نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۰، شماره ۱، بهار ۱۳۹۳، ص. ۵۴-۴۶

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 10, No. 1, Spring 2014, p. 46-54

ارزیابی اثرات آنتی اکسیدانی عصاره استونی و متانولی دانه ذرت خوشه ای در مقایسه با TBHQ در چربی دنبه گوسفند

سحر لشگری[۱]- مجید جوانمرد[۲*]

تاریخ دریافت:۱۳۹۱/۱۰/۱۱
تاریخ پذیرش:۱۳۹۲/۴/۱۰

چکیده

امروزه آنتی اکسیدان های طبیعی به دلیل اثرات منفی آنتی اکسیدان های مصنوعی از جمله سرطان زایی و سمیت بیشتر مورد پذیرش می باشند. این مسئله منجر به ایجاد علاقه فزاینده در جهت جستجو برای آنتی اکسیدان های طبیعی شده است. هدف از این پژوهش، بررسی نوع و میزان ترکیبات فنولی موجود در دانه ذرت خوشه ای به عنوان منبع ترکیبات آنتی اکسیدانی طبیعی و همچنین تعیین میزان فعالیت آنتی اکسیدانی این ترکیبات استخراج شده در چربی دنبه می باشد. عصاره موجود در دانه کامل ذرت خوشه ای با کمک حلال های آلی (استون و متانول) استخراج گردید و ترکیبات تشکیل دهنده آن با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا تعیین گردید. میزان فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیبات استخراج شده در مقایسه با نمونه شاهد و آنتی اکسیدان مصنوعی TBHQ و با اندازه گیری شاخص های پراکسید، تیوباربیتوریک اسید و زمان مقاومت به اکسید شدن در چربی دنبه مشخص شد. میزان کل ترکیبات فنولی موجود دردانه ذرت خوشه ای ۱۷۰۰(mgGA/100gr) بدست آمد. اسیدهای فنولیک از جمله اسید گالیک، اسید وانیلیک، اسید فرولیک، اسیدکافئیک و فلاونوییدها و آنتوسیانین ها به عنوان ترکیبات فنولی اصلی با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا در ذرت خوشه ای شناسایی شدند. با افزایش غلظت عصاره تام ذرت خوشه ای فعالیت آنتی اکسیدانی افزایش یافت. به طوریکه بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی و پایداری اکسیداتیو در چربی دنبه در اثر افزودن ۲۰۰۰(ppm) عصاره تام دانه ذرت خوشه ای ایجاد شد اما اثر ممانعت کنندگی اکسیداتیو این غلظت در مقایسه با غلظت ۱۰۰(ppm) آنتی اکسیدان مصنوعی TBHQ در چربی دنبه کمتر بود زیراکه ترکیبات فنولی موجود در دانه ذرت خوشه ای به حرارت بالا حساس بوده وطی مدت طولانی تجزیه شدند. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که می توان از ترکیبات فنولی موجود در دانه ذرت خوشه ای به عنوان منبع آنتی اکسیدان طبیعی در روغن های خوراکی استفاده نمود وهمچنین در صورت استفاده از دمای پایین این ترکیبات می توانند رقیب خوبی برای آنتی اکسیدان مصنوعی TBHQ باشند.

واژه های کلیدی: ترکیبات فنولی، دانه ذرت خوشه ای، چربی دنبه، فعالیت آنتی اکسیدانی، گاز کروماتوگرافی با کارایی بالا

مقدمه

ذرت خوشه ای با نام علمی *Sorghum bicolor* L. Moench گیاهی از خانواده غلات است که درایران ذرت خوشه ای نامیده می‌شود. ذرت خوشه ای مهمترین غله بعد از گندم، برنج، ذرت و جو در مقام پنجم قرار دارد (Diko & Gruppen, 2006). توده های زراعی بومی ذرت خوشه ای در مناطق جنوب خراسان، سیستان، کرمان، اصفهان، یزد، گیلان، مازندران و بنادر جنوبی به طور پراکنده وجود دارد (اهدایی، ۱۳۷۲). پنج کشور عمده تولید کننده این غله عبارتند از : ایالات متحده آمریکا (۲۵درصد)، هندوستان (۲۱/۵ درصد)، مکزیک (۱۱ درصد)، چین (۹ درصد)، و نیجریا (۷ درصد)که این کشورها باهم ۷۳ درصد این محصول را در جهان تولید می کنند. از کل مناطق جهانی کشت ذرت خوشه ای بیش از ۸۰ درصد آن در کشورهای در حال توسعه قرار دارد. موارد مصرف آن مانند مصارف ذرت و جو، غذای انسان و تهیه خوراک دام و طیور و همچنین در صنایع نشاسته و الکل سازی است (Dykes & Rooney, 2006). همچنین ذرت خوشه ای حاوی ترکیبات فنولی نظیر اسیدهای فنولیک و فلاونوییدها می باشد. این ترکیبات فنولی که در لایه های

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران
۲- دانشیار گروه صنایع غذایی و تبدیلی، سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران، تهران
(*- نویسنده مسئول: Email: javanmard@irost.ir)

خارجی دانه ذرت خوشه ای قرار دارند دارای ویژگی های ساختاری مناسب برای شکستن رادیکال ها می باشند که آنها را قادر می سازد تا آنتی اکسیدان های مؤثری باشند (Sikwese & Duodu, 2006).

Awika & Rooney در سال ۲۰۰۳ از ذرت خوشه ای به عنوان یک ترکیب آنتی اکسیدانی استفاده کردند. آنها دریافتند که ترکیبات فنولی در لایه های خارجی این دانه متمرکز شده است. Dykes و Rooney در سال ۲۰۰۶ ترکیبات فنولی دانه ذرت خوشه ای را از لحاظ کمی و کیفی مورد آنالیز قرار دادند. آنها با کمک روشهای مختلف شیمیایی و فیزیکی دریافتند که ترکیبات فنولی دانه ذرت خوشه ای عبارتند از: اسیدهای فنولیک، فلاونوییدها و تانن های تراکمی. Sikwese و Duodu در سال ۲۰۰۶ اثر آنتی- اکسیدانی عصاره کامل (بعبارتی هیچگونه فرآیندی نظیر رنگ بری یا بوگیری در عصاره صورت نگرفته است) ذرت خوشه ای را در روغن آفتابگردان در حضور یون های آهن بررسی نمودند و دریافتند که این عصاره علاوه بر اینکه می تواند در حد قابل توجهی از تشکیل محصولات اولیه و ثانویه اکسیداسیون در روغن آفتابگردان جلوگیری نماید، می‌تواند به عنوان یک تشکیل دهنده کمپلکس با فلزات نیز عمل کند.

دنبه گوسفند بخش بزرگی از تولید چربی حیوانی را در ایران تشکیل می دهد و حاوی ۹۵-۸۵ درصد چربی است. با توجه به این که مصرف چربی دنبه در زنجیره غذایی انسان توصیه نمی شود، اما مصرف آن تحت عنوان" روغن حیوانی" در فرهنگ غذایی ایران جایگاه خاصی دارد (قاسمی افشار، ۱۳۸۶).

چربی قابل استخراج دنبه گوسفندی در ایران سالانه بیش از ۴۹۵۰۰ تن می باشد. بخش اعظم این چربی حیوانی با قیمت مناسب جهت مصارف صنعتی از قبیل صابون سازی، شمع سازی و نساجی مورد استفاده قرار می گیرد و یا صادر می شود. همچنین پس از کاهش کلسترول طی فرآیندهای مختلف، از چربی دنبه می توان در فرمولاسیون محصولات مختلف مثل مارگارین و فرآورده های قنادی به عنوان جایگزین روغن هیدروژنه استفاده نمود و یا با کمک فراکسیون گیری، فراکسیون هایی با درجه اشباعیت مختلف و با کاربردهای متفاوت به دست آورد (Ünsal & Aktas, 2003). چربی دنبه نظیر سایرچربی های حیوانی فاقد منابع آنتی اکسیدانی طبیعی (بر خلاف منابع چربی گیاهی) می باشد (قراچورلو و همکاران، ۱۳۸۶). لذا در این تحقیق از چربی دنبه به منظور بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره فنولی دانه ذرت خوشه ای استفاده شد تا منحصراً خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره ارزیابی گردد و اثرات سینرژیستی مطرح نباشد.

آنتی اکسیدان های فنولی سنتزی مانند بوتیل هیدروکسی تولوئن[1]، بوتیل هیدروکسی آنیزول[2] و ترتیری بوتیل هیدروکوییتون[3] معمولاً به مواد غذایی چرب اضافه می شوند تا چربی ها را در مقابل اکسیداسیون پایدار نمایند (فاطمی، ۱۳۷۸). در مورد مصرف این آنتی- اکسیدان های مصنوعی به علت اثرات منفی گزارش شده آنها، نگرانی وجود دارد. به همین علت امروزه نسبت به کاربرد آنتی اکسیدان‌های فنولی طبیعی تمایل بیشتری وجود دارد. ترکیبات آنتی اکسیدانی حاصل از منابع گیاهی با شکستن رادیکال های لیپیدی به عنوان آنتی اکسیدان عمل کرده و همچنین در حضور یون های فلزی، این فنول‌ها هم باشکستن رادیکال ها وهم با مهار کردن فلزات به صورت آنتی اکسیدان عمل می کنند (Sikwese & Duodu, 2006). در دنیا مطالعات زیادی بر روی چربی حیوانی انجام گرفته است این مطالعات عمدتاً بر روی بررسی ویژگی های فیزیکی و شیمیایی این چربی ها بوده است (۱۹). همچنین مطالعات زیادی بر روی پایداری این دسته از چربی ها در اثر مخلوط کردن آنها با آنتی اکسیدان های طبیعی انجام شده است (Hahn *et al*., 1984).

هدف از این تحقیق، شناسایی و تعیین کمی و کیفی ترکیبات فنولی موجود در ذرت خوشه ای به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا [4](HPLC) و تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی آن در چربی دنبه جهت کاربرد آن به عنوان یک آنتی اکسیدان طبیعی و سالم می باشد.

مواد و روش ها

غله ذرت خوشه ای به صورت خشک از بازار تهیه شد. چربی دنبه نیز پس از خرید از کشتارگاه درآزمایشگاه استخراج گردید. همچنین آنتی اکسیدان مصنوعی TBHQ ساخت شرکت Sigma Aldrich و سایر مواد شیمیایی مورد استفاده نیز ساخت شرکت مرک آلمان و دکتر مجللی ایران بودند.

مراحل استخراج عصاره فنولی تام ذرت خوشه ای

آماده سازی نمونه ذرت خوشه ای: ابتدا دانه های فوق تمیز شد و دانه های آسیب دیده، خرد شده، حشره زده یا بیمار و سایر مواد خارجی از آن جدا گردید. دانه به طورکامل آسیاب شد به طوری که از الک هایی با منفذ ۰/۵میلی متر قابل عبور بود (Sikwese & Duodv, 2006).

استخراج عصاره فنولی تام

استخراج عصاره فنولی ذرت خوشه ای با یک روش استخراج ولی با دو حلال استون و متانول بطور جداگانه انجام گرفت تا مشخص

1- Butylated Hydroxy Toluene (BHT)

2- Butylated Hydroxy Anisole (BHA)
3- Tertiary Butyl Hydro Quinone (TBHQ)
4- High Performance Liquid Chromatography

گردد کدامیک از حلال ها بیشترین میزان ترکیبات آنتی اکسیدانی را از این دانه استخراج می کند :

استخراج عصاره استونی : مقدار ۴۰ گرم از دانه ذرت خوشه ای آسیاب شده با ۱۵۰میلی لیتر از محلول آبی استون (۷۵ درصد استون – ۲۵ درصد آب) مخلوط شد و به مدت ۲ ساعت هر ۱۰ دقیقه به وسیله ورتکس[1] تکان داده شد تا عمل استخراج صورت گیرد. مخلوط حاصل در سانتریفیوژ با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت و محلول رویی آن پس از ۲ بار تکرار، جدا شد و در دستگاه تبخیرکننده دوار[2] (۳۵ درجه سانتی گراد) قرارگرفت تا حلال آن تبخیر گردید و در نهایت در خشک کن انجمادی[3]، خشک گردید. پودر حاصله تا هنگام آزمون در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد (Sikwese & Duodu, 2006).

استخراج عصاره متانولی: نحوه فرآیند استخراج مطابق با روش فوق بوده فقط بجای حلال استون (۷۵درصد) از حلال متانول (۷۵درصد) استفاده شد.

شناسایی و تعیین مقدار ترکیبات فنولی ذرت خوشه ای

برای شناسایی و تعیین مقدار ترکیبات فنولی از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مدل Young-Lin ACME 9000در فاز معکوس استفاده شد.

این دستگاه مجهز به آشکار ساز[4] فرابنفش و یک ستون Spherisorb RP-18 (طول ستون ۲۵۰میلی متر، قطر ستون ۴/۶ میلی متر، اندازه ذرات پرشده در ستون ۵ میکرون) بوده وشناسایی در طول موج ۲۸۰ نانومتر انجام شد. آزمون در دمای اتاق به انجام رسید. آنالیز کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا طبق روش Bocco و همکاران در سال ۱۹۹۸ انجام گرفت. دو فاز حامل مورد استفاده در این دستگاه عبارتند از: حلال A (استیک اسید ۱درصد (در آب یون زدایی شده)) و حلال B (متانول و استونیتریل۵۰ :۵۰). ۵ میلی لیتر از نمونه به دقت مخلوط و همگن شد و با محلول استخراج (متانول) به نسبت ۱ به ۵ در یک بالن ژوژه ۵۰ میلی لیتری رقیق شد. سپس بالن ژوژه در حمام اولتراسونیک[5] قرار داده شد و محتوای آن به مدت ۱۰ دقیقه مخلوط گردید. در نهایت محلول با کمک فیلتر سلولزی صاف شد وبا لوپ[6] ۲۰ میکرو لیتری در شرایطی با سرعت جریان ۱/۲ میلی لیتر در دقیقه در شرایط گرادیان فاز متحرک (زمان:۰دقیقه A:B=83:17، زمان:۲دقیقه A:B=83:17 ، زمان:۲۰دقیقه A:B=80:20، زمان:۳۰دقیقه A:B=55:45، زمان:۴۵دقیقه A:B=0:100) به دستگاه تزریق گردید. تعیین مقدار ترکیبات فنولی در مقابل استاندارد خارجی اسید سیرینژیک با غلظت (ppm) ۶۶۶ در شرایط مشابه انجام شد. محاسبه نهایی بر اساس وزن خشک اولیه ۴ گرم به انجام رسید (Bocco *et al*., 1998).

بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره تام ذرت خوشه ای

به چربی استخراج شده از دنبه غلظت های مختلف عصاره فنولی (۵۰۰،۱۰۰۰ و۲۰۰۰ ppm) ذرت خوشه ای اضافه گردید.

مراحل آماده سازی دنبه

تهیه نمونه دنبه: دنبه بعد از تهیه از کشتارگاه به وسیله آب مورد شستشو قرار گرفته تا ضایعات آن حذف گردد. آن را به قطعات ریز خرد کرده و در نهایت چرخ کرده و تا هنگام استخراج چربی، در فریزر نگهداری گردید (قنبری و همکاران، ۱۳۸۵).

استخراج چربی از دنبه: چربی دنبه با کمک روش ذوب کردن خشک تحت خلاء به وسیله دستگاه تبخیر کننده دوار استخراج گردید. ابتدا بالن حاوی ۱۰۰ گرم دنبه چرخ شده را به دستگاه تبخیر کننده دوار وصل کرده و استخراج چربی در دمای۸۰ درجه سانتی گراد با ۶۰ دور در دقیقه به مدت ۲ ساعت انجام گرفت. در همان دقایق ابتدایی فرآیند استخراج، قسمت عمده ای از آب موجود در دنبه جدا شده و در بالن حلال گیر جمع آوری شد. به منظور تسهیل در فرآیند فیلتراسیون از ۲۰۰ میلی لیتر پترولیوم اتر۴۰/۶۰ استفاده نموده و محتویات بالن را با قیف و ارلن بوخنر تحت خلاء صاف کرده و در حین صاف کردن عملیات پرس کردن نیز انجام شد. محلول صاف شده به دکانتور انتقال یافته و فاز آبی آن جدا گردید. به منظور اطمینان از عدم وجود آب به محلول حاصله (چربی+ حلال) مقداری سولفات سدیم بدون آب اضافه کرده و پس از ۱۵ دقیقه تحت خلاء صاف شد. حلال مورد مصرف به وسیله تبخیرکننده دوار در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد تحت شرایط خلاء از چربی جدا گردید. برای خارج کردن حداقل حلال باقیمانده در چربی از گاز ازت استفاده شده و در نهایت چربی در یک ظرف شیشه ای تمیز در فریزر نگهداری گردید (قنبری و همکاران، ۱۳۸۵).

سپس به منظور بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره تام ذرت خوشه ای ، عصاره پودری در مقداری معین ازمتانول خالص حل شده و با کمک سمپلر در غلظت های (۵۰۰،۱۰۰۰ و۲۰۰۰ ppm) به نمونه‌های ۸۰ میلی لیتری چربی دنبه که در ظروف شیشه ای در پیچ دار با حجم ۱۰۰ میلی لیتر قرار گرفته بودند، تزریق شد و بطور یکنواخت هم زده شد. بصورت همزمان یک نمونه نیز به عنوان نمونه شاهد در نظر گرفته شد. در نهایت، ظروف شیشه ای با ورقه های

1- Vortex
2- Rotary Evaprator
3- Freeze Drier
4- Detector
5- Ultra Sonic bath
6- Loop

فویل آلومینیوم پوشش داده شدند و به مدت ۴ روز بصورت دربسته در آون ۸۰ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. از آنجایی که چربی حیوانی مذکور نسبت به روغن های گیاهی حاوی درصد بالایی از اسیدهای چرب اشباع بوده و نقطه ذوب بالاتری (۴۲°C-۳۵) دارد در دمای پایین تر از ۸۰°C بطور محسوس در فرآیند اکسیداسیون شرکت نمی کند (قراچورلو و همکاران، ۱۳۸۶). قنبری و همکاران (۱۳۸۵) در بررسی اثر آنتی اکسیدانی رزماری بر چربی دنبه و روغن کانولا نیز از دمای °C ۸۰ برای چربی دنبه و °C ۷۰ برای روغن کانولا استفاده نمودند. پارامتر هایی نظیر اندیس پراکسید[1]، آزمون تیوباربیتوریک اسید[2] (TBAS) در نمونه های تهیه شده فوق در روزهای صفر، دوم و چهارم مورد بررسی قرار گرفتند و با نمونه شاهد مقایسه شدند. با توجه به داده های بدست آمده، از میان غلظت های فوق، غلظتی به عنوان غلظت بهینه در نظر گرفته شد و سپس به منظور مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیب فنولی ذرت خوشه ای با یک آنتی اکسیدان مصنوعی، نمونه تیمار شده با غلظت بهینه به همراه نمونه تیمارشده با غلظت مجاز(ppm)100 TBHQ و یک نمونه شاهد به مدت ۴۸۰ ساعت در آون ۸۰ درجه سانتی گراد قرار گرفتند و هر ۹۶ ساعت یکبار آزمون های پایداری اکسیداتیو (اندیس پراکسید، آزمونTBAS) در نمونه های مذکور انجام و مقایسه گردیدند.

اندیس پراکسید

این اندیس به روش یدومتری مطابق با استاندارد AOCS به شماره cd8b-90 با سه تکرار برای نمونه چربی انجام شد. این اندیس بر حسب میلی اکی والان اکسیژن در کیلوگرم چربی گزارش می شود (Firestone, 1994).

آزمون TBAS

اندیس TBAS بر اساس روش Pegg (۲۰۰۲) اندازه گیری شد. در این آزمون ابتدا، روغن مذاب دنبه را در درون لوله آزمایش با ۴ میلی لیتر بوتانل حل کرده و کاملا مخلوط نمودیم. ۴ میلی لیتر از محلول ۴درصد (در بوتانل) تیوباربیتوریک اسید به لوله های آزمایش افزوده شد. پس از آن درپوش لوله ها را گذاشته و آنها را به مدت یک دقیقه با ورتکس تکان دادیم. واکنش تیوباربیتوریک اسید در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد در داخل بن ماری به مدت یک ساعت اتفاق افتاد. پس از آن لوله ها با کمک آب یخ خنک شد. میزان جذب محلول در طول موج ۵۲۳ نانومتر، با کمک اسپکتروفتومتر[3] *UV-Visible* اندازه گیری گردید (Fasseas *et al*., 2007).

روش‌ها و ابزار تجزیه و تحلیل داده‌ها

به منظور تجزیه و تحلیل آماری از نرم افزارهای SPSS و Excel استفاده شد. طرح آزمایش، طرح فاکتوریل در قالب بلوک‌های کامل تصادفی است و تمامی آزمون ها با سه تکرار وآزمون رنسیمت با دو تکرار انجام شد. داده های حاصل از تأثیر ترکیبات فنولی خام بر روی شاخص های شیمیایی با آنالیز واریانس (ANOVA) بررسی شدند. آزمون مقایسه میانگین *LSD* برای تعیین تفاوت بین میانگین ها در سطح اطمینان $P < ۰/۰۵$ استفاده شد. داده های حاصل از بررسی پایداری اکسیداتیو دنبه گوسفند و بررسی اختلاف نیز با آنالیز واریانس (ANOVA) به صورت طرح کاملا تصادفی محاسبه شد.

نتایج و بحث

ترکیبات فنولی عصاره دانه ذرت خوشه ای

شکل ۱ کروماتوگرام HPLC ترکیبات فنولی ذرت خوشه ای را همراه با زمان تاخیرآنها نشان می دهد، همچنین میزان این ترکیبات در بالای هر پیک برحسب درصد ذکرشده است که می توان با جدول ۱ مطابقت داد. مقدار کل ترکیبات فنولی موجود در عصاره متانولی دانه ذرت خوشه ای توسط آنالیز HPLC 1300(ppm) (میکروگرم در هر گرم) و در عصاره استونی آن 1700(ppm) (میکروگرم در هر گرم) تعیین شد. از اینرو، در این تحقیق از عصاره استخراج شده با حلال استون استفاده گردید. طبق جدول ذیل، ترکیبات فنولی عمده شناسایی شده در دانه ذرت خوشه ای شامل اسیدهای فنولیک، فلاونوییدها وآنتوسیانین ها می باشند. از مقدارکل ترکیبات فنولی فلاونوییدها (۳۸درصد) و آنتوسیانین ها (۱۵/۷۶درصد) سهم بسزایی دارند. مجموع میزان اسیدهای فنولیک (۳۷/۱۵درصد) تا حدی از مجموع میزان فلاونوییدها (۳۸درصد) کمتر است. طبق جدول۱ عصاره فنولی استخراج شده شامل طیف وسیعی از اسیدهای فنولیک می باشد که قسمت عمده آن را اسید وانیلیک (۸/۹۵درصد) و اسید فرولیک (۸/۸۸درصد) تشکیل می دهند. ۲۴/۸۵ درصد نیز شامل سایر ترکیبات می باشند که قابل شناسایی نبودند. تانن های متراکم نیز جزء ترکیبات فنولی اصلی دانه ذرت خوشه ای است که فقط در برخی ارقام باژن B_1_B_2 یافت شده است. اما به دلیل نبود استانداردهای لازم امکان شناسایی آن با روش HPLC میسر نشد. لذا، از آنجایی که دانه های ذرت خوشه ای مورد بررسی در این تحقیق، مخلوطی از ارقام مختلف است ممکن است حاوی یا فاقدتانن های متراکم باشد. Choi و همکاران (۲۰۰۷) میزان پلی فنول ها را ۷۳۳ میلی گرم در ۱۰۰ گرم دانه سورگوم قرمز تعیین کردند. آنتوسیانین ها از مهمترین ترکیبات پلی فنولی استخراج شده در این دانه ها بودند. همچنین میزان آلفا توکوفرول و مقدار کل توکوفرول ها و توکوترینول ها به ترتیب ۰/۱۴ و ۱/۷۹ میلی گرم در ۱۰۰ گرم وزن

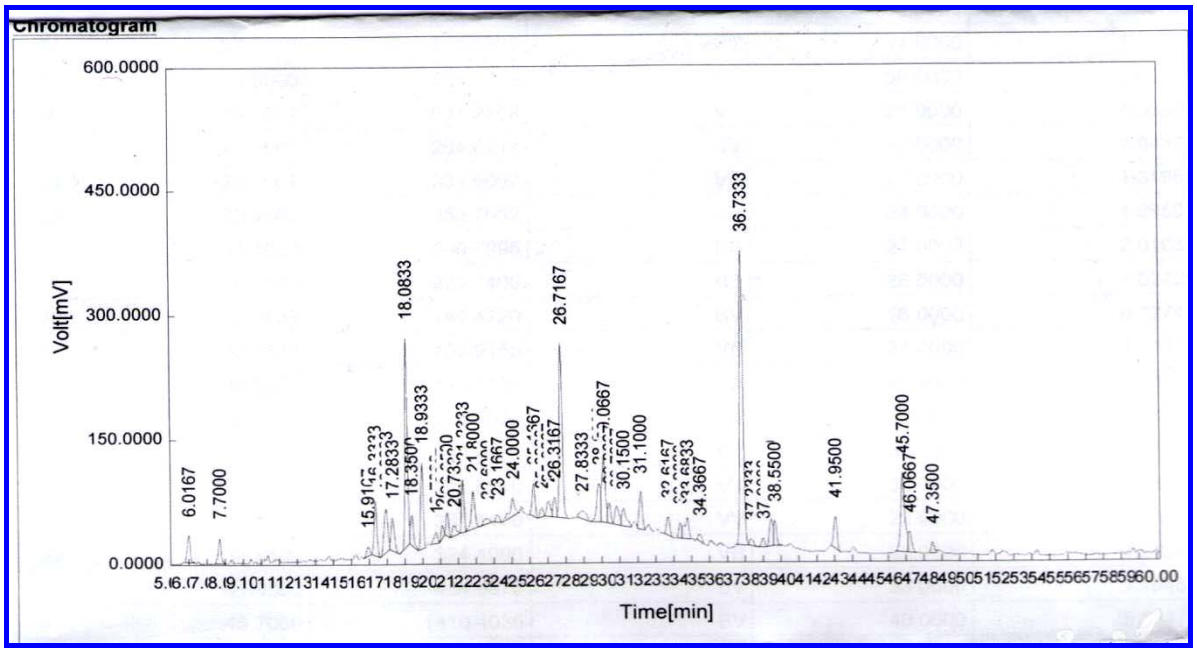
1- Peroxide Value
2- Thiobarbituric Acid Substances
3- Spectrophotometer

