نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 10، شماره 3، پاییز 1393، ص. 240-232

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 10, No. 3, Fall 2014, p. 232-240

بررسی برهم‌کنش آنتی‌اکسیدانی ترکیب عصاره‌های چای سبز و رزماری

الهام رنجبر ندامانی [1]- علیرضا صادقی ماهونک [2*]- محمد قربانی [3]- مهدی کاشانی‌نژاد [4]

تاریخ دریافت:1391/12/11
تاریخ پذیرش:1392/7/2

چکیده

هدف از مطالعه حاضر بررسی و مقایسه ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و انواع برهم‌کنش (سینرژیسم و آنتاگونیسم) عصاره‌های چای سبز و رزماری بود. نتایج حاصل از آزمون‌های اندازه‌گیری ترکیبات فنلی کل، مهار رادیکال آزاد DPPH، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل، قدرت احیاءکنندگی و آزمون توانایی جلوگیری از اکسیداسیون روغن سویا نشان داد که عصاره چای سبز به شکل معنی‌داری ($p<0/05$) بهتر از عصاره رزماری عمل نمود و هر دو عصاره نسبت به آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT مؤثرتر بودند. عصاره‌های ترکیبی در این آزمون‌ها عملکرد متفاوتی از خود نشان دادند؛ به طوریکه در آزمون‌های مهار رادیکال آزاد DPPH و قدرت احیاءکنندگی اثر سینرژیستی معنی‌دار ($p<0/05$) مشاهده شد، اما در آزمون‌های ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل و جلوگیری از اکسیداسیون روغن سویا برهم‌کنش آنها از نوع آنتاگونیسم بود؛ گرچه حتی در زمان ایجاد اثر آنتاگونیستی، عصاره‌ها نسبت به آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT عملکرد بهتری نشان دادند و بنابراین عصاره‌های طبیعی را می‌توان به عنوان جایگزین مناسب برای BHT معرفی نمود.

واژه‌های کلیدی: چای سبز، رزماری، سینرژیسم، آنتاگونیسم

مقدمه

واکنش‌های اکسایشی برای ادامه حیات لازم هستند اما گاهی می‌توانند مخرب باشند. گونه‌های اکسیژن فعال مانند پراکسید هیدروژن، اسید هیپوکلرو، رادیکال‌های آزاد مانند هیدروکسیل و سوپراکسید می‌توانند با چربی‌ها، پروتئین‌ها، DNA و RNA واکنش داده و آنها را تخریب نمایند (Fang *et al.*, 2002). هر ماده‌ای که در مقادیر کم نسبت به سوبسترای اکسید شونده به شکل معنی‌داری اکسیداسیون سوبسترا را به تأخیر انداخته یا مانع آن شود آنتی‌اکسیدان است (Halliwell & Gutteridge, 1990). استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی به دلیل اثرات سمی و سرطان‌زایی محدود شده است؛ از این‌رو تمایل به یافتن آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی عاری از اثرات زیان‌بار رو به افزایش است (Sheng *et al.*, 2011). رزماری (Rosmarinus officinalis) از خانواده Lamiaceae به عنوان گیاهی با خواص آنتی‌اکسیدانی به خوبی شناخته‌شده و به عنوان طعم‌دهنده در مواد غذایی، آشامیدنی و با اهداف پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Shylaja *et al.*, 2004). ترکیبات عمده در عصاره رزماری عبارتند از اسید کارنوسیک، کارنوسول و اسید رزماریک (Cuvelier *et al.*, 1994) که با اثر بر فعالیت یکدیگر منجر به ایجاد خاصیت آنتی‌اکسیدانی و حذف رادیکال آزاد می‌شوند (Romano *et al.*, 2009). گیاه چای (Camellia sinensis) از خانواده Theaaceae بوده و پلی‌فنل‌های موجود در آن به دلیل وجود گروه هیدروکسیل دارای خاصیت به دام‌اندازی رادیکال آزاد هستند (Foster, 2002). سه گروه عمده پلی‌فنلی در چای وجود دارد: کاتچین‌ها، تئافلاوین‌ها و تئاروبیگن‌ها.

وقتی چند ماده دارای ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی با هم ترکیب شوند، اجزاء موجود در ترکیب واکنش‌های متفاوتی نسبت به هم نشان داده و درنتیجه امکان بروز اثرات متفاوتی در ترکیب حاصل نسبت به حالت قبل به وجود می‌آید. اثر مشاهده شده می‌تواند به صورت سینرژیسم، آنتاگونیسم یا ادیتیو (جمع‌پذیری) باشد. سینرژیسم بین آنتی‌اکسیدان‌ها پدیده‌ای است که در آن مخلوط چند آنتی‌اکسیدان قدرت آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به قدرت آنتی‌اکسیدانی هر کدام به تنهایی داشته باشد. نکته حائز اهمیت این است که برهم‌کنش‌ها ویژگی‌های قطعی برای عصاره‌های گیاهی یا داروها نبوده و ویژگی‌های گسترده‌ای هستند که به شدت به نحوه توصیف اثر مورد انتظار و میزان و نسبت به کارگیری اجزاء وابسته‌اند. بنابراین، برهم‌کنش‌ها به صورت ریاضی تعریف شده و الزاماً بیولوژیکی نیستند

1، 2، 3 و 4- دانشجوی کارشناسی ارشد و دانشیاران و استاد دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
(* - نویسنده مسئول: Email: Sadeghiaz@yahoo.com)

(Borgert *et al.*, 2005). ایمن و طبیعی بودن آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی بر اساس این حقیقت است که این ترکیبات در مقادیر اندک در مواد گیاهی وجود دارند و اگر قرار است به مواد غذایی اضافه شوند باید جنبه‌های ایمنی آنها مد نظر قرار گیرد. با دستیابی به اثرات سینرژیستی در فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی می‌توان از مقادیر کمتری از هر عصاره استفاده نموده و از اثرات زیانبار استفاده از مقادیر زیاد یک عصاره به تنهایی جلوگیری نمود (Jain *et al.*, 2011). به طور کلی دستیابی به اثرات سینرژیستی در ترکیب عصاره‌ها به معنی استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های ایمن، ارزان و کارآمد است.

هدف از این مطالعه مقایسه ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی چای سبز و رزماری در مقابل آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT و بررسی انواع برهم‌کنش‌های احتمالی در صورت ترکیب این دو عصاره و امکان استفاده از این عصاره‌های انفرادی و ترکیبی در جلوگیری از اکسیداسیون روغن سویا بود.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی نمونه‌ها و استخراج

چای سبز از مزارع رامسر و رزماری از دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان تهیه شد. نمونه‌ها پس از خشک‌شدن در دمای محیط (برای حفظ حداکثر ترکیبات فنلی)، توسط آسیاب پودر شده و از الک با مش 60 عبور داده‌شدند. عصاره اتانولی چای سبز پس از 24 ساعت غوطه وری 10 گرم پودر چای سبز در 100 میلی لیتر اتانول 95% و در دمای محیط به دست آمد (Gramza, 2006) و عصاره متانولی رزماری به روش Tavassoli & Emam Jomeh (2011) و با نسبت 20:1 پودر رزماری به متانول خالص و به مدت 5 ساعت در دستگاه سوکسله و دمای 50 درجه سانتیگراد استخراج شد (انتخاب نوع حلال بر اساس منابع موجود، آزمون و خطا با حلالهای متفاوت و دستیابی به عصاره‌ای با فعالیت آنتی‌اکسیدانی مناسب انجام شد). عصاره‌های حاصل پس از صاف شدن، توسط دستگاه تبخیرکننده چرخان تحت خلاء (مدل IKA, RV05 Basic) تغلیظ شده و با دستگاه خشک‌کن انجمادی (مدل Operun, FDB550) خشک شدند. نمونه‌های خشک‌شده تا زمان مصرف در دمای 18- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. روغن سویا از کارخانه عالیا گلستان کردکوی تهیه شد.

آماده سازی عصاره‌ها

نمونه‌های مورد آزمون به شرح زیر تهیه شدند.

عصاره‌های انفرادی: چای سبز، رزماری و آنتی اکسیدان سنتزی BHT [1] در غلظتهای 50، 100، 150، 200 و 250 میکروگرم در میلی‌لیتر.

عصاره های ترکیبی چای سبز و رزماری: ترکیب عصاره‌ها در حالات مختلف برای دستیابی به غلظت‌های 50، 100، 150، 200 و 250 میکروگرم در میلی‌لیتر. نسبت‌های ترکیبی برای ترکیب دو عصاره به صورت 1:1، 2:1، 1:2، ۱:۳،۲:۲، 1:3، 4:1 و 1:4.

اندازه گیری ترکیبات فنلی کل عصاره‌ها

میزان ترکیبات فنلی کل موجود در عصاره‌ها به روش فولین سیوکالته (Arabshahi & Urooj, 2007) اندازه‌گیری شد. مقادیر فنل کل عصاره‌ها با توجه به معادله خط حاصل از نمودار استاندارد، به صورت معادل گالیک اسید بیان شد:

$$A=0/023\ C+0/109,\ R^2=0/997 \qquad (1)$$

A جذب نمونه در 760 نانومتر و C غلظت معادل اسید گالیک (میکروگرم بر میلی لیتر) است.

آزمون مهار رادیکال آزاد DPPH [2]

توانایی مهار رادیکال آزاد توسط عصاره‌ها بر اساس روش Arabshahi & Urooj (2007) انجام شد. 3 میلی‌لیتر از نمونه به 1 میلی‌لیتر محلول متانولی 1 میلی‌مولار DPPH اضافه شد. نمونه‌ها به مدت 30 دقیقه در دمای محیط و تاریکی قرار گرفت.جذب نمونه‌ها در 517 نانومتر اندازه‌گیری و درصد مهار رادیکال از معادله زیر محاسبه شد:

$$\%\text{مهار رادیکال آزاد} = \frac{\text{جذب نمونه - جذب شاهد}}{\text{جذب نمونه}} \times 100 \qquad (2)$$

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل

این آزمون تبدیل مولیبدات (IV) به مولیبدات (III) توسط نمونه و ایجاد کمپلکس سبز رنگ فسفات مولیبدات در محیط اسیدی است (Prieto *et al.*, 1999). 0/1 میلی‌لیتر محلول نمونه با 1 میلی لیتر محلول معرف (سولفوریک اسید 0/6 مولار، سدیم فسفات 28 میلی‌مولار و آمونیوم مولیبدات 4 میلی‌مولار) ترکیب شده و به مدت 90 دقیقه در دمای 95 درجه سانتیگراد قرار گرفت. جذب نمونه‌ها پس از سردشدن در 695 نانومتر اندازه‌گیری شد.

قدرت احیاءکنندگی

اساس این آزمون برای بررسی قدرت احیاء اتم آهن +3 توسط عصاره‌ها انجام شد (Yildirim *et al.*, 2001). 1 میلی‌لیتر از محلول نمونه با 2/5 میلی‌لیتر بافر فسفات (0/2 مولار، 6/6 pH) و 2/5

1- Butylated hydroxytoluene

2 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

میلی‌لیتر پتاسیم فری سیانید ($K_3Fe(CN);10g\ l^{-1}$) ترکیب شد و به مدت 30 دقیقه در 50 درجه سانتیگراد حرارت دید. سپس 2/5 میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید ($100\ g\ l^{-1}$) اضافه شده و به مدت 10 دقیقه سانتریفوژ شد. نهایتاً 2/5 میلی لیتر از محلول سطحی با 2/5 میلی‌لیتر آب مقطر و 0/5 میلی‌لیتر کلرید آهن ($100\ g\ l^{-1}$) ترکیب شده و جذب نمونه‌ها در 700 نانومتر اندازه‌گیری شد. جذب بیشتر نشانگر قدرت احیاءکنندگی بیشتر است.

