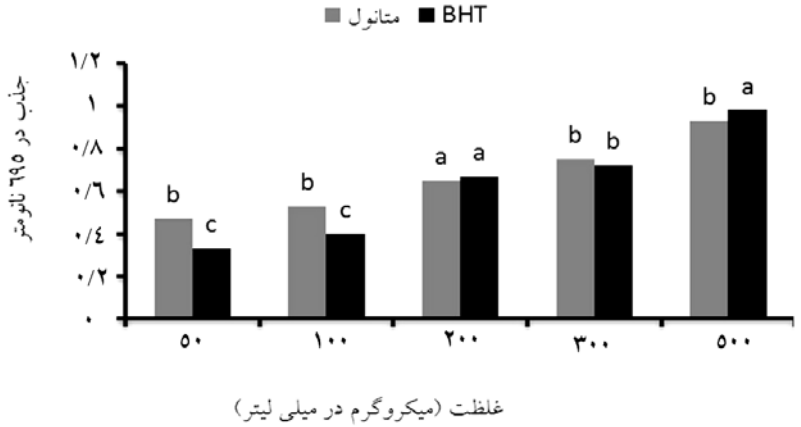


شکل ۲- مقایسه میانگین قدرت احیاءکنندگی غلظت‌های مختلف عصاره متانولی گیاه اوجی و آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT (حروف غیرمشابه در هر غلظت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است).

مقایسه میانگین تیمارها نشان داد که در تمامی غلظت‌های مورد بررسی آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT از نظر قدرت احیاءکنندگی عملکرد بهتری نسبت به عصاره متانولی داشت. خاصیت احیاءکنندگی برگ‌های اوجی ناشی از حضور ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی است. در بررسی عصاره متانولی برگ‌های شاه‌توت، نتایج بیانگر آن بود که عصاره متانولی با بالاترین مقدار ترکیبات فنولی کل دارای بالاترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در آزمون‌های مهار رادیکال آزاد DPPH، قدرت احیاءکنندگی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل بود، اما از این نظر قابل رقابت با آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT نبود [٦]. داده‌های به‌دست آمده از بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های برگ‌های کنگر نشان داد، فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره به‌شدت به غلظت عصاره وابسته است و با افزایش غلظت عصاره، فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش می‌یابد و بعد از آن تقریباً ثابت باقی می‌ماند. این عصاره قدرت احیاءکنندگی و توان کم‌تری در مهار رادیکال DPPH نسبت به BHT، آلفا- توکوفرول و اسید آسکوربیک نشان داد [۳].

ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل: روش فسفومولیبندیوم روش کمی برای ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدان‌های محلول در آب و محلول در چربی (ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل) می‌باشد. این روش بر مبنا احیا مولیبدن ٦ ظرفیتی به مولیبدن ۵ ظرفیتی در محیط اسیدی می‌باشد که با تشکیل کمپلکس سبز رنگ فسفومولیبدن با بیشینه جذب در ٦۹۵ نانومتر همراه است. شکل ۳ نتایج به‌دست آمده از آنالیز واریانس بین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره اوجی و آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT را نشان می‌دهد.

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره وابسته به غلظت بود؛ به‌طوری‌که با افزایش غلظت، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل نیز به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) افزایش یافت. عصاره اوجی در غلظت‌های پایین (۱۰۰ و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل بالاتری از آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT داشت و در سطح احتمال ۵ درصد قابل رقابت با آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT بود. همچنین در غلظت‌های ۳۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر با آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT از لحاظ ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل تفاوت معنی‌داری نشان نداد. نتایج به‌دست آمده بیانگر آن است که غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر می‌تواند به‌عنوان غلظت بحرانی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ‌های اوجی در نظر گرفته شود.



شکل ۳- مقایسه میانگین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل غلظت‌های مختلف عصاره متانولی گیاه اوجی و آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT (حروف غیرمشابه در هر غلظت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است).

در این آزمون نیز مقدار EC_{50} برای عصاره متانولی اوجی تعیین و با آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT مقایسه گردید (جدول ۲). همان‌طورکه در جدول دیده می‌شود، کم‌ترین میزان EC_{50} متعلق به‌عصاره متانولی بود. این نتایج بیانگر حضور ترکیبات آنتی‌اکسیدانی لیپوفیل و هیدروفیل در گیاه اوجی است. نتایج سایر محققان نیز نشان داد، وجود مقادیر بیش‌تری از ترکیبات فنولی در عصاره با ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بالا آن مرتبط است [۱٤ و ۲٤].

جدول ۲- مقادیر EC_{50} عصاره‌ها و آنتی‌اکسیدان سنتزی در روش‌های مختلف ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی.

نمونه	EC_{50} (میکروگرم در میلی‌لیتر)	
	مهار رادیکال‌های آزاد	ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل
عصاره متانولی	۸۰/۸۹[a]	۷۵[b]
BHT	۳۷/۱۷[b]	۱۳۷/۰۳[a]

حروف غیر مشابه در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است.

نتایج به‌دست آمده از این بررسی نشان داد، عصاره متانولی اوجی در آزمون ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در مقایسه با آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT در غلظت‌های پایین عملکرد بهتری دارد و از این نظر قابل رقابت با BHT است. فعالیت آنتی‌اکسیدانی این عصاره، رابطه مستقیم با مقدار ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی نشان داد. با در نظر گرفتن فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالقوه و وجود مقادیر بالا از فلاونوئیدها در گیاه اوجی، این گیاه را می‌توان به موادغذایی مختلف به‌جای آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی برای به تاخیر انداختن پراکسیداسیون لیپید اضافه نمود.

منابع

۱- زارع‌آبادی، س.، اسرار، ز.، و مهربانی، م. ۱۳۸۹. تغییرات بیوشیمیایی میزان ترپنوییدهای موجود در اسانس گیاه دارویی نعناع سبز (*Mentha spicata* L.) در پاسخ به تیمار مقدار اضافی روی (Zn). مجله زیست‌شناسی گیاهی ایران، ۲۵، ۱-۳٤.

۲- قهرمان، ا. ۱۳۷۲. کروموفیت‌های ایران (سیستماتیک گیاهی). مرکز نشر دانشگاهی تهران.

3.Adesegun, S.A., Fajana, A., Orabueze, C.I., and Coker, H.A.B. 2009. Evaluation of Antioxidant Properties of Phaulopsis fascisepala C.B.Cl. (Acanthaceae). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 6 (2), 227-231.

4.Ahmadi, F., Kadivar, M., and Shahedi, M. 2007. Antioxidant activity of Kelussia odoratissima Mozaff in model and food systems. *Food Chemistry*, 105, 57-64.

5.Anagnostopoulou, M.A., Kefalas, P., Papageorgiou, V.P., Assimepoulou, A.N., and Boskou, D. 2006. Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*). *Food Chemistry*, 94, 19-25.

6.Arabshahi-D, S., and Urooj, A. 2007. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. *Food Chemistry*, 102, 1233-1240.

7.Chang, C., Yang, M., Wen, H., and Chern, J. 2002. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *Food and Drug Analysis*, 10, 178-182.

8.Liu, Q., and Yao, H. 2007. Antioxidant activity of barley seeds extracts. *Food Chemistry*, 102, 732-737.
9.Maganha, E.G., Halmenschlager, R.C., Rosa, R.M., Henriques, J.A.P., Ramos, A.L.L.P., and Saffi, J. 2010. Pharmacological evidences for the extracts and secondary metabolites from plants of the genus Hibiscus. *Food Chemistry*, 118 (1), 1-10.
10.Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., and Jimenez, L. 2004. Polyphenol: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727-747.
11.Muanda, F.N., Soulimani, R., Diop, B., and Dicko, A. 2011. Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extracts from Stevia rebaudiana Bertoni leaves. *LWT- Food Science and Technology*, 44, 1865-1872.
12.Naczk, M., and Shahidi, F. 2004. Review Extraction and analysis of phenolics in food. *Chromatography A*, 1054, 95-111.
13.Prieto, P., Pineda, M., and Aguilar, M. 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269, 337-341.
14.Sahreen, S., Rashid Khan, M., and Ali Khan, R. 2010. Evaluation of antioxidant activities of various solvent extracts of Carissa opaca fruits. *Food Chemistry*, 122, 1205-1211.
15.Sanchez- Moreno, C., Larrauri, J.A., and Saura- Calixto, F. 1999. Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, prape juices and related polyphenolic constituents. *Food Research International*, 32, 407-412.
16.Saura-Calixto, F., and Goni, I. 2006. Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. *Food Chemistry*, 94, 442-447.
17.Sharififar, F., Dehghn-Nudeh, G., and Mirtajaldini, M. 2009. Major flavonoids with antioxidant activity from Teucrium polium L. *Food Chemistry*, 112, 885-888.
18.Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., and Nakamura, T. 1992. Antioxidative properties of xanthin on autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Agricultural and Food Chemistry*, 40, 945-948.
19.Shukla, Sh., Mehta, A., Bajpai, V.K., and Shukla, S. 2009. In vitro antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of Stevia rebaudiana Bert. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 2338-2343.
20.Singh, S., and Shingh, R.P. 2008. In vitro methods of assay of antioxidants: an overview. *Food Reviews International*, 24, 394-415.
21.Škerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Rižner Hraš, A., Simoniĉ, M., and Knez, Ž. 2005. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 89, 191-198.

22. Slinkard, K., and Singleton, VL. 1977. Total phenol analysis; automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28, 49-55.
23. Sun, T., Powers, J.R., and Tang, J. 2007. Evaluation of the antioxidant activity of asparagus, broccoli and their juices. *Food Chemistry*, 105 (1): 101-106.
24. Sun, L., Zhang, J., Lu, X., Zhang, L., and Zhang, Y. 2011. Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 2689-2696.
25. Tadhani, M.B., Patel, V.H., and Subhash, R. 2007. In vitro antioxidant activities of Stevia rebaudiana leaves and callus. *Food Composition and Analysis*, 20, 323-329.
26. Yildirim, A., Mavi, A., and Kara, A.A. 2001. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4083-4089.
27. Zhang, Z., Liao, L., Moore, J., Wu, T., and Wang, Z. 2009. Antioxidant phenolic compounds from walnut kernels (*Juglans regia* L.). *Food Chemistry*, 113 (1), 160-165.

Iranian Association of Food Scientists and Technologists

EJFPP, Vol. 2 (3): 43-56
http://ejfpp.gau.ac.ir

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Determination of total phenolic and flavonoid contents and antioxidant properties of methanolic extract of *Mentha aquatique*

Y. Maghsoudlou[1], H. Rabiee[2] and *A.R. Sadeghi Mahoonak[3]

[1]Associate Prof., Dept. of Food Science and Technology, Islamic Azad University, Ayatollah Amoli Branch, [2]M.Sc. Student, Dept.of Food Science and Technology, Islamic Azad University, Ayatollah Amoli Branch, [3]Assistant Prof., Dept. of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Received: 2012-02; Accepted: 2012-05

Abstract

Today, the use of plant compounds and their derivatives as antioxidants in food and biological systems has been extensively studied in different part of world. *Mentha aquatique* belongs to the *Labiatae* family and the genus *Mentha* and widely found in the north part of Iran. In this study, total Phenolic and flavonoid contents of *Mentha aquatique* were measured spectrophotometrically and the antioxidant capacity of its methanolic extract were assessed by DPPH radical-scavenging activity, total antioxidant capacity and reducing power assay and were compared with synthetic antioxidant BHT. Total phenolic and flavonoid contents were 52.05±1.1 mg gallic acid eguivalents (GAE)/g extract and 8.33±0.15 mg quercetin eguivalents (QE)/g extract, respectively. The extract showed varying degrees of efficacy in each assay in a dose-dependent manner. The EC_{50} values of the extract and BHT were 75 and 137.03 µg/ml, respectively. The results of this study showed a good antioxidant activity of the extract and the antioxidant activity showed direct relation with total phenolic and flavonoid compounds. Thus the *Mentha aquatique* can be used as a good source of natural antioxidants and can be used in food industry.

Keywords: Antioxidant activity; Flavonoids; Methanolic extract; Natural antioxidants

* Corresponding Author; Email: sadeghiaz@yahoo.com