پایه تر دانه ذرت خوشه ای تعیین شد.

نتـایج مطالعـات Dykes و Rooney (۲۰۰۶) مبنـی بـر مطالعـه ترکیبات فنولی وآنتی اکسیدانی ذرت خوشه ای و ارزن، نتایج حاصـل از این بررسی را تأیید می نماید چرا که مطالعـه آنهـا نیـز بیـانگر آن است که اسیدهای فنولیک و فلاونوییدها جزء ترکیبات فنولی عمده در اکثر ارقام ذرت خوشه ای بوده اما تانن های متراکم فقط در برخـی از ارقام باژن B_1_B_2 یافت شـده اسـت (Sikwese & Duodu, 2006). آنتوسیانین ها از ترکیبات مهم موجـود در ذرت خوشـه ای مـی‌باشـند. آنهاعلاوه بر خاصیت آنتی اکسیدانی خود، یک رنگدانه محلـول در آب نیز بوده و ایجاد رنگ قرمز، آبی و بنفش می کنند (فاطمی، ۱۳۷۸). از این رو، عصاره فنولی استخراج شده از دانه ذرت خوشـه ای بـه رنـگ قرمز بوده و در چربی دنبه حلالیت مناسبی ندارد.

تعیین موثرترین غلظت مصرفی عصاره استونی ذرت خوشه ای در چربی دنبه

شکل ۲، اثر افزودن غلظت های مختلف عـصاره اسـتونی دانـه ذرت خوشه ای در روغن دنبه را در مقایسه با نمونه شاهد (روغن دنبه بدون افزودن ترکیبات فنـولی) بـر روی شـاخص پراکـسید طـی ۹۶ ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد را نشان می دهد.



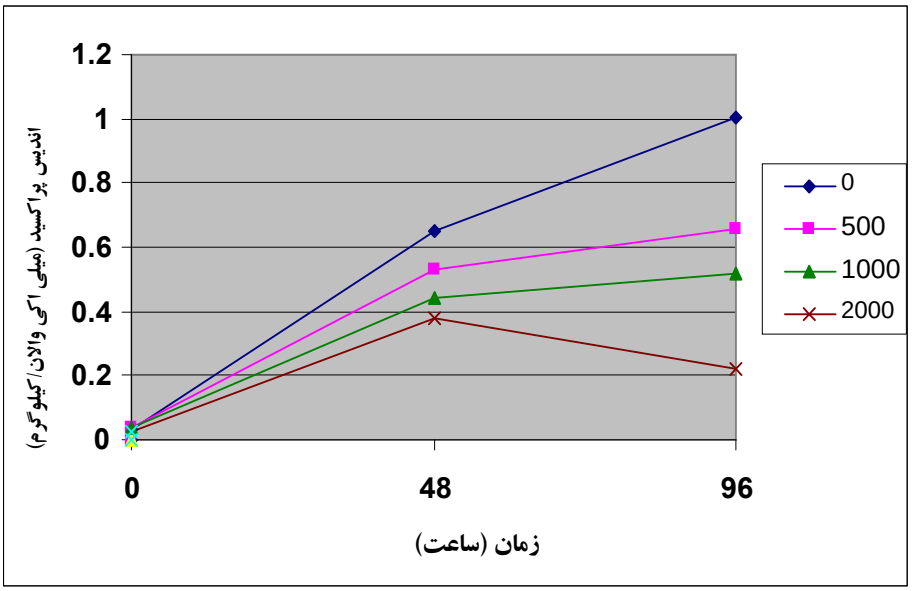
شکل۱- کروماتوگرام HPLC ترکیبات فنولیک عمده در ذرت خوشه ای

جدول ۱- ترکیبات فنولیک شناسایی شده در ذرت خوشه ای

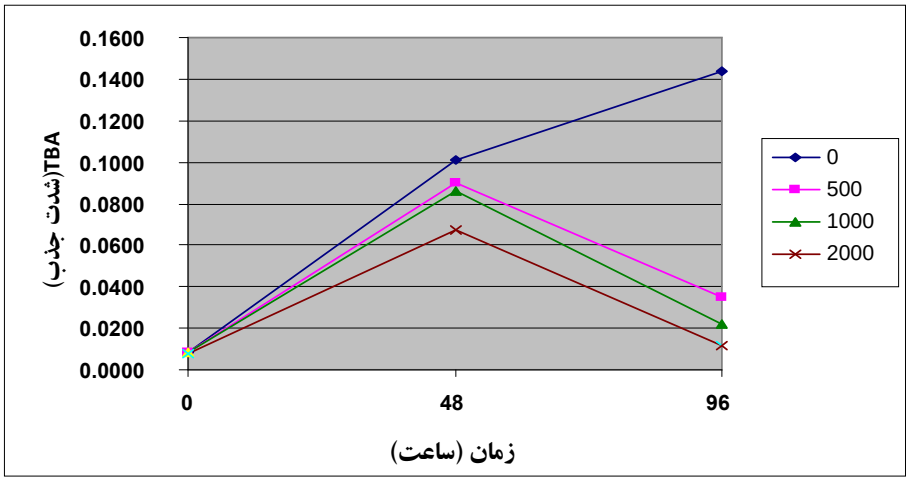
ترکیبات فنولیک	میزان (درصد)
پاراهیدروکسی بنزوئیک اسید	۲/۵۸
اسید گالیک	۲/۸۵
اسید وانیلیکن	۸/۹۵
اسید کافئیک	۳/۶۷
اسید سیرینژیک	۲/۲۱
وانیلین	۱/۵۲
اسید فرولیک	۸/۸۸
اسید پارا-کوماریک	۴/۰۷
اسید ارتو-کوماریک	۱/۴۰
اسید سیناپیک	۱/۰۲
آنتوسیانین ها	۱۵/۷۶
سایر فلاونوییدها	۲۲/۲۴
سایر ترکیبات	۲۴/۸۵

بر اساس این شکل ، در زمان صفر انـدیس پراکـسید تیمارهـا در مقایسه با نمونه شاهد تفاوت معناداری نداشتند. اما با افـزایش زمـان نگهداری، این شاخص در تیمارها نـسبت بـه نمونـه شـاهد درسـطح P≤ ۰/۰۵ به طور معنادار کاهش یافت. انـدیس پراکـسید تیمارهـا بـا غلظت های مختلف عصاره ونمونه شاهد در زمان ۹۶ ساعت بـه طـور معنی داری با هم متفاوت بود. به طوری که تیمار بـا غلظـت (ppm) ۲۰۰۰ توانسته است در زمـان یکـسان (۹۶ساعت) انـدیس پراکـسید کمتری را داشته باشد.

شکل ۳ روند تغییرات اندیس تیوباربیتوریک اسید رادر اثر افـزودن غلظت‌های مختلف عصاره استونی در چربی دنبه در مقایسه بـا نمونـه شاهد نشان می دهد. با توجه به آن می توان مشاهده کرد که انـدیس TBA نمونه شـاهد نـسبت بـه سـایر تیمارهـا در طـول مـدت زمـان نگهداری ۹۶ ساعت، در سـطح P≤ ۰/۰۵ افـزایش معنـی دار یافتـه است. در غلظت های مختلف عصاره پـس از طـی زمـان ۴۸ سـاعت، اندیس TBA به طور معنـی دار روبـه افـزایش بـوده امـا پـس از ۹۶ ساعت این اندیس در نمونه های تیمار شده با غلظـت هـای مختلـف عصاره فنولی به طور معنی دار روبه کاهش رفته است. به طـوری کـه این اندیس پـس از ۹۶ سـاعت در غلظـت (ppm)۲۰۰۰ بـه حـداقل رسید. در اینجا نیز، اندیس TBA نمونه های تیمار شده با غلظت‌های مختلف عصاره و نمونه شاهد در زمان ۹۶ ساعت به طور معنـی دار بـا هم متفاوت بودند.



شکل ۲- روند تغییرات اندیس پراکسید در چربی دنبه باغلظت های مختلف عصاره فنولی ذرت خوشه ای طی ۹۶ ساعت



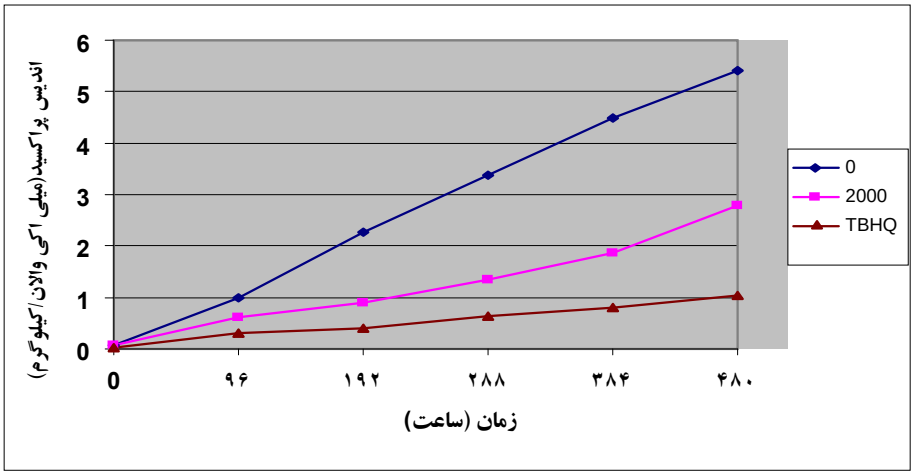
شکل ۳- روند تغییرات اندیس تیوباربیتوریک اسید (TBA) درچربی دنبه با غلظت های مختلف عصاره فنولی ذرت خوشه ای طی ۹۶ساعت

به علت حضور آنتوسیانین ها ، عصاره فنولی دارای رنگ قرمز بوده و حلالیت نسبتا کمی در چربی مذکور داشت. در غلظت های (ppm)۵۰۰ و ۱۰۰۰ شدت رنگ نسبت به غلظت (ppm) ۲۰۰۰ آن کمتر و حلالیت نسبتا بیشتر بود. اما با مقایسه اندیس پراکسید و تیوباربیتوریک اسید در غلظت های مختلف (ppm) ۱۰۰۰،۵۰۰ و ۲۰۰۰ این نتیجه حاصل شد که افزایش غلظت عصاره در تیمارها سبب کاهش معنی دار در این دو متغیر شده است و حاکی از آن است که غلظت (ppm) ۲۰۰۰ در زمان یکسان (۹۶ ساعت) اندیس TBA را در میزان کمتری نگه داشته است.البته لازم بذکر است، این احتمال وجود دارد که عصاره فنولی ذرت خوشه ای در غلظت های بالاتر از این مقدار اثر ممانعت کنندگی بیشتری بر اکسیداسیون نشان می داد. لذا، تعیین غلظت بهینه (ppm)۲۰۰۰ نسبت به سایر غلظت های مذکور بوده وغلظت بهینه مطلق به حساب نمی آید. نتایج مطالعات Sikwese و Duodu در سال ۲۰۰۶ مبنی بر اثر آنتی اکسیدانی عصاره فنولی پوسته ذرت خوشه ای بر روغن آفتابگردان نشان می دهد عصاره فنولی پوسته ذرت خوشه ای در غلظت (ppm) ۱۰۰۰ بیشترین اثر آنتی اکسیدانی را گذاشته است. زیرا در این مطالعه فقط از واریته های ذرت خوشه ای باژن B_1_B_2 که علاوه بر سایر ترکیبات فنولی ذکر شده، حاوی تانن های تراکمی نیز می باشد، استفاده شده است.

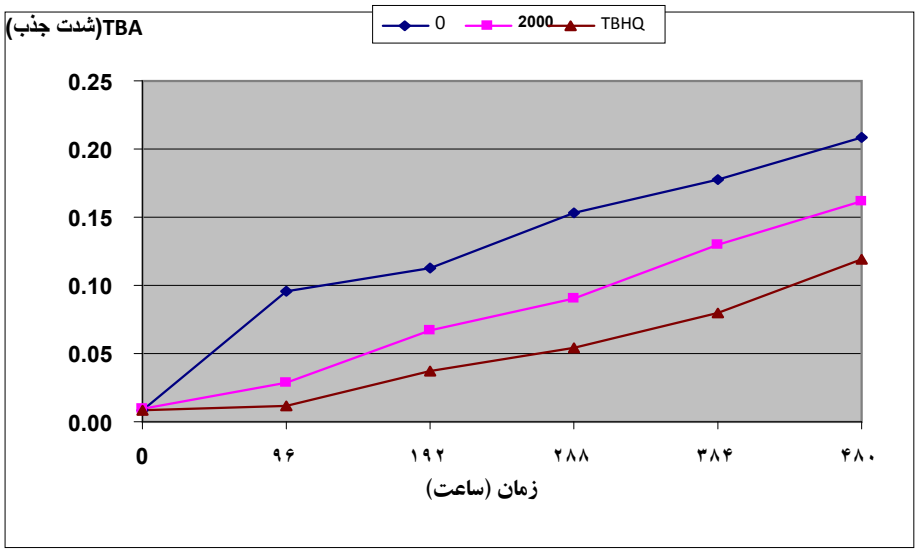
مقایسه اثر عصاره فنولی ذرت خوشه ای و آنتی اکسیدان TBHQ بر روند پیشرفت اکسیدا سیون

بدین منظور از غلظت های(ppm) ۲۰۰۰ عصاره فنولی و(ppm) ۱۰۰ TBHQ استفاده شد. در واقع، در این مرحله هدف این بود که کدام یک از آنتی اکسیدان های طبیعی یا مصنوعی توانسته اند در یک دمای ثابت (۸۰ درجه سانتی گراد) و زمان نگهداری ۴۸۰ ساعت مؤثرتر عمل کند و در کاهش فساد اکسیداتیو مثمر ثمرتر باشد. با مطالعه مقالات متعدد مشاهده شد که در اکثر آنها از غلظت (ppm) ۱۰۰ آنتی اکسیدان TBHQ برای مقایسه با آنتی اکسیدان های طبیعی استفاده شده است. لذا در این تحقیق نیز ترجیح داده شد تا از غلظت متعارف TBHQ استفاده گردد. شکل ۴ تغییرات اندیس پراکسید را در دوتیمار مختلف (عصاره استونی وTBHQ) و نمونه شاهد در طی ۴۸۰ ساعت نشان می دهد.با درنظر گرفتن آن می توان مشاهده کرد که در دوتیمار فوق با گذشت زمان میزان اندیس پراکسید در سطح $P\leq$ ۰/۰۵ به طور معنی دار افزایش یافته است. اما در تیمار با آنتی اکسیدان مصنوعی TBHQ این افزایش با سرعت کمتری صورت گرفته است. بر طبق همین شکل، قابل رویت است که اندیس پراکسید نمونه شاهد طی مدت نگهداری به طور معنی دار نسبت به تیمارهای دیگر روبه افزایش بوده است. همچنین در هر زمان (۰، ۹۶، ۱۹۲، ۲۸۸، ۳۸۴ و ۴۸۰ ساعت) تیمار با آنتی اکسیدان مصنوعی TBHQ در کاهش اندیس پراکسید موثرتر عمل کرده است.

شکل ۵ تغییرات اندیس TBA را در دو تیمار مختلف (عصاره استونی و TBHQ) و نمونه شاهد در طی زمان ۴۸۰ ساعت نشان می‌دهد. طبق آن، اندیس TBA در نمونه شاهد و دو تیمار فوق در طی نگهداری در سطح $P\leq$ ۰/۰۵ به طور معنی دار درحال افزایش بوده که این روند در نمونه شاهد به طور معنی دار بیشتر از دو تیمار دیگر بوده است. همچنین در نمونه تیمارشده با آنتی اکسیدان مصنوعی TBHQ روند افزایشی اندیس TBA طی زمان نگهداری با سرعت کمتری نسبت به نمونه شاهد و نمونه تیمار شده با عصاره اتفاق افتاده است و در هر زمان آنتی اکسیدان مصنوعی TBHQ نقش موثرتری در کاهش اندیس TBA داشته است.



شکل ٤- روند تغییرات اندیس پراکسید در چربی دنبه در دو تیمار مختلف (عصاره و TBHQ) طی ٤٨٠ ساعت در دمای ٨٠ درجه



شکل۵- روند تغییرات اندیس TBA در چربی دنبه در دوتیمار مختلف (عصاره و TBHQ) طی ۴۸۰ساعت دردمای ۸۰درجه

تفاوت معنی دار اندیس پراکسید و تیوباربیتوریک اسید در نمونه شاهد نسبت به نمونه های تیمار شده با آنتی اکسیدان های طبیعی و مصنوعی و کاهش این پارامترها در نمونه های تیمار شده فوق حاکی از اثرات این دو نوع آنتی اکسیدان در ممانعت از فساد اکسیداتیو چربی دنبه بوده است. بالا بودن مقدار TBA نمونه شاهد نشانه بالا بودن فساد بوده همان طور که مقدار پراکسید آن نیز بیشتراست. پایین بودن میزان TBA در نمونه های حاوی آنتی اکسیدان احتمالاً به دلیل اثرآنتی اکسیدان ها در کاهش اکسایش و تولید محصولات ثانویه بوده است. چرا که زمانی که مقادیر هیدروپراکسید در چربی کم باشد سرعت تشکیل این ترکیبات سریع تر از شکستگی آنهاست. در این حالت میزان هیدروپراکسیدها در چربی شروع به بالا رفتن می کند. با گذشت زمان و افزایش غلظت هیدروپراکسیدها، این ترکیبات سریعاً شکسته می شوند و به دنبال چنین مکانیزمی مقادیر هیدروپراکسیدها کاهش می یابند. باید توجه داشت که در این حالت سرعت تجزیه آنها سریع تر از سرعت تشکیل است (قراچورلو و همکاران، ۱۳۸۶).

عصاره استونی حاوی مقادیر قابل توجهی از ترکیبات فنولی بوده، به طوری که عصاره حاصله می تواند از تشکیل محصولات اولیه و ثانویه در چربی دنبه ممانعت کند لذا ، از آن می توان به عنوان منبعی ارزان برای آنتی اکسیدانهای طبیعی استفاده نمود. مطالعات Sikwese & Duodu در سال ۲۰۰۶ بیانگر همین مطلب است که آنتی اکسیدان مصنوعی TBHQ در ممانعت از اکسیداسیون روغن آفتابگردان موثرتر از عصاره فنولی پوسته ذرت خوشه ای عمل کرده اما ترکیبات فنولی دانه ذرت خوشه ای نیز توانسته با مهار کردن رادیکالها و بلوکه کردن فلزات نقش بسزای خود را ایفا نماید.

همچنین نتایج مطالعات قنبری و همکاران در سال ۱۳۸۵ مبنی بر اثر آنتی اکسیدانی عصاره مریم گلی در افزایش زمان ماندگاری چربی دنبه، روغن کانولا و پنبه دانه مبتنی بر آن است که علیرغم فعالیت بالای آنتی اکسیدانی TBHQ، نمی توان نقش عصاره فنولی مریم گلی را در ممانعت از اکسیداسیون کمتر از آن دانست.

قدردانی

نویسندگان از تلاش های آقای مهندس صفافر در انجام آزمون های HPLC و خانم مهندس امیدی به سبب در اختیار گذاشتن بعضی از مواد مورد استفاده در این پژوهش قدردانی می نمایند.

منابع

اهدایی، ب.، ۱۳۷۲، اصلاح نبات. انتشارات دانشگاه شهید چمران. چاپ اول : ۱۷۵-۱۶۰.

فاطمی، ح.، ۱۳۷۸، شیمی مواد غذایی. انتشارات شرکت سهامی انتشار. چاپ اول :۲۰۲-۱۳۷.

قاسمی افشار، پ.، قوامی، م.، قراچورلو، م.، آبرومند، پ. و الهامی راد، ا. ح.، ۱۳۸۶، بررسی اثر فرآیند تصفیه بر ویژگی های کیفی تالواولئین. مجله علوم و صنایع غذایی، سال پنجم، شماره یک : ۲۹-۱۶.

قراچورلو، م.، قوامی، م. و آبرومند، پ.، ۱۳۸۶، ارزیابی کیفیت فراکسیون های تالو. مجله علوم و صنایع غذایی، سال چهارم، شماره سوم : ۱۵-۲.

قنبری، ر.، قوامی، م. و صفافر، ح.، ۱۳۸۵، بررسی امکان تولید آنتی اکسیدان طبیعی از گیاه مریم گلی وتأثیر آن در افزایش زمان ماندگاری روغن دنبه، کانولا و پنبه دانه. مجله علوم و صنایع غذایی، سال سوم، شماره سوم : ۲۶-۱۸.

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران.،۱۳۸۴، روش های اندازه گیری پایداری روغن ها و چربی های خوراکی در برابر اکسید شدن، استاندارد ملی ایران، شماره ۳۷۴۴، چاپ اول.

Awika, J. M., Rooney, L. W., Wu, X., Prior, R. L., and Cisneros-Zevallos, L., 2003, Screening Methods to Measure Antioxidant Activity of Sorghum (*Sorghum bicolor*) and Sorghum Products. *J. Agric. Food Chem*. (51):6657-6662.

Beta, T., Rooney, L. W., Marovatsanga, L. T. and Taylor, J. R. N., 1999, Phenolic compounds and kernel characteristics of Zimbabwean sorghums. *J. Sci .Food & Agri*. (79):1003–1010.

Bocco, A., Cuvelier, M. E., Richard, H. and Berest, C., 1998, Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *J. Agric. Food Chem*., 2123-2129.

Choi, Y., Jeong, H. S. and Lee, J., 2007, Antioxidant activity of methanolic extracts from some grains consumed in Korea. *Food Chem*. (103): 130–138.

Diko, M. H. and Gruppen, H., 2006, Phenolic Compounds and Related Enzymes as Determinants of Sorghum for Food Use. *Biotech. and Mol. Biol. Rev.* (1): pp.21-38.

Dykes, L. and Rooney, L. W., 2006, Sorghum and millet phenols and antioxidants. *J. Cereal Sci.* (44):236-251.

Fasseas, M. K., Mountzouris, K. C., Tarantilis, P. A., Polissiou, M. and Zevas, G., 2007, Antioxidant activity in meat treated with oregano and sage essential oils. *Food Chem.*, 106, 1188-1194.

Firestone, D., 1994, Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society, Peroxide Value of Oils and Fats (Titration Method), 4th ed., AOCS Press, Champaign, IL.

Hahn, D. H., Rooney, L. W. and Earp, C. F., 1984, Tannins and phenols of sorghum. *Cereal Foods World*. (29):776-779.

Rossell, B., 2001, Animal Carcass Fats, Vol.2, Oils and Fats Series, 2nd ed. Leatherhead Publishing, U.K. pp: 520-527.

Salunkhe, D. K., Chavan, J. K., Adsule, R. N. and Kacam, S. S., 1992, World oil seed, Varno Strand Reinhold, New York. USA. pp: 420.

Shahidi, F. and Wanasundara, P. K. J. P. D., 1992, Phenolic antioxidants. *Crit. Rev. in Food Sci & Nutr*. (32):67-103.

Shahidi, F., 2005, Bailey's Industrial Oil and Fat Products. Animal Fats.6th ed. AJohn Wiley&Sons, Inc., Publication .USA. pp: 161-206.

Sikwese, F. E. and Duodu, K. G., 2006, Antioxidant effect of a crude phenolic extract from sorghum bran in sunflower oil in the presence of ferric ions. *Food Chem*. (104): 324-331.

Ünsal, M., Go kalp, H. Y. and Nas, S., 1995, Basic chemical characteristics of fresh, non-packed and vaccum-packed sheep-tail and tail-fat stored frozen for different periods. *Meat Sci*. (63): 231-238.

Ünsal, M., 1996, Some Properties of Fresh Tail Fat Treated with Different Technological Process and Determination of Some Changes in Some Properties during Storage under Various Conditions. Doctorate thesis, Atatürk University Graduate Institute of Science, Erzurum, Turkey. pp: 50-157.

Ünsal, M. and Aktas, S., 2003, Fractionation and characterization of edible sheep tail fat. *Meat Sci*. (63):235-239.

Wasika, R. D., Hugo, L. F. and Rooney, L. W., 1992, Practical methods to determine the presence of tannins in sorghum. *J. Appl. Poultry Res*. (1): 122-128.