

بررسی و مقایسه عملکرد آنتی‌اکسیدانتی و تعیین محتوای تام فنلی اسانس و عصاره الکلی-آبی گیاه اناریجه (*Pimpinella Affinis*)

فاطمه اسماعیلی^۱، حسین تاجیک^۲، تورج مهدی زاده^۳، مهسا مایلی^۴

تاریخ دریافت ۱۳۹۶/۰۲/۰۳ تاریخ پذیرش ۱۳۹۶/۰۴/۰۱

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: امروزه با توجه به اثرات نامطلوب آنتی‌اکسیدانت‌های سنتزی، تمایل زیادی به استفاده از گیاهان به دلیل دارا بودن خواص آنتی‌اکسیدانتی وجود دارد. این مطالعه نیز، باهدف بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانتی گیاه اناریجه (*Pimpinella affinis*) به‌عنوان جایگزینی برای آنتی‌اکسیدانت‌های سنتزی انجام گردید.

مواد و روش کار: محتوای تام فنلی با استفاده از روش فولین سیوکالتو اندازه‌گیری شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانتی اسانس و عصاره آبی - الکلی در غلظت‌های مختلف با استفاده از سه روش، مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS و ارزیابی قدرت احیاکنندگی در مقایسه با BHT مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: میزان فنل کل اسانس و عصاره اناریجه به ترتیب برابر با $53/14 \pm 4/25$ و $37/68 \pm 1/12$ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم عصاره بود. در روش DPPH عصاره اثر مهار قابل‌توجهی از خود نشان داد و اختلاف معنی‌داری با اسانس داشت ($p \leq 0/05$). در ارزیابی قدرت احیاکنندگی نیز با افزایش غلظت اسانس و عصاره، شاهد افزایش در قدرت احیاکنندگی آهن بودیم. در آزمون ABTS بیشترین فعالیت آنتی‌رادیکالی اسانس و عصاره مربوط به غلظت ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اناریجه به ترتیب با درصد بازدارندگی ۲۴ درصد و ۹۲ درصد بود که در مقایسه با BHT بازدارندگی کم‌تری نشان دادند.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه نشان داد که اسانس و عصاره الکلی-آبی اناریجه دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانتی بوده و پس از انجام تحقیقات جامع‌تر می‌توانند در صنایع غذایی و دارویی مورد استفاده واقع شوند.

کلیدواژه‌ها: اناریجه، اسانس، اثرات آنتی‌اکسیدانتی، عصاره الکلی آبی، فنل کل

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و هشتم، شماره پنجم، ص ۳۲۰-۳۱۱، مرداد ۱۳۹۶

آدرس مکاتبه: ارومیه، پردیس نازلو، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی. تلفن: ۰۴۴۳۱۹۴۲۶۷۳

Email: T.mehdizadeh@urmia.ac.ir

مقدمه

استفاده از آنتی‌اکسیدانت‌ها که ترکیباتی هستند که از طریق واکنش با رادیکال‌های آزاد آن‌ها را خنثی می‌کنند و در نتیجه سبب جلوگیری یا کاهش اثرات مخرب آن‌ها در بدن می‌شوند، برای مهار شکل‌گیری یا کاهش اثرات این ترکیبات، ضروری به نظر می‌رسد. آنتی‌اکسیدانت‌ها می‌توانند سنتزی یا با منشأ طبیعی باشند (۱). اخیراً استفاده از افزودنی‌های سنتتیک از جمله بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT)، بوتیل هیدروکسی آنیزول (BHA) و تری بوتیل هیدروکینون (TBHQ) در محصولات غذایی، به دلیل اثرات نامطلوبی که بر سلامتی دارند دارای محدودیت می‌باشد و به همین دلیل تمایل

بیماری‌های مزمن در جهان به‌سرعت در حال افزایش می‌باشد. رادیکال‌های آزاد که با مولکول‌های زیستی مانند پروتئین‌ها و DNA و ... واکنش می‌دهند منجر به بیماری‌هایی مزمن همچون سرطان و دیابت می‌گردند (۱). علاوه بر تأثیر رادیکال‌های آزاد بر بیومولکول‌ها، این ترکیبات از جمله عوامل مهم اکسیدکننده مواد غذایی خصوصاً چربی‌ها و روغن‌ها بوده (۲) و باعث اثرات نامطلوب ارگانولپتیکی و از بین رفتن ویتامین‌ها و اسیدهای چرب ضروری می‌شوند. از طرفی با توجه به تأثیر نامطلوب چربی اکسیدشده بر سلامت انسان (۳، ۴)،

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

^۲ استادیار، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

^۳ استاد، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه (نویسنده مسئول)

^۴ دانشجوی کارشناسی ارشد بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

ناریجه از جمله گیاهان پراکنده، بومی و دسترس در ایران بوده و به صورت سنتی به عنوان گیاه دارویی و طعم‌دهنده مورد استفاده قرار می‌گیرد، لذا با در نظر گرفتن این مهم و اینکه اطلاعات کمی در خصوص خواص آنتی‌اکسیدانتی اسانس گیاه ناریجه و مقایسه آن با روش‌های مختلف با عصاره گزارش شده بنابراین لزوم توجه و بررسی مقایسه‌ای دقیق علمی آن از نکته نظر استفاده کاربردی آن حائز اهمیت می‌باشد. لذا این مطالعه باهدف بررسی و مقایسه اثر آنتی‌اکسیدانتی اسانس و عصاره آبی-الکلی گیاه ناریجه در شرایط آزمایشگاهی با روش‌های مختلف انجام گرفته است.

مواد و روش کار

مواد شیمیایی: تمام مواد شیمیایی، حلال‌ها و معرف مورد استفاده از شرکت مرک (آلمان) و سیگما (آمریکا) خریداری شدند.

تهیه نمونه گیاه و استخراج اسانس: گیاه ناریجه در فصل بهار از شهر آمل جمع‌آوری شده و تشخیص گیاه موردنظر توسط گیاه‌شناس انجام گرفت. اندام‌های هوایی گیاه پس از شستشو و خشک کردن در سایه جهت اسانس‌گیری با روش تقطیر با آب و توسط دستگاه کلونجر به مدت ۲ ساعت مورد استفاده قرار گرفت.

تهیه عصاره آبی-الکلی: ساقه و برگ گیاه در سایه و دمای محیط خشک گردید. سپس توسط آسیاب به صورت پودر درآمده و از الک به اندازه ۶۰ مش^۲ عبور داده شد. ۲۰۰ گرم پودر در یک لیتر اتانول خالص و آب به نسبت ۷۰ به ۳۰ حل شده و به مدت ۲۴ ساعت در روتاری شیکر با دور ۱۵۰ Rpm قرار داده شد و بعد از آن از کاغذ واتمن شماره ۴۱ عبور داده شد و سپس برای حذف حداقل ۹۰ درصد حلال در دستگاه روتاری قرار گرفت و در نهایت برای تغلیظ نهایی در آون ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و تا زمان انجام آزمایش در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

اندازه‌گیری ترکیبات فنلی:

به منظور بررسی محتوای تام فنلی گیاه از روش فولین سیوکالتو^۳ استفاده شد. در این روش محلول فولین سیوکالتو به عنوان معرف و اسید گالیک که یک نوع اسید فنولی می‌باشد به عنوان استاندارد جهت رسم منحنی استفاده شد. به این صورت که غلظت‌های مختلف اسانس و عصاره گیاه و گالیک اسید تهیه شد. سپس به ۵۰۰ میکرولیتر از آن، آب مقطر، معرف فولین سیوکالتو و سدیم کربنات (۷/۵ درصد) اضافه گردید. بعد از گذشت ۱۲۰ دقیقه میزان جذب نوری نمونه‌ها در مقایسه با شاهد، توسط دستگاه

زیادی به استفاده از آنتی‌اکسیدانت‌های طبیعی به منظور حفظ مواد غذایی وجود دارد (۵-۹). گیاهان دارای مواد شیمیایی نظیر فلاونوئیدها، تانن، اسیدهای فنولیک، ترپنوئیدها بوده که منبع بالقوه‌ای از آنتی‌اکسیدانت‌های طبیعی به شمار می‌روند. این ترکیبات آنتی‌اکسیدانتی دارای فعالیت ضدالتهابی و ضد سرطانی می‌باشند (۱۰، ۱۱). در سال‌های اخیر مطالعات زیادی در مورد بسیاری از منابع آنتی‌اکسیدانتی با منشأ گیاهی انجام شده است. از میان این آنتی‌اکسیدان‌ها، ترکیبات مستخرج از بسیاری از گیاهان معطر نشان داده‌اند که در به تأخیر انداختن روند پراکسیداسیون لیپیدی در روغن و غذاهای چرب مؤثر بوده و همین امر توجه محققان زیادی را برای شناسایی این آنتی‌اکسیدانت‌های طبیعی به خود معطوف ساخته است (۹). گیاه ناریجه با نام علمی *Pimpinella affinis*^۱ در ایران قسمت‌های شمال، شمال غرب، غرب، مرکز و شمال شرق پراکنده است. ناریجه از خانواده چتریان است (۱۲). ناریجه از جمله گیاهان دارای خواص آنتی‌اکسیدانتی می‌باشد (۱۳). در طب سنتی نیز نقش این گیاه به عنوان ضد نفخ، ضد عفونی‌کننده، ضد اسپاسم و ادرارآور به اثبات رسیده است (۱۴). همچنین این گیاه دارای خاصیت ضد سرطانی نیز می‌باشد (۱۳). به دلیل خودرو بودن و ارزان بودن استفاده از این گیاه به عنوان یک عامل طعم‌دهنده در صنایع غذایی دارای صرفه اقتصادی می‌باشد. مطالعات انجام شده در مورد گونه‌های دیگر *Pimpinella* نشان داده که این گیاه دارای خواص آنتی‌اکسیدانتی می‌باشد (۱۳، ۱۵). همچنین خواص ضد قارچی آن علیه فوزاریوم (۱۶) و اثرات ضد میکروبی اسانس آن علیه باکتری‌های مختلف به اثبات رسیده است (۱۷). در تحقیق سلمانیان و همکاران (۱۸) نشان داده شد که عصاره گیاه ناریجه حاوی مقادیر قابل توجهی از ترکیبات فنول، فلاونوئید و کاروتنوئید با خاصیت بالای آنتی‌اکسیدانتی می‌باشد. همچنین بررسی‌ها نشان داده است که اسانس ناریجه شامل ترکیباتی مانند آلفا پینن ۰/۸ درصد کومین الکل ۵۵/۶ درصد، کارواکرول ۰/۹ درصد، ترپینولن ۱۴/۹ درصد، لیمونن ۷/۸ درصد می‌باشد (۱۹). در تحقیق دیگری علاوه بر این ترکیبات جایجیرن، پری جایجیرن و جرماکرن نیز جداسازی شده است (۱۷). فاکتورهای مختلفی مانند دمای استخراج، زمان، روش استخراج و نیز نوع حلال مورد استفاده تأثیر بسزایی بر ترکیبات و محتوی عصاره‌های گیاهی داشته و در این میان تأثیر نوع حلال به علت قطبیت آن و تمایل ترکیب با مواد مختلف مؤثرتر است (۲۰). در صنایع دارویی و غذایی از عصاره یا اسانس یک گیاه بسته به ویژگی‌های عملکردی آن استفاده می‌شود. با توجه به اینکه گیاه

³ Folin-Ciocalteu

¹ *Pimpinella affinis*

² Mesh

اصلی ABTS^{•+} به وسیله مخلوط کردن دو محلول پایه به مقدار مساوی با یکدیگر تهیه شده و در ادامه این مخلوط در دمای اتاق و محیط تاریک به مدت ۱۶ ساعت به منظور تکمیل واکنش نگهداری شد. محلول تهیه شده برای رسیدن جذب نوری به $0.7 (\pm 0.2)$ در طول موج ۷۳۴ نانومتر با اتانول رقیق شد. به ۲ میلی لیتر از محلول تازه تهیه شده ABTS میزان 0.2 میلی لیتر از غلظت‌های مختلف اسانس، عصاره و BHT اضافه شد و بعد از نگهداری به مدت ۶ دقیقه در تاریکی، جذب نوری نمونه‌ها در ۷۳۴ نانومتر اندازه‌گیری شده و درصد بازدارندگی نمونه‌ها از رابطه زیر محاسبه گردید و به صورت ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی معادل اسید آسکوربیک گزارش شد.

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

در این فرمول A_{blank} میزان جذب نوری کنترل را نشان می‌دهد و A_{sample} بیانگر قدرت جذب نوری غلظت‌های مختلف عصاره و اسانس گیاه می‌باشد.

تجزیه و تحلیل آماری: تمام آزمون‌ها سه بار تکرار گردیدند و تحت نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن انجام پذیرفت. نتایج $p \leq 0.05$ از نظر آماری معنی‌دار فرض شدند. برای بررسی رابطه بین آزمایش‌های آنتی‌اکسیدانتی و فنل کل از ضریب و همبستگی پیرسون استفاده شد. برای رسم منحنی‌ها از نرم‌افزار Excel استفاده گردید.

یافته‌ها

از آنجاکه عامل اصلی وجود خاصیت آنتی‌رادیکالی در گیاهان، ترکیبات فنلی موجود در آن‌ها می‌باشد (۵) میزان فنل کل گیاه اناریجه تعیین گردید. منحنی استاندارد اسید گالیک به منظور تعیین میزان فنل کل در شکل شماره ۱ ترسیم شد.

نتایج به دست آمده نشان داد که عصاره آبی-الکی گیاه اناریجه حاوی $37/68$ درصد و اسانس گیاه اناریجه حاوی $53/14$ درصد ترکیبات فنولیک معادل گالیک اسید بر گرم نمونه گیاه می‌باشد همان طوری که ملاحظه می‌شود اسانس به صورت معنی‌داری دارای میزان فنل تام بیشتری نسبت به عصاره الکی-آبی این گیاه است. با توجه به جدول شماره ۱ مشاهده شد که بین میزان فنل تام اسانس و عصاره الکی-آبی اناریجه با میزان اثرات آنتی‌اکسیدانتی آن‌ها در روش DPPH همبستگی معنی‌داری وجود دارد و میزان همبستگی آن برای عصاره در سطح $0/01$ معنی‌دار است.

اسپکتوفتومتر در طول موج 760 نانومتر اندازه‌گیری شد. منحنی استاندارد اسید گالیک به منظور تعیین میزان فنل کل ترسیم شد و میزان فنل بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید به ازای هر گرم عصاره تعیین شد (۲۱).

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانتی: بررسی فعالیت‌های

آنتی‌اکسیدانتی با سه روش زیر صورت گرفت:

الف: روش DPPH[•]:

در این تست اندازه‌گیری میزان بی‌رنگ شدن محلول بنفش ۲ و ۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل یا (DPPH) در متانول از طریق توانایی دادن اتم هیدروژن یا الکترون در عصاره‌ها و ترکیبات مختلف انجام می‌گیرد. معرف مورد استفاده در این روش ۲ و ۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل یا (DPPH) می‌باشد. به این صورت که به 500 میکرولیتر از غلظت‌های مختلف عصاره و اسانس محلول $0/04$ درصد ۲ و ۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل یا (DPPH) در متانول اضافه گردید. سپس بعد از 30 دقیقه نگهداری در یک مکان تاریک در دمای اتاق، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج 517 نانومتر قرائت شد. در بازدارندگی رادیکال‌های آزاد از رابطه زیر محاسبه شد:

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

در این فرمول A_{blank} میزان جذب نوری کنترل (که حاوی تمام مواد به استثنای اسانس و عصاره می‌باشد) را نشان می‌دهد و A_{sample} بیانگر قدرت جذب نوری غلظت‌های مختلف عصاره و اسانس گیاه اناریجه می‌باشد. در این تست از آنتی‌اکسیدانت سنتزی BHT به عنوان کنترل مثبت استفاده شد (۲۲).

ب: ارزیابی قدرت احیاکنندگی^۵:

برای این منظور یک میلی لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره، اسانس و آنتی‌اکسیدانت سنتزی BHT با یک میلی لیتر فسفات بافر و یک میلی لیتر فروسیانید پتاسیم مخلوط شدند و به مدت 20 دقیقه در حمام آب 50 درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس تری کلریک اسید افزوده شد. سپس به مدت 10 دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ با دور 6000 سانتریفیوژ گردید. در نهایت به آن آب مقطر و فریک کلراید اضافه شد. میزان جذب نوری بعد از گذشت مدت زمان 10 دقیقه در دمای 25 درجه سانتی‌گراد، در طول موج 700 نانومتر قرائت گردید (۲۳).

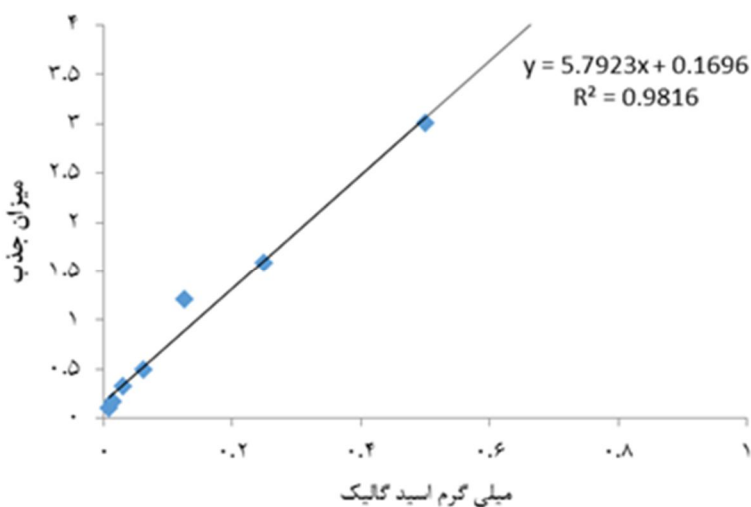
ج: ارزیابی قدرت مهارکنندگی رادیکال ABTS^{•+}:

این آزمون با استفاده از روش روبرتا و همکاران (۲۴) با اندکی تغییرات انجام شد. ابتدا محلول‌های پایه شامل ABTS (۷ میلی مولار) و پتاسیم پرسولفات (۲/۴۵ میلی مولار) تهیه شد و در ادامه محلول

⁶ 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)

⁴ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

⁵ Reducing Power



شکل (۱): منحنی استاندارد اسید گالیک

جدول (۱): مقایسه مقادیر فنل کل عصاره الکلی - آبی و اسانس اناریچه و میزان همبستگی میان فنول کل و مقادیر فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها.

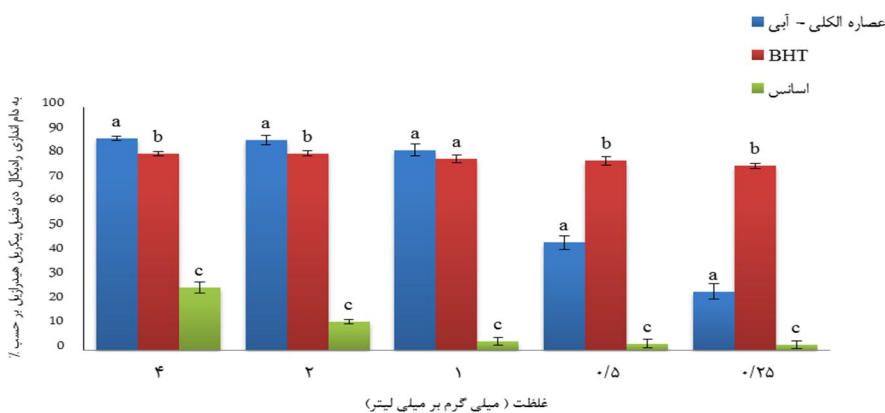
سنجش آنتی‌اکسیدان‌ها بر روش DPPH		میلی گرم گالیک اسید / گرم عصاره	
R***	مقدار (P)Significant		
۰/۷۶۵	۰/۰۳۸**	^a ۳۷/۱ ± ۶۸/۱۲	مقدار فنل کل عصاره الکلی - آبی
۰/۹۷۰	۰/۰۰۳***	^b ۵۳/۴ ± ۱۴/۲۵	مقدار فنل کل اسانس

*حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است (p < ۰/۰۵).

**همبستگی در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار است.

***همبستگی در سطح ۰/۰۱ معنی‌دار است.

Pearson's r****

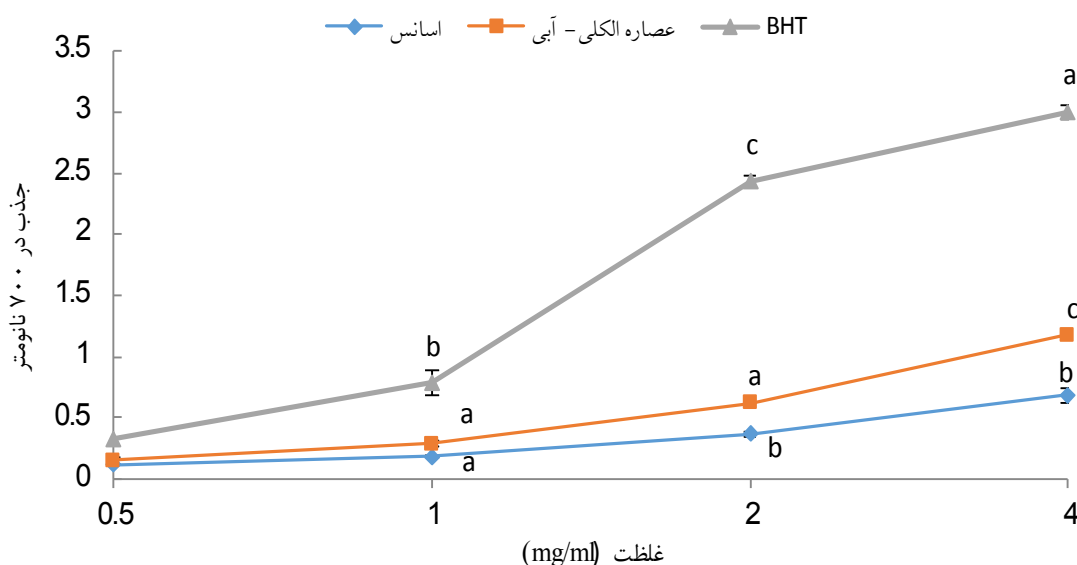


شکل (۲): میزان به دام اندازی رادیکال DPPH غلظت‌های مختلف عصاره الکلی - آبی و اسانس اناریچه در مقایسه با BHT. حروف

غیرمشابه در هر غلظت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است (p < ۰/۰۵).

میلی لیتر حتی از آنتی اکسیدانت سنتزی BHT نیز بیشتر بود که این اختلاف در دو غلظت آخر بیشتر معنی دار می باشد ($p < 0.05$). نتایج به دست آمده در آزمایش ارزیابی قدرت احیاکنندگی که در شکل شماره ۳ آمده است همان طور که در شکل مشاهده می شود در محدوده غلظت تعیین شده میزان جذب برای اسانس ۰/۶۸۸-۰/۱۱۲ و برای عصاره الکلی-آبی ۰/۱۷۵-۰/۱۵۰ بوده که در مقایسه بین عصاره و اسانس گیاه اناریچه در غلظت های بالا اختلاف معنی داری وجود دارد به این معنی که عصاره گیاه اناریچه خاصیت آنتی اکسیدانتی بیشتری را نسبت به اسانس نشان داد. این محدوده جذب برای BHT ۰/۳۲۲-۰ بوده که بیانگر قدرت احیاکنندگی قوی تر آن در مقایسه با اسانس و عصاره الکلی-آبی اناریچه است.

در روش DPPH میزان جذب نشان دهنده مقدار باقی مانده DPPH است که هر چه این مقدار بیشتر باشد بیانگر فعالیت کم آنتی اکسیدانت ها در حذف رادیکال آزاد می باشد. غلظت های مختلف اسانس، عصاره و BHT و درصد مهارکنندگی رادیکال DPPH در شکل ۱ آورده شده است همان گونه که مشاهده می شود در این آزمون با افزایش غلظت اسانس و عصاره الکلی-آبی، مهار رادیکال DPPH با قدرت بیشتری صورت گرفته و در همه ی غلظت ها اختلاف معنی داری بین اسانس و عصاره وجود دارد ($p < 0.05$) همچنین قدرت مهارکنندگی در عصاره بیشتر از اسانس می باشد. قدرت مهارکنندگی عصاره در غلظت های ۱ و ۲ و ۴ میلی گرم بر



شکل (۳): میزان قدرت احیاکنندگی عصاره ها و اسانس اناریچه در مقایسه با BHT. حروف غیرمشابه در هر غلظت نشان دهنده اختلاف معنی دار است. ($p < 0.05$)

غلظت اسانس و عصاره در این محدوده غلظت، قدرت آنتی رادیکالی آن افزایش یافته است، به گونه ای که در غلظت ۴ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره اناریچه با بازدارندگی ۹۲ درصدی در مقایسه با BHT اثر خوبی از خود نشان داده است ولی میزان بازدارندگی اسانس نسبت به عصاره و BHT به صورت معنی داری ضعیف تر بوده است. در جدول ۲ ظرفیت آنتی اکسیدانتی معادل آسکوربیک اسید نیز آورده شده است.

در آزمون ABTS نیز رادیکال کاتیون های ABTS با آنتی اکسیدانت ها یا دیگر گونه های رادیکالی که دهنده ی هیدروژن می باشند، واکنش داده و به شکل کاهش یافته درمی آید در نتیجه از طریق تعیین میزان این کاهش، جذب در طول موج ۷۳۴ نانومتر، می توان به درصد بازدارندگی آنتی اکسیدانت مورد نظر پی برد. همان طور که از جدول ۳ مشخص است از غلظت ۰/۲۵ تا ۴ میلی گرم بر میلی لیتر، یک رابطه مستقیم بین غلظت اسانس و عصاره اناریچه و قدرت آن ها در مهار رادیکال ABTS وجود داشته و با افزایش

جدول (۲): درصد بازدارندگی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی معادل آسکوربیک اسید غلظت‌های مختلف عصاره الکلی - آبی، اسانس اناریچه و BHT

درصد بازدارندگی	ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی معادل آسکوربیک اسید (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	غلظت (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)
aA ۱۲/۲±۳۸/۵۵	aA ۰/۰±۰۱/۰۰	عصاره
bA ۳/۰±۱۳/۴۷	bA ۰/۰±۰۰۴/۰۰	اسانس
cA ۹۳/۲±۵۲/۴۷	cA ۰/۰±۱۹/۰۲	BHT
aB ۲۴/۲±۲۰/۴۶	aB ۰/۰±۰۳/۰۰	عصاره
bB ۶/۱±۴۲/۲۹	bB ۰/۰±۰۱/۰۰	اسانس
cA ۹۴/۶±۶۶/۳۹	cA ۰/۰±۱۹/۰۰	BHT
aC ۴۵/۷±۶۶/۰۱	aC ۰/۰±۰۷/۰۰	عصاره
bC ۹/۰±۵۶/۸۵	bC ۰/۰±۰۱/۰۰	اسانس
cA ۹۵/۵±۷۳/۴۵	cA ۰/۰±۱۹/۰۲	BHT
aC ۵۵/۴±۴۰/۱۳	aC ۰/۰±۰۸/۰۱	عصاره
bD ۱۲/۱±۲۲/۳۱	bD ۰/۰±۰۱/۰۰	اسانس
cA ۹۸/۲±۹۳/۳۲	cA ۰/۰±۲۰/۰۲	BHT
aD ۹۲/۴±۳۸/۱۳	aD ۰/۰±۱۴/۰۲	عصاره
bE ۲۴/۲±۹۲/۳	bE ۰/۰±۰۳/۰۰	اسانس
cA ۱۰۰/۰±۰/۰	cA ۰/۰±۲۰/۰۴	BHT

۵۳/۱۴ میلی‌گرم بر گرم می‌باشد. نتایج مشابهی نیز در مطالعه‌ای که بر روی برگ گیاه ویتکس انجام شد به‌دست آمد. به‌طوری‌که محتوای فنل تام اسانس برگ ویتکس به‌طور معنی‌داری بیشتر از عصاره هیدرو الکلی آن بود (۲۸). علت بالا بودن میزان ترکیبات فنلی در اسانس در مقایسه با عصاره را می‌توان به تفاوت در نوع روش تهیه و استخراج، ماهیت شیمیایی آن‌ها و نیز متفاوت بودن ترکیبات مؤثره هرکدام از آن‌ها مرتبط دانست. گولیسین و همکارانش گزارش کردند که بین میزان ترکیبات فنلی و اثر آنتی‌اکسیدانتی عصاره گیاهی ارتباط مستقیمی وجود ندارد به‌طوری‌که میزان فنل عصاره اتانولی بیشتر از عصاره آبی بوده ولی اثر آنتی‌اکسیدانتی عصاره اتانولی نسبت به آبی کم‌تر می‌باشد (۱۳). در مطالعه‌ای دیگر، که بر روی ۲۸ محصول گیاهی انجام شد مشخص گردید که در بسیاری از موارد بین میزان فنل و بالا بودن فعالیت آنتی‌اکسیدانتی همبستگی وجود ندارد در دلیل این امر بیان شده که احتمالاً فاکتورهای دیگری در فعالیت آنتی‌اکسیدانتی نقش دارند (۲۹). در این مطالعه میزان ترکیب فنلی برای عصاره متانولی گیاه اناریچه ۵۴۷/۳۷ میلی‌گرم بر گرم به‌دست آمد (۳۰). در مطالعه‌ای دیگر میزان ترکیبات کل فنولی برای عصاره اتانولی اناریچه فنل تام برابر با ۴۴/۴۴ میلی‌گرم بر گرم گزارش شده است (۱۸). علت این تفاوت علاوه بر مرتبط بودن به نوع حلال‌های مورد استفاده و نیز

در هرستون حروف کوچک غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $p \leq 0.05$ بین عصاره، اسانس و BHT در غلظت یکسان می‌باشد. حروف بزرگ غیرمشابه نیز نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین غلظت‌های مختلف یک ترکیب در سطح $p \leq 0.05$ می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

گیاهانی که حاوی ترکیبات فنلی هستند جز آنتی‌اکسیدانت‌های طبیعی محسوب می‌شوند. فنل‌ها ترکیبات گیاهی بسیار مهمی هستند که توانایی مهار رادیکال‌ها توسط آن‌ها به دلیل گروه هیدروکسیل موجود در آن‌ها می‌باشد (۲۵). ترکیبات آنتی‌اکسیدانتی فراوانی در گیاهان وجود دارد بنابراین خاصیت آنتی‌اکسیدانتی گیاهان با روش‌های متعددی مورد بررسی قرار می‌گیرد. ترکیبات حاوی فلاونوئید و سولفور، دی‌آلیل سولفید، تری سولفید و آلیل سیستئین به‌عنوان ترکیبات مؤثر در ویژگی‌های بیولوژیکی گیاه اناریچه گزارش شده‌اند (۲۶، ۲۷). در مطالعه حاضر فعالیت آنتی‌اکسیدانتی اسانس و عصاره گیاه اناریچه به سه روش DPPH، ABTS و قدرت احیاکنندگی ارزیابی گردید. این بررسی نشان داد که میزان ترکیبات فنلی در عصاره الکلی-آبی گیاه معادل ۳۷/۶۸ میلی‌گرم بر گرم بود درحالی‌که این میزان برای اسانس

معنی داری دارای قدرت احیاکنندگی بالاتری بود. در مطالعه‌ای که بر روی اثر آنتی‌اکسیدانتی گیاه اناریچه انجام شده، اعلام کردند که این گیاه از فعالیت احیاکنندگی خوبی برخوردار است. در بررسی گولیسین بر فعالیت آنتی‌اکسیدانتی گیاه *pimpinella anisum* میزان جذب و احیاکنندگی عصاره متانولی و آبی با افزایش غلظت، روند افزایشی داشته است ولی قدرت احیاکنندگی هر دو عصاره به صورت معنی داری نسبت به BHA و BHT کم‌تر می‌باشد (۱۳). که این نتایج با مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد. در روش ABTS از غلظت ۰/۲۵ تا ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، یک رابطه مستقیم بین غلظت‌های اسانس و عصاره الکلی-آبی اناریچه و قدرت مهار رادیکال‌های ABTS وجود داشت و در غلظت‌های بالا دارای قدرت آنتی رادیکالی بیشتری می‌باشند به گونه‌ای که بیشترین درصد بازدارندگی در مورد اسانس و عصاره در غلظت ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ترتیب ۲۴ درصد و ۹۲ درصد بود. درصد بازدارندگی اسانس و عصاره از BHT کم‌تر بود ولی عصاره دارای درصد بازدارندگی قابل توجهی می‌باشد که قابل رقابت با آنتی‌اکسیدانت سنتزی BHT در غلظت ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است.

هرچند که نتایج این تحقیق نشان‌دهنده بالاتر بودن قدرت آنتی‌اکسیدانتی عصاره نسبت به اسانس بود ولی نیاز به انجام آزمایشات تکمیلی‌تر مانند روش‌های تعیین فلاونوئیدها، اندازه‌گیری توان آنتی‌اکسیدانتی به روش احیاء آهن یون آهن (III)، روش رنگ بری بتاکاروتن و سایر روش‌ها نیز برای بررسی دقیق‌تر توصیه می‌گردد. از طرفی تحقیق بر روی کارایی این گیاه بر مهار اکسیداسیون در مدل‌های غذایی نیز بسیار می‌تواند سودمند باشد.

با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق مشخص شد که اسانس و عصاره الکلی-آبی اناریچه دارای اثر آنتی‌اکسیدانتی قابل ملاحظه‌ای در مقایسه با BHT می‌باشند. همچنین مشخص شد که به‌غیر از میزان ترکیبات فنلی در سایر آزمون‌های انجام گرفته عصاره اناریچه به‌طور معنی داری قدرت بالاتری را نشان داد. ضمن اینکه پیشنهاد می‌شود که تأثیر سایر عوامل مانند روش‌های مختلف عصاره‌گیری مانند فراصوت، میکروویو و دی‌اکسید کربن فوق بحرانی و غیره و نیز روش‌های نوین اسانس‌گیری مانند روش استخراج با کمک دی‌اکسید کربن نیز به‌منظور تکمیل این تحقیق انجام شود، لیکن این یافته‌ها در کنار تحقیقاتی که منجر به استخراج مواد مؤثره این گیاه شود، می‌تواند زمینه را برای کاربرد بیشتر در پزشکی و بیماری‌های مزمن مرتبط با استرس اکسیداتیو مانند: سرطان، بیماری‌های قلبی و عروقی و دیابت فراهم نموده و نیز به‌عنوان مواد نگه‌دارنده طبیعی در صنایع غذایی و داروئی مورد استفاده قرار گیرند.

روش استخراج، به محل جغرافیایی، فصل جمع‌آوری و سن گیاه نیز مربوط است که منجر به تفاوت در میزان ترکیبات فنلی مؤثر می‌شود (۳۱). نوع روش استخراج نیز در این مورد مؤثر است به‌عنوان مثال در یک مطالعه توسط شکوه صارمی و همکاران تأثیر روش استخراج عصاره اناریچه با روش‌های مختلف شامل مسریشن، اولتراسوند و روش سیال فوق بحرانی مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج نشان داد که بیشترین کارایی را روش استخراج با سیال فوق بحرانی دارد (۳۲). در بررسی توانایی جمع‌آوری رادیکال‌های DPPH اسانس اناریچه اثر ضد رادیکالی از خود نشان داده است اما توانایی مهار رادیکال‌های آزاد توسط اسانس نسبت به عصاره و BHT ضعیف‌تر می‌باشد. در مورد اثر مهارکنندگی عصاره، با افزایش غلظت، شاهد افزایش در مهار رادیکال آزاد DPPH بودیم که میزان این مهارکنندگی در غلظت‌های ۲ و ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌طور معنی داری از آنتی‌اکسیدانت سنتزی BHT بیشتر می‌باشد. سلمانیان و همکاران درصد مهارکنندگی رادیکال DPPH را برای BHT و عصاره در محدوده غلظت ۳۰۰-۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب ۴/۲۳-۸۵/۷۷ و ۲/۹۴-۸۰/۸۲ درصد گزارش کردند (۱۸). علت بالا بودن قدرت آنتی‌اکسیدانتی عصاره در مقایسه با اسانس علاوه بر تفاوت ماهیت شیمیایی، در برخی موارد به علت ایجاد حالت هم‌افزایی بین ترکیبات تشکیل‌دهنده یک عصاره نیز مربوط می‌شود که منجر به افزایش قدرت آنتی‌اکسیدانتی کلی آن می‌شود. از نکته نظر استفاده کاربردی در مطالعه عطایی صالحی و همکاران در بررسی اثر عصاره گیاه اناریچه در پایدارسازی روغن کانولا طی شرایط ذخیره‌سازی گزارش گردید که گیاه اناریچه به‌عنوان یک منبع غنی از ترکیبات فنلی و توکوفرولی دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانتی می‌باشد (۳۱). در مطالعه‌ای که بر روی بررسی اثر آنتی‌اکسیدانتی عصاره دانه رازیانه بر پایداری روغن آفتابگردان انجام گردید غلظت‌های ۲۵۰ و ۳۰۰ ppm از عصاره دانه رازیانه نسبت به آنتی‌اکسیدانت سنتزی BHT و BHA فعالیت آنتی‌اکسیدانتی بالاتری را در روغن آفتابگردان از خود نشان داده‌اند (۳۳). در ارزیابی قدرت احیاکنندگی، میزان رنگ بستگی به میزان احیا شدن Fe^{3+} به Fe^{2+} توسط آنتی‌اکسیدانت‌های موجود در اسانس و عصاره گیاه دارد که هر چه میزان آنتی‌اکسیدانت موجود بیشتر باشد، میزان احیا شدن و تولید Fe^{2+} نیز بیشتر بوده و در نتیجه رنگ آبی ایجادشده اسانس و عصاره بیشتر شده و عدد جذب نوری بزرگ‌تری به‌دست خواهد آمد. در مقایسه بین اسانس و عصاره الکلی-آبی اناریچه و BHT اختلاف معنی داری وجود داشت. قدرت احیاکنندگی در غلظت ۴ میلی‌گرم برای اسانس، عصاره الکلی-آبی و BHT به ترتیب ۱/۰، ۱۷۵/۶۸۸، ۳ می‌باشد که بیشترین میزان قدرت احیاکنندگی مربوط به BHT بوده و عصاره نیز نسبت به اسانس با اختلاف

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه که با حمایت مادی و معنوی خود در extracts). LWT - Food Sci Technol 2006; 39(3): 308-15.

اجرای این تحقیق همکاری صمیمانه داشتند، کمال تشکر و قدردانی می‌شود.

References:

- Jayathilake C, Rizliya V, Liyanage R. Antioxidant and free radical scavenging capacity of extensively used medicinal plants in Sri Lanka. *Procedia Food Sci* 2016; 6:123-36.
- Halliwel B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr* 1993; 57(5): 715S-724S.
- Estévez M, Cava R. Effectiveness of rosemary essential oil as an inhibitor of lipid and protein oxidation: Contradictory effects in different types of frankfurters. *Meat Sci* 2006; 72(2): 348-55.
- Tomaino A, Cimino F, Zimbalatti V, Venuti V, Sulfaro V, De Pasquale A, et al. Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. *Food Chem* 2005; 89(4): 549-54.
- Barlow SM. Toxicological aspects of antioxidants used as food additives. *Food antioxidants*: Springer; 1990. p. 253-307.
- Brand-Williams W, Cuvelier M-E, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci Technol* 1995; 28(10): 25-30.
- Namiki M. Antioxidants/antimutagens in food. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1990; 29(4): 273-300.
- Pokorný J. Natural antioxidants for food use. *Trends Food Sci Technol* 1991; 2: 223-7.
- Kulic T, Radonic A, Katalinic V, Milos M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chem* 2004; 85(4): 633-40.
- Dawidowicz AL, Wianowska D, Baraniak B. The antioxidant properties of alcoholic extracts from *Sambucus nigra* L. (antioxidant properties of
- Lee J-Y, Hwang W-I, Lim S-T. Antioxidant and anticancer activities of organic extracts from *Platycodon grandiflorum* A. De Candolle roots. *J Ethnopharmacol* 2004; 93(2): 409-15.
- Besharati-Seidani A, Jabbari A, Yamini Y. Headspace solvent microextraction: a very rapid method for identification of volatile components of Iranian *Pimpinella anisum* seed. *Analytica Chimica Acta* 2005; 530(1): 155-61.
- Gülçm İ, Oktay M, Kireççi E, Küfrevioğlu Öİ. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food chem* 2003; 83(3): 371-82.
- Tabanca N, Ma G, Pasco DS, Bedir E, Kirimer N, Baser K, et al. Effect of essential oils and isolated compounds from *Pimpinella* species on NF - KB: a target for antiinflammatory therapy. *Phytother Res* 2007; 21(8): 741-5.
- Tepe B, Akpulat HA, Sokmen M, Daferera D, Yumrutas O, Aydin E, et al. Screening of the antioxidative and antimicrobial properties of the essential oils of *Pimpinella anisetum* and *Pimpinella flabellifolia* from Turkey. *Food Chem* 2006; 97(4): 719-24
- Adel M, Safari R, Nematollahi A, Ghiasi M, Nafian Dehkordi I. Evaluation of antifungal activity of essential oils of *Eryngium campestre*, *Cuminum cyminum*, *Pimpinella affinis* and *Allium sativum* on *Fusarium solani* isolated from ornamental aquarium fish. *J appl ichthyol* 2015; 2(4): 23-32.
- Mohammadreza V-r. Chemical composition and antimicrobial activity of *Pimpinella affinis* Ledeb. essential oil growing in Iran. *Int J Green Pharm* 2008; 3(8): 913-5.

18. Salmanian S, Sadeghi Mahonak A. Determination of total phenolic compounds, flavonoids, carotenoids and antioxidant activity of Anarijeh extract (*Froriepia subpinnate*). 3rd Iranian Agricultural Biotechnology Conference: Ferdowsi Mashhad University; 2012. (Persian)
19. Sohravardi N, Sohravardi F, Kazemi Tabar SK. Chemical composition of *Eryngium bungei* essential oil. National conference of Medicinal plants: Mazandaran Jahad Daneshgahi; 2011. (Persian)
20. Mozdastan S, Ebrahimzadeh MA, Khalili M. Comparing the Impact of Different Extraction Methods on Antioxidant Activities of Myrtle (*Myrtus communis* L.). JMUMS 2015; 25(127): 10-24. (Persian)
21. Ordoñez AAL, Gomez JD, Vattuone MA, Isla MI. Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz extracts. Food Chem 2006; 97(3): 452-8.
22. Akowuah GA, Ismail Z, Norhayati I, Sadikun A. The effects of different extraction solvents of varying polarities on polyphenols of *Orthosiphon stamineus* and evaluation of the free radical-scavenging activity. Food Chem 2005; 93(2): 311-7.
23. Yildirim A, Mavi A, Kara AA. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. J. Agric. Food Chem 2001; 49(8): 4083-9.
24. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med 1999; 26(9-10): 1231-7.
25. Hatono T, Edamatsu R, Hiramatsu M, Mori A, Fujita Y, Yasuhara T, et al. Effects of the interaction of tannins with co-existing substances. VI. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical and on DPPH radical. Chem Pharm Bull 1989; 37: 2016-21.
26. Özbek H, Güvenalp Z, Kuruüzüm-Uz A, Kazaz C, Demirezer LÖ. Phenylpropanoids, Sesquiterpenoids and Flavonoids from *Pimpinella tragiium* Vill. subsp. *lithophila* (Schischkin) Tutin. Records of Natural Products 2016; 10(2): 207.
27. Tharun G, Pindi PK. Evaluation of antioxidant potential and antimicrobial activity of successive extracts of *Pimpinella tirupatiensis*. J Pharm Res 2013; 7(9): 817-22.
28. Ahmadvand h, amiri h, Ekbatan Hamadani s, Bagheri s. Antioxidant properties of leaves essential oil and hydroalcoholic extract *Vitex pseudo-negundo*. Yafteh. 2012; 14(2): 5-13. (Persian)
29. Velioglu Y, Mazza G, Gao L, Oomah B. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. J Agric Food Chem 1998; 46(10): 4113-7.
30. Ataei Salehi E, Esmailzadeh Kenari, R, Nasiri Takami, S. Antioxidant Effect of *Pimpinella affinis* Ledeb Plant Methanolic Extract on Stability of Canola Oil during Storage Condition. Iran J Food Sci Technol 2014;10(2). (Persian)
31. Liu X, Dong M, Chen X, Jiang M, Lv X, Yan G. Antioxidant activity and phenolics of an endophytic *Xylaria* sp. from *Ginkgo biloba*. Food chem 2007; 105(2): 548-54.
32. Shokoh Saremi E, Habibi Najafi MB, Hadad Khodaparast MH, Bahreini M. Effect of extraction method on antioxidant properties of *affinis pimpinella*. Iran J Food Sci Technol 2017; 14(69): 169-59. (Persian)
33. Tahami F BA, Ghiyasi Tarzi B, Mahasti P. Investigate the antioxidant extract of fennel seeds (*Foeniculum vulgare*) on the stability of sunflower oil. Food Sci Nutrition 2012; 10(1): 71-8. (Persian)

DETERMINATION AND COMPARISON OF ANTIOXIDANT ACTIVITY AND PHENOLIC CONTENT OF PIMPINELLA AFFINIS HYDROETHANOLIC EXTRACT AND ESSENTIAL OIL

Fatemeh Esmaeli¹, Hossein Tajik², Tooraj Mehdizadeh^{3*}, Mahsa Mayeli⁴

Received: 25 Apr, 2017; Accepted: 21 June, 2017

Abstract

Background & Aims: Due to the adverse effects of synthetic antioxidants, there is a great desire to use herbs because of its antioxidant properties. This study was performed to examine the antioxidant effects of (*Pimpinella affinis*) as an alternative to synthetic antioxidants.

Materials & Methods: Total phenolic, contents were measured with folin ciocalteu method. The antioxidant capacity of the extract and essential oil was assessed by DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical-scavenging activity and compared to synthetic antioxidant BHT. In addition, antioxidant capacity of extracts was also analyzed with ABTS (acid sulphonic-6-ethylbenzthiazoline-3-azinobis, 2, 2, cation radical method. Data were analyzed using Duncan's multiple tests and the analysis was carried out using SPSS.

Results: In testing percent of inhibition of free radicals (DPPH), the extract showed a significant inhibitory effect compared to the essential oil ($p < 0.05$). Both extract and essential oil also showed iron reducing effect that was affected by the increase in the concentration. In ABTS test, most antiradical activity related to the concentration of 4 mg/ml with 24% and 92% inhibition, respectively when compared with BHT showed less inhibitory effect. And finally total phenolic content of essential oil and extract was 53.14 ± 4.25 and 37.68 ± 1.12 mg Gallic acid/g extract, respectively.

Conclusion: The results of this study showed that extract and essential oil of *Pimpinella affinis* have considerable antioxidant activity compared to synthetic antioxidant (BHT), and after conducting more comprehensive studies can be used in food and pharmaceutical industries.

Keywords: *Pimpinella affinis*, Extract, Essential oil, Antioxidant, Total phenol

Address: Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Nazloo Pardis, Urmia, Iran

Tel: +984431942673

Email: T.Mehdizadeh@urmia.ac.ir ; Tooraj.mehdizadeh@yahoo.com

SOURCE: URMIA MED J 2016; 28(5): 320 ISSN: 1027-3727

¹M.Sc. Student of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Iran

²Assistant Professor, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Iran

³Professor, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Iran (Corresponding Author)

⁴M.Sc. Student of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Iran