اثر سینرژیستی بین عصاره‌ها

برای مقایسه قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های ترکیبی با عصاره‌های انفرادی، فاکتور SE [1] که از تقسیم مقادیر تجربی حاصل از آزمون‌ها بر مقادیر محاسبه شده برای ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها به‌دست‌می‌آید مورد بررسی قرار گرفت. مقادیر محاسبه شده به صورت میانگین فعالیت آنتی‌اکسیدانی دو عصاره در هر آزمون به دست آمد (Queiros *et al.*, 2009).

$$SE=\frac{\text{مقدار تجربی}}{\text{مقدار محاسبه شده}} \quad (3)$$

مقادیر SE بیشتر از 1 نشان‌دهنده اثر سینرژیستی، مقادیر برابر با 1 نشان‌دهنده اثر افزایشی و مقادیر کمتر از 1 نشان‌دهنده اثر آنتاگونیستی است (Fuhrman *et al.*, 2000).

آنالیز ترکیبات روغن توسط GC [2]

برای تعیین پروفایل اسیدچربی روغن سویا از دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC Agilent Technology 6890N) با ستون به طول 60 متر، قطر داخلی 0/25 میلی‌متر و ضخامت لایه 0/25 میکرومتر و از نوع Agilent Technology DB-23 استفاده‌شد. برنامه دمایی نیز به این ترتیب بود: دمای ابتدایی آون 180 درجه سانتیگراد، توقف در این دما 20 دقیقه، افزایش دما تا 220 درجه سانتیگراد با گرادیان دمایی 4 درجه سانتیگراد در دقیقه، افزایش دما تا 250 درجه سانتیگراد با شیب دمایی 3 درجه سانتیگراد در دقیقه و توقف در این دما 8 دقیقه. از گاز نیتروژن با خلوص 99/999% به عنوان فاز متحرک استفاده‌شد.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی در روغن سویا

بر اساس نتایج مراحل قبل، تأثیر افزودن یک نمونه دارای اثر سینرژیستی و یک نمونه دارای اثر آنتاگونیستی به همراه نمونه‌های انفرادی مربوط به نمونه‌های ترکیبی منتخب به همراه آنتی‌اکسیدن سنتزی BHT در جلوگیری از اکسیداسیون روغن سویا مورد بررسی قرارگرفت. نمونه‌ها به مدت 20 روز در دمای 60 درجه قرارگرفتند (اکسیداسیون تسریع‌شده). عدد پراکسید هر 5 روز یکبار اندازه‌گیری شد (Azizkhani & Zandi, 2009).

اندازه‌گیری عدد پراکسید در روغن سویا

این آزمون برای اندازه‌گیری محصولات اولیه اکسیداسیون روغن بر اساس روش AOCS (2003) انجام شد. دوره القاء به عنوان تعداد روزهای مورد نیاز برای رسیدن عدد پراکسید به 20 میلی‌اکی‌والان اکسیژن بر کیلوگرم (با توجه به اصل عمومی فساد روغن در این نقطه) محاسبه شد (Economou *et al.*, 1991).

اثر سینرژیستی در سیستم روغن

درصد سینرژیسم به صورت زیر محاسبه شد (Bishov *et al.*, 1977):

$$Syn\% = \frac{(IPm - IPc) - (IP_1 - IPc) - (IP_2 - IPc)}{(IPm - IPc)} \quad (4)$$

IPm و IPc به ترتیب دوره القاء روغن حاوی ترکیب آنتی‌اکسیدان‌ها و دوره القاء نمونه کنترل فاقد آنتی‌اکسیدان و IP_1 و IP_2 دوره القاء روغن حاوی یک نوع آنتی‌اکسیدان است. مقادیر مثبت نشان‌دهنده اثر سینرژیستی و مقادیر منفی نشان‌دهنده اثر آنتاگونیستی است.

فاکتور پایداری

ارزیابی فاکتورپایداری نمونه های آنتی‌اکسیدانی انفرادی و ترکیب آنها از رابطه ذیل محاسبه شد (Yanishlieva & Marinova, 1996).

$$\text{فاکتور پایداری} = \frac{\text{دوره القاء در حضور آنتی اکسیدان}}{\text{دوره القاء بدون حضور آنتی اکسیدان}} \quad (5)$$

تجزیه و تحلیل داده ها

آزمون‌ها در سه تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی و به روش آزمون فاکتوریل، آنالیز واریانس ANOVA و مقایسه میانگین دانکن انجام شد.

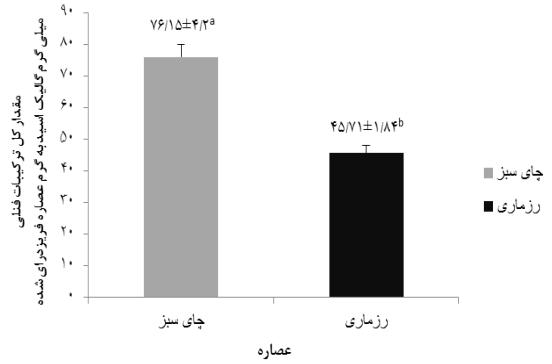
نتایج و بحث

اندازه گیری ترکیبات فنلی کل عصاره‌ها

نتایج حاصل از مقایسه ترکیبات فنلی کل عصاره‌های چای سبز و رزماری در شکل 1 آمده است. بر اساس مقادیر اندازه‌گیری‌شده، فنل

1- Synergistic Effect
2- Gas Chromatography

کل عصاره چای سبز به شکل معنی‌داری (P<0/05) بیشتر از فنل کل عصاره رزماری بود.



شکل 1- مقایسه میانگین فنل کل (میلی‌گرم گالیک‌اسید در گرم عصاره فریزدرای شده) عصاره‌های چای سبز و رزماری

فنل‌ها به دلیل توانایی مهار رادیکال‌های آزاد توسط گروه‌های هیدروکسیل خود ترکیبات گیاهی مهمی هستند (Hatano *et al.*, 1989). در مطالعات مختلف مقادیر متفاوتی برای میزان ترکیبات فنلی استخراج شده توسط حلال‌های مختلف ارائه شده است. این مقادیر مختلف استخراج به نوع گیاه و منطقه‌ای که در آن کشت شده و شرایط استخراج بستگی دارد.

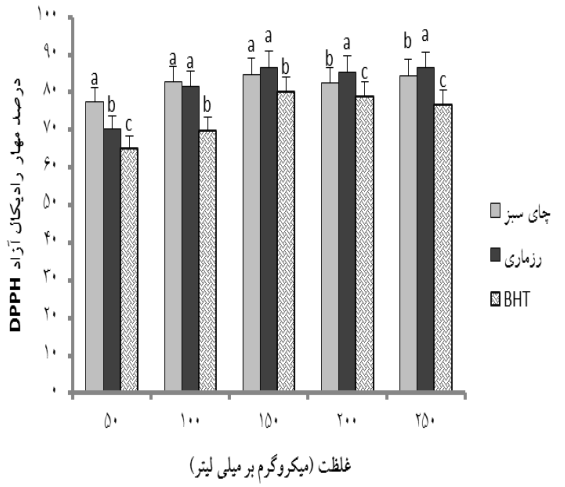
Gramza و همکاران (2005 و 2006) به روش مشابه این مطالعه از دو حلال اتانول و آب برای استخراج عصاره چای استفاده نموده و بیشترین میزان کاتچین استخراج شده را توسط اتانول گزارش نمودند. Perez و همکاران (2007) از سه حلال آب، اتانول و متانول برای استخراج عصاره رزماری استفاده نمودند.

Tavassoli & Emam Jomeh (2011) فنل کل عصاره متانولی رزماری را 49/9 میلی‌گرم گالیک اسید در گرم نمونه محاسبه نمودند. عامل دیگری که در آماده‌سازی نمونه‌ها در این مطالعه مورد توجه قرار گرفت، روش خشک کردن نمونه‌ها بود.

Rhim و همکاران (2009) تأثیر روش خشک کردن بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه جیوانگ[1] را مطالعه نموده و بیان نمودند که اکثر روش‌های خشک کردن (شامل هوای داغ و خشک کردن خورشیدی) اثرات نامطلوبی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارند. درنتیجه، یک روش خشک کردن مناسب پیش از استخراج نمونه‌ها می‌تواند اثر بارزی بر بازیابی ترکیبات آنتی‌اکسیدان داشته‌باشد (Anwar *et al.*, 2013). در این مطالعه شرایط خشک کردن در دمای محیط و جریان هوا بود درنتیجه انتظار می‌رود که کمترین تخریب در مورد ترکیبات فعال نمونه‌ها روی داده باشد.

رادیکال آزاد DPPH

توانایی عصاره‌ها در مهار رادیکال آزاد DPPH در شکل 2 نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود عصاره‌های مورد آزمون در تمامی سطوح غلظت به شکل معنی‌داری (P<0/05) توانایی بیشتری در مهار رادیکال آزاد DPPH در مقایسه با آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT دارند. مقادیر مهار رادیکال آزاد توسط عصاره‌ها تا غلظت 150 میکروگرم بر میلی‌لیتر وابسته به غلظت بوده اما پس از آن افزایش غلظت تأثیری در افزایش توانایی مهار رادیکال آزاد DPPH توسط عصاره‌ها نداشت. همچنین در غلظت‌های کمتر، اثر عصاره چای سبز بیشتر از عصاره رزماری بود اما با افزایش غلظت، این روند معکوس شد. مهار رادیکال آزاد توسط نمونه‌های آنتی‌اکسیدان به دلیل فعالیت هیدروژن دهندگی آنان است (Bidchol *et al.*, 2011). در این مطالعه، فعالیت ضدرادیکالی مشاهده شده با میزان ترکیبات فنلی عصاره‌های مورد بررسی مرتبط بود.

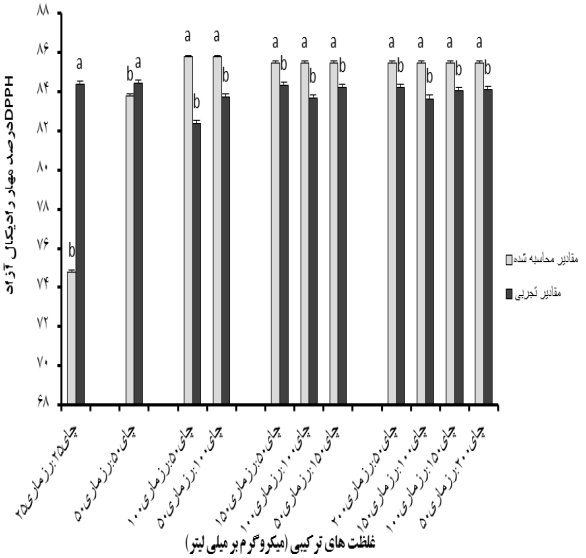


شکل 2- مقایسه میانگین درصد مهار رادیکال آزاد DPPH در غلظت‌های مختلف عصاره‌های چای سبز و رزماری و BHT
(حروف غیرمشابه در هر غلظت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال 0/05 است)

محاسبات اثر سینرژیستی بین این دو عصاره، در یک حالت ترکیبی، SE<1 و یک حالت SE=1 را نشان داد (به ترتیب SE = 1/12 و SE =1/00، برای غلظت‌های ترکیبی 50 و 100 میکروگرم بر میلی‌لیتر)که به ترتیب به معنی وجود اثر سینرژیستی و اثر جمع‌پذیری است (شکل 3). نتیجه حاصل به این معنی است که اثر سینرژیستی در زمانی مشاهده شد که از هر دو عصاره به میزان مساوی استفاده شده بود. نتایج نشان دهنده ارتباط بین غلظت ترکیبات انفرادی در SE بودند اما ارتباط خطی بین افزایش غلظت یک عصاره در ترکیب و ایجاد اثر سینرژیستی مشاهده نشد. مکانیسم پیشنهاد شده برای اثرات سینرژیستی مشاهده شده عبارت است از انتقال الکترون از ترکیب دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی ضعیف‌تر به ترکیب دارای فعالیت

1- Jiwhang

آنتی‌اکسیدانی قوی‌تر و در نتیجه احیاء مجدد ترکیب قوی‌تر که هیدروژن خود را به رادیکال آزاد محیطی داده و در نتیجه ادامه روند مهار رادیکال آزاد توسط این آنتی‌اکسیدان قوی‌تر. افزایش یا کاهش غلظت یک یا چند ترکیب ممکن است بر چنین برهم‌کنش‌هایی مؤثر بوده و فعالیت آنتی‌اکسیدانی را کاهش دهد.

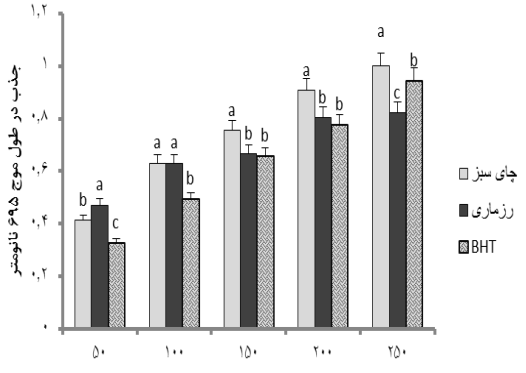


شکل 3- مقایسه میانگین مقادیر محاسبه شده و مقادیر تجربی برای درصد مهار رادیکال آزاد DPPH در نمونه‌های ترکیبی

(حروف غیرمشابه در هر غلظت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال 0/05 است)

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل

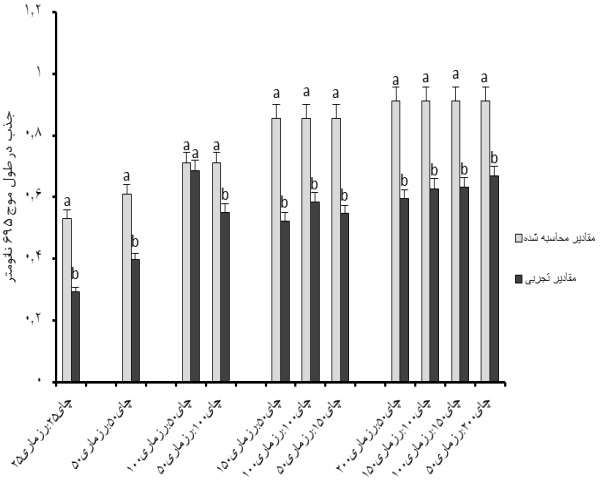
آزمون اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل به منظور کمی‌سازی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی محلول در آب و محلول در چربی انجام شد. نتایج حاصل از مقایسه ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره‌ها نشان داد که در تمامی غلظت‌ها (50 تا 250 میکرگرم بر میلی‌لیتر) عصاره‌های چای سبز و رزماری به شکل معنی‌داری ($P<0/05$) بهتر از آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT عمل نمودند (شکل 4). درنتیجه دو عصاره چای سبز و رزماری توانایی بیشتری در الکترون‌دهی داشته و می‌توانند به عنوان پایان دهنده زنجیره الکترون عمل نموه و گونه‌های فعال رادیکال آزاد را به انواع غیر رادیکالی پایدارتر تبدیل کنند (Dorman *et al.*, 2003). همچنین این دو عصاره وابستگی خوبی به غلظت نشان دادند به طوری‌که با افزایش غلظت این دو عصاره، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل آنها افزایش یافت. همچنین وابستگی عصاره چای سبز به غلظت، بیشتر از رزماری بود. Raghu و همکاران (2011) بیان نمودند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان مختلف متفاوت است و این تفاوت ممکن است به دلیل تفاوت ساختاری ترکیبات فنلی، یا الگوی هیدروکسیلاسیون و متیلاسیون آنها باشد. عصاره‌های گیاهی ممکن است حاوی سایر ترکیبات آنتی‌اکسیدان مانند پروتئین‌ها، آسکوربات، بتا کاروتن، آلفا توکوفرول و ... باشند که در افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل نقش دارند.



شکل 4- مقایسه میانگین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل غلظت‌های مختلف عصاره‌های چای سبز و رزماری و BHT

(حروف غیرمشابه در هر غلظت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال 0/05 است)

در آزمون ترکیب عصاره‌ها، در هیچ کدام از حالات ترکیبی اثر سینرژیستی دیده نشد و در تمامی حالات $SE> 1$ بود (شکل 5). اثر مشاهده شده به این معنی است که حالات مختلف ترکیب و افزایش غلظت عصاره‌ها در ترکیب، اثری در تغییر وضعیت برهم‌کنش این دو ماده ندارد. مواد غذایی مختلف دارای ترکیبات زیست فعال مختلف با ظرفیت‌های آنتی‌اکسیدانی متفاوت هستند.



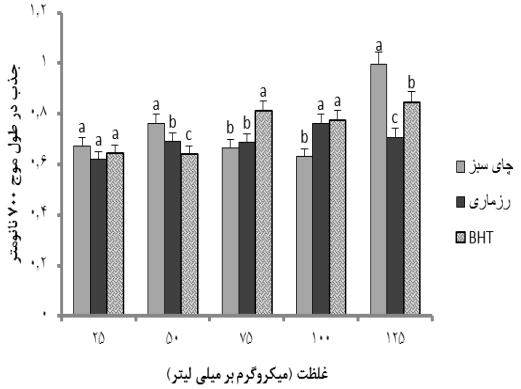
شکل 5- مقایسه میانگین مقادیر محاسبه شده و مقادیر تجربی برای ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در نمونه‌های ترکیبی

(حروف غیرمشابه در هر غلظت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال 0/05 است)

زمانیکه این مواد غذایی با هم مصرف شوند، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل ممکن است تحت تأثیر سینرژیسم، آنتاگونیسم یا جمع‌پذیری قرارگرفته و ویژگی‌های فیزیولوژیکی جدیدی ایجاد کند (Wang *et al.*, 2011). Heo و همکاران (2007) به بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل ترکیبات فنلی انفرادی و ترکیبی در سیستم‌های مدل پرداختند. ترکیبات فنلی مورد مطالعه در این پژوهش از انواع موجود در اکثر میوه‌ها و سبزیجات مانند کاتچین، کلروژنیک اسید، سیانیدین و ... بودند. عصاره‌ها به صورت انفرادی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل قابل توجهی نشان دادند در حالیکه در حالت ترکیب دو یا سه ماده فنلی هیچگونه اثر سینرژیستی مشاهده نشد و تنها اثر ایجاد شده، جمع‌پذیری بود.

قدرت احیاءکنندگی

همانگونه که در شکل 6 مشاهده می‌شود، در بین عصاره‌های مورد آزمون، تنها در غلظت 50 میکروگرم بر میلی‌لیتر برای چای سبز و رزماری و در غلظت 125 میکروگرم بر میلی‌لیتر برای چای سبز، به شکل معنی‌داری ($P<0/05$) قدرت احیاءکنندگی بیش از آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT بود. ویژگی‌های احیاءکنندگی به طور کلی مربوط به وجود ترکیبات احیاءکننده است (Pin, 1988) که با دادن هیدروژن، منجر به شکستن زنجیره رادیکال آزاد می‌شوند (Gordon, 1990).

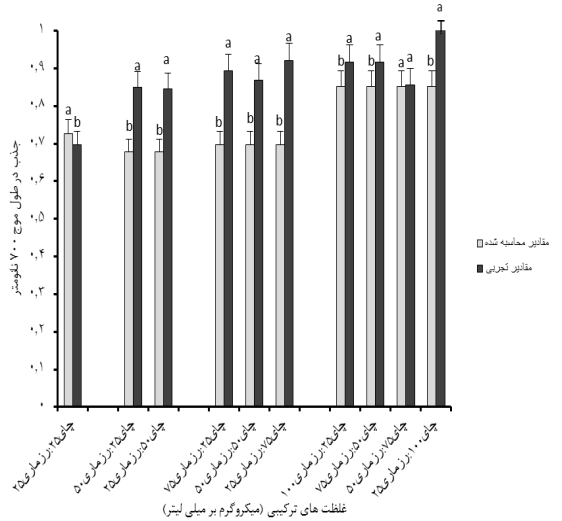


شکل 6- مقایسه میانگین قدرت احیاءکنندگی غلظت‌های مختلف عصاره‌های چای سبز و رزماری و BHT

(حروف غیرمشابه در هر غلظت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال 0/05 است)

با وجودیکه عصاره‌های مورد آزمون در غلظت‌های کم توانایی رقابت با BHT را نداشتند، اما پس از ترکیب عصاره‌ها، در تمامی حالات (به جز غلظت ترکیبی 50 میکروگرم بر میلی‌لیتر)، اثر سینرژیستی معنی‌داری ($P<0/05$) مشاهده شد (شکل 7). در غلظت ترکیبی 125 میکروگرم در میلی‌لیتر، با افزایش نسبت چای به رزماری، SE افزایش یافت. اما در غلظت بیشتر، این تغییر نسبت تأثیر زیادی در SE نداشت به غیر از زمانی که این نسبت به 1:4 رسید.

Hidalgo و همکاران (2010) به بررسی برهم‌کنش‌های ترکیبات فلاونوئیدی پرداختند. آنها بیان نمودند که گرچه نتایج به دست آمده از آزمون‌های مختلف متفاوت بود، شاید بتوان این تفاوت را با توجه به طبیعت شیمیایی و واکنش‌پذیری ترکیبات و طبیعت حلال‌ها توضیح داد. به طور کلی پتانسیل آنتی‌اکسیدانی ترکیبات مشخص به ساختار آنها وابسته است.



شکل 7- مقایسه میانگین مقادیر محاسبه شده و مقادیر تجربی برای قدرت احیاءکنندگی در نمونه‌های ترکیبی

(حروف غیرمشابه در هر غلظت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال 0/05 است)

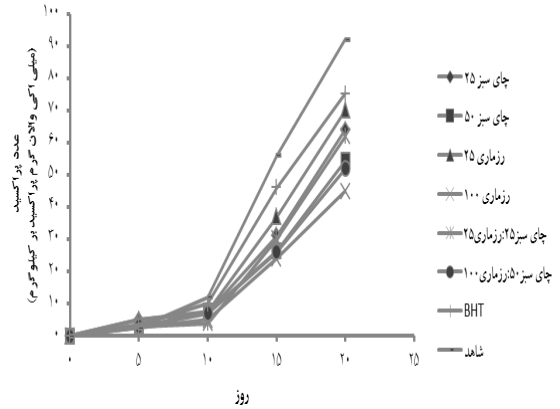
آنالیز ترکیبات روغن توسط GC

نتایج حاصل از کروماتوگرافی گازی نشان داد که پروفایل اسیدچربی روغن سویا شامل 10/86% پالمتیک اسید، 2/1% استئاریک‌اسید، 22/35% اولئیک‌اسید، 53/11% لینولئیک‌اسید، 6/73% لینولنیک‌اسید و 4/85% سایر اسیدهای چرب است.

اندازه‌گیری عدد پراکسید در روغن سویا

طی یک دوره زمانی 20 روزه، نتایج حاصل از اندازه‌گیری عدد پراکسید نمونه‌ها در فاصله 5 روز نشان دهنده توانایی نمونه‌های مورد آزمون در جلوگیری از تولید محصولات اولیه حاصل از اکسیداسیون روغن سویا بود. اختلاف معنی‌داری بین توانایی عصاره‌های مختلف با یکدیگر و با آنتی‌اکسیدان BHT دیده شد، که نشان دهنده توانایی این عصاره‌ها در به کارگیری به عنوان جایگزین BHT حتی در مقادیر بسیار کم است. بیشترین اثر ممانعت از تولید پراکسید توسط رزماری با غلظت 100 میکروگرم بر میلی‌لیتر بود؛ به طوریکه دوره القاء برای این نمونه 14 روز محاسبه شد (شکل 8 و جدول 1). در مورد نمونه‌های ترکیبی اثر سینرژیستی مشاهده نشد اما این

عصاره‌های ترکیبی نیز بهتر از BHT عمل نمودند؛ درنتیجه می‌توان گفت قرار گرفتن عصاره‌ها در شرایط سیستم پیچیده روغن بر فعالیت و نوع برهم کنش آنها مؤثر بوده است و باید آزمون اندازه‌گیری قدرت عصاره‌های انفرادی و ترکیبی در جلوگیری از اکسیداسیون روغن به عنوان یک آزمون مجزا و در کنار سایر آزمون‌ها بررسی شود. قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها در این آزمون به ترتیب، رزماری100>چای سبز50:رزماری 100>چای سبز50>چای سبز25:رزماری25>چای سبز25>رزماری25>BHT بود.



شکل 8- تغییرات عدد پراکسید تیمارهای منتخب در روغن سویا طی زمان نگهداری

جدول 1- دوره القاء، فاکتور پایداری و نوع برهم‌کنش عصاره‌ها

	دوره القاء	فاکتورپایداری	برهم کنش
چای سبز 25	12/6^{e}	1/16^{e}	
چای سبز 50	13/3^{c}	1/22^{c}	
رزماری 25	12/1^{f}	1/11^{f}	
رزماری 100	14^{a}	1/28^{a}	
چای سبز25:رزماری25	13^{d}	1/19^{d}	آنتاگونیسم
چای سبز50:رزماری100	13/4^{b}	1/23^{b}	آنتاگونیسم
BHT	11/5^{g}	1/06^{g}	
شاهد	10/9^{h}	-	

فاکتور پایداری

فاکتور پایدری محاسبه شده برای تیمارهای منتخب در جدول 2 آمده است. همانگونه که مشاهده می‌شود، بیشترین پایداری مربوط به عصاره رزماری با غلظت 100 میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده است. اما در غلظت‌های برابر، عملکرد چای سبز بهتر از رزماری محاسبه شد.

نتیجه گیری

در این مطالعه، ارتباط خوبی بین میزان ترکیبات فنلی و ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی مشاهده شد به طوریکه چای سبز با ترکیبات فنلی بیشتر، نتایج بهتری نسبت به رزماری نشان داد. این دو عصاره در دو آزمون مهار رادیکال آزاد DPPH و اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل بهتر از BHT عمل نمودند اما در آزمون قدرت احیاءکنندگی، توانایی رقابت با این آنتی‌اکسیدان سنتزی را نداشتند. در یک سیستم بیولوژیکی عوامل مختلفی بر نوع برهم‌کنش بین عصاره‌ها مؤثر است. غلظت و نسبت ترکیبی آنتی‌اکسیدان‌ها از عوامل مهم در این بحث هستند. عصاره‌های ترکیبی در آزمون‌های مختلف رفتار متفاوتی را نشان دادند. به طوریکه از بین حالات مختلف ترکیب، در آزمون مهار رادیکال آزاد DPPH فقط در دو حالت و در آزمون قدرت احیاءکنندگی، به استثناء یک حالت، در تمام حالات اثر سینرژیستی مشاهده شد اما در آزمون ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در هیچکدام از حالات، سینرژیسم رخ نداد، به نظر می‌رسد اثر سینرژیستی بیشتر در قدرت احیاءکنندگی آنتی‌اکسیدان‌های مختلف و تبدیل رادیکال آزاد آنتی‌اکسیدان‌ها به حالت طبیعی آنها نقش دارد. اندازه‌گیری دوره القاء در آزمون پراکسید نشان دهنده اثر آنتاگونیستی بین عصاره‌های منتخب بود، گرچه عملکرد بهتری نسبت به BHT نشان دادند. رفتار متفاوت عصاره‌ها پس از ترکیب و در آزمون‌های مختلف (مشابه مطالعات Queiros *et al*., 2009 و Viera *et al*., 2012) را می‌توان براساس مبانی شیمیایی، طبیعت و واکنش‌پذیری ترکیبات موجود در عصاره‌ها توجیه نمود. ممکن است پلیمریزاسیون بین ترکیبات مجزا منجر به تغییر رفتار آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها شود (Pinelo *et al*., 2004). همچنین ساختار شیمیایی و شکل فضایی مولکول‌ها در محیط بر عملکرد آنتی‌اکسیدان مؤثر است (Queiros *et al*., 2009). نهایتاً، تحقیق حاضر نشان‌دهنده توانایی عصاره‌های مورد آزمون و ترکیب آنها برای معرفی به عنوان جایگزین آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT بود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از دکتر حجازیان، مدیریت آزمایشگاه شیمی مواد غذایی اداره استاندارد ساری به دلیل مساعدت بی دریغ در انجام آزمایشات کمال تشکر را دارند.

منابع

American Oil Chemists' Society. 2003. AOCS. Official method C-d 8-53. Peroxide value. In Official Methods and Recommended Practices of the American Oil.

Anwar, F., Kalsoom, U., Sultana, B., Mushtaq, M., Mehmood, T., and Arshad, H.A. 2013. Effect of drying method and extraction solvent on the total phenolics and antioxidant activity of cauliflower (Brassica oleracea L.) extracts. International Food Research Journal. 20(2), 653-659.

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

Azizkhani, M., and Zandi, P. 2009. Effects of Some Natural Antioxidants Mixtures on Margarine Stability. World Academy of Science, Engineering and Technology. 49.

Bidchol, A. M., Wilfred, A., Abhijna, P., and Harris R. 2011. Free Radical Scavenging Activity of Aqueous and Ethanolic Extract of Brassica oleracea L. var. italica. Food Bioprocess Technology. 4, 1137-1143.

Bishov, S. J., Masuoka, Y., and Kapsalis, J. G. 1977. Antioxidant effect of spices, herbs and protein hydrolyzates in freeze-dried model systems: synergistic action with synthetic phenolic antioxidants. Journal of Food Processing and Preservation. 1, 153-166.

Borgert, C. J., Borgert, S. A., and Findley, K. C. 2005. Synergism, antagonism, or additivity of dietary supplements: Application of theory to case studies. Thrombosis Research. 117, 123-132.

Cuvelier, M. E., Berset, C., and Richard, H. 1994. Antioxidant Constituents in Sage (Salvia officinalis). Journal Agriculture Food Chemistry. 42, 665–669.

Dorman, H. J. D., Kosar, M., Kahlos, K., Holm, Y., and Hiltunen, R. 2003. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from Mentha species, hybrids, varieties, and cultivars. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51, 4563–4569.

Economou, K. D., Oreopoulou, V., and Thomopoulos, C. D. 1991. Antioxidant activity of some plant extracts of the family Labiatae. Journal of American Oil Chemists' Society. 68, 109-113.

Fang, Y.Z., Yang, S., and Wu G.Y. 2002. Free radicals, antioxidants and nutrition. Nutrition. 18, 872-879.

Foster, S. 2002. Green Tea (Camellia sinensis). Alternative Medicine Review Monographs. 200.

Fuhrman B., Volkova N., Rosenblat M., and Aviram M. 2000. Lycopene synergistically inhibits LDL oxidation in combination with vitamin E, glabridin, Rosmarinic acid, carnosic acid, or garlic. Antioxidant and Redox Signaling. 2, 3.

Gordon, M. H. 1990. The mechanism of antioxidant action in vitro. In B. J. F. Hudson (Ed.), Food antioxidants. 1-18.

.Gramza, A., Pawlak-Lemanaska, K., Korczak, J., Wasowicz, E., and Rudzinska M. 2005. Tea Extracts as Free Radical Scavengers. Polish Journal of Environmental Studies. 14(6), 861-867.

Gramza, A. 2006. Antioxidant activity of tea extracts in lipids and correlation with polyphenol content. Eur. J. Lipid Science and Technology. 108, 351–362.

Halliwell, B., and Gutteridge, J.M. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. In Method in Enzymology, Packer L and Glazer AN, Academic Press, New York, NY. 186, 1-85.

Hatano, T., Edamatsu, R., Mori, A., Fujita, Y., and Yasuhara, E. 1989. Effect of interaction of tannins with co-existing substances. VI. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical and on DPPH radical. Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo). 37, 2016–2021.

Heo, H. J., Kim, Y. J., Chung, D., and Kim D. 2007. Antioxidant capacities of individual and combined phenolics in a model system. Food Chemistry. 104, 87-92.

Hidalgo, M., Sanchez-Moreno, C., and Pascal-Teresa, S. 2010. Flavonoid–flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. Food Chemistry. 121, 691–696.

Jain, D. P., Pancholi, H. S., and Patel R. 2011. Synergistic antioxidant activity of green tea with some herbs. 2(3), 177-183.

Kotikova, Z., Lachman, J., Hejmankova, A., and Hejtemkova, K. 2011. Determination of antioxidant activity and antioxidant content in tomato varieties and evaluation of mutual interactions between antioxidants. LWT - Food Science and Technology. 44, 1703-1710.

Perez, M. B., Calderon, N. L., and Croci, A. 2007. Radiation-induced enhancement of antioxidant activity in extracts of rosemary (Rosmarinus officinalis L.). Food Chemistry. 104, 585- 592.

Pin-Der-Duh, X. 1998. Antioxidant activity of burdock (Arctium lappa Linne): Its scavenging effect on free-radical and active oxygen. Journal of the American Oil Chemists' Society. 75, 455–461.

Pinelo, M., Manzocco, L., Nunez, M.J., and Nicoli, M.C. 2004. Interaction among phenols in food fortification: Negative synergism on antioxidant capacity. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 52, 1177-1180.

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.

Queirós, B., Barreira, J. C. M., Cristina, S., and Ferreira, I. C. F. R. 2009. In search of synergistic effects in antioxidant capacity of combined edible mushrooms. International Journal of Food Science and Nutrition. 10, 1–13.

Raghu, K. L., Ramesh, C. K., Srinivasa, T. R., and Jamuna K. S. 2011. Total Antioxidant Capacity in Aqueous Extracts of Some Common Vegetables. Society of Applied Sciences. 2, 1.

Rhim, J.W., Xi, Y., Jeong, W.C., Ham, K.S., Chung, H.S., and Kim, E.S. 2009. Effect of drying methods on

antioxidant activity of Jiwhang (Rehmannia glutinosa). Food Science and Biotechnology. 18, 1464-1469.

Romano C. S. Abadi, K., Repetto, V., Vojnov A. A., and Moreno, S. 2009. Synergistic antioxidant and antibacterial activity of rosemary plus butylated derivatives. Food Chemistry 115. 456–461.

Sheng, Z.W., Ma, W.H., Gao, J.H., Bi, Y., Zhang, W.M., Duo, H.T., and Jin, Z.Q. 2011. Antioxidant properties of banana flower of two cultivars in China using 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH,) reducing power, 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate (ABTS) and inhibition of lipid peroxidation assays. African Journal of Biotechnology. 10(21), 4470-4477.

Shylaja, M.R., and Peter, K.V. 2004. The functional role of herbal spices. In: Peter, K.V.ed. Handbook of herbs and spices, 2.

Tavassoli, S., and Emam Jomeh, Z. 2011. Total Phenols, Antioxidant Potential and Antimicrobial Activity of Methanol Extract of Rosemary (Rosmarinus officinalis L.). Global Veterinaria. 7 (4), 337-341.

Viera, V., Marques, A., Barros, L., Barriera, J., and Ferreira, I. 2012. Insights in the antioxidant synergistic effects of combined edible mushrooms: phenolic and polysaccharidic extracts of Boletus edulis and Marasmius oreades. Journal of Food and Nutrition Research. 51(2), 109–116.

Wang, S., Meckling, K. A., Marcone, M. F., Kakuda, Y., and Tsao R. 2011. Synergistic, additive, and antagonistic effects of food mixtures on total antioxidant capacities. Journal of Agriculture and food Chemistry. 59(3), 960-968. (Abstract)

Yildirim, A., Mavi, A., and Kara, A. A. 2001. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of Rumex crispus extracts. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49, 4083–4089.

Yanishlieva, N. V., and Marinova, E. M. 1996. Antioxidative effectiveness of some natural antioxidants in sunflower oil. Zeitschrift fuÈr Lebensmittel-Untersuchung and Forschung. 203, 220-223.