sina-pub.ir

استفاده از روش های مختلف برای آزمایش فعالیت آنتی اکسیدانی روغن اساسی (اسانس) پونه کوهی (مرزنجوش)

چکیده

خواص آنتی اکسیدانی روغن اساسی پونه کوهی در رابطه با ترکیب شیمیایی آن مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت آنتی اکسیدانی با سه روش مختلف مورد بررسی قرار گرفت: آزمون رنگبری بتاکاروتن (BCB)، روش مهار رادیکال (DPPH) 2,2’- دی فنیل-1-1 پیکریلی- درازیل و سنجش گونه های واکنشی اسید تیوباربیتوریک (TBARS). مشخص شد که روغن اساسی کلی، کسری از آن و نیز ترکیبات خالص آن دارای اثر آنتی اکسیدانی قابل توجهی هستند که توسط آزمایش هر یک از روش ها مشخص شد. به طور کلی فعالیت آنتی اکسیدانی روغن اساسی پونه کوهی نسبت به اسید اسکوربیک کمتر موثر است، اما قابل مقایسه با توکوفرول- α و آنتی اکسیدان مصنوعی هیدروکسیتولوئن بوتیل (BHT) است. همکاری میان ترکیبات جزئی حاوی اکسیژن به عنوان عامل ممکن نشان داده شد، که قدرت آنتی اکسیدانی روغن اساسی پونه کوهی را تحت تاثیر قرار می دهد. غلظت های آنتی اکسیدان, قدرت آنتی اکسیدانی آن را نیز تحت تاثیر قرار می دهد.

کلمات کلیدی: مرزنجوش؛ روغن اساسی، آنتی اکسیدان های طبیعی؛ فعالیت آنتی اکسیدانی؛ رنگبری بتاکاروتن؛ مهار رادیکال DPPH

1. مقدمه

آنتی اکسیدان های مصنوعی به طور گسترده مورد استفاده در مواد غذایی (BHT هیدروکسی بوتیله، BHA هیدروکسی بوتیله ، PG گالات پروپیل و هیدروکینون بوتیل سه تایی TBHQ) مشکوک به ایجاد یا ترویج اثرات منفی بهداشتی هستند (Barlow, 1990; Branen, 1975; Chan, 1987; Namiki, 1990;

sina-pub.ir

Pokorny, 1991). به همین دلیل علاقه رو به رشدی در مطالعات مواد افزودنی طبیعی چون آنتی اکسیدان های بالقوه وجود دارد. بسیاری از منابع آنتی اکسیدان ها با منشاء گیاهی در سال های اخیر مورد بررسی قرار گرفته اند. در میان اینها, نشان داده شده است که خواص آنتی اکسیدانی بسیاری از گیاهان معطر و ادویه جات در به تاخیر انداختن فرآیند پراکسیداسیون لیپیدی در روغن و غذاهای چرب موثر است و این مقوله, علاقه بسیاری از گروه های تحقیقاتی را به خود جلب کرده است.

انواع متعددی از آنتی اکسیدان ها با فعالیت های متنوع شناسایی شدند. اثر آنتی اکسیدانی آنها ناشی از حضور گروه های های هیدروکسیل در ساختار شیمیایی آنها بود (Shahidi, 2000; Shahidi ، Janitha و Wanasundara، 1992؛ Vekiari، Oreopoulou، Tzia، و Thomopoulos، 1993). چندین ترکیب غیرفرار مانند کارنوسول، کوئرستین، اسید کافئیک و اسید رزمارینیک به خوبی به عنوان مهارکنندگان مناسب رادیکال های آزاد شناخته شده اند، اما برخی از ترکیبات فرار از روغن های اساسی نیز دارای پتانسیلی یک عامل طبیعی برای حفظ مواد غذایی هستند. تعدادی از مطالعات در مورد فعالیت های آنتی اکسیدانی روغن های اساسی از گیاهان مختلف معطر گزارش دادند که روغن اساسی پونه کوهی، غنی از تیمول و کارواکرول، دارای اثر آنتی اکسیدانی قابل توجه در فرایند اکسیداسیون گوشت خوک (به Lagouri، Blekas، Tsimidou، Kokkini ، و Boskou، 1993؛ Tsimidou و Boskou، 1994) است. Yanishlieva و Marinova (1995) فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره های هگزان پونه کوهی رشدیافته در بلغارستان، و همچنین به عنوان مکانیسم عمل تیمول و کارواکرول خالص (Yanishlieva، Marinova، Gordon، و Raneva، 1999) را بررسی نمودند. در کار قبلی خود (Milos, Mastelic, Jerkovic ، و Katalinic، 2000), ما ترکیب شیمیایی و اثر آنتی اکسیدانی مواد فرار پونه کوهی از نظر گلی کوسید را روی فرآیند اکسیداسیون گوشت خوک ارائه نمودیم. انتشارات اخیر (Abdalla & Roozen, 1999, 2001; Bendini, Gallina Toschi & Lercker, 2002; Cervato, Carabelli, Gervasio, Cittera, Cazzola, & Cestaro, 2000; Damechki, Sotiropoulou, & Tsimidou, 2001; Martinez-Tome, Jimenez, Ruggieri, Frega,

sina-pub.ir

(Strabbioli, & Murcia, 2001; Vichi, Zitterl-Eglseer, Jugi, & Fraz, 2001 فعالیت های آنتی اکسیدانی پونه کوهی را نشان دادند.

هدف از پژوهش حاضر، بررسی خواص آنتی اکسیدانی روغن اساسی پونه کوهی با استفاده از سه روش مختلف، یعنی، آزمون رنگبری بتاکاروتن (BCB)، روش مهار رادیکال (DPPH) 2,2’- دی فنیل-1-1 پیکریلی- درازیل و سنجش گونه های واکنشی اسید تیوباربیتوریک (TBARS) می باشد.

2. آزمایش

2.1. مواد

پونه کوهی (مرزنجوش، SSP. hirtum) در مرکز Dalmatia در ماه اکتبر سال 2001 جمع آوری شد. مواد این گیاه شامل نوک های گل و ساقه های آن می شود (15-20 سانتی متر). خشک کردن پونه کوهی در هوا در یک محل سایه دار در دمای اتاق به مدت 10 روز انجام شد. مواد گیاهی برای جداسازی روغن اساسی, بلافاصله پس از خشک کردن مورد استفاده قرار گرفت. صد گرم از مواد گیاهی خشک شده با استفاده از یک دستگاه نوع-Clevenger اصلاح شده به مدت 3 ساعت تحت تقطیر آبی قرار گرفت. بدنه دستگاه نوع-Clevenger اصلاح شده شامل دو لوله متحدالمرکز می شود. لوله داخلی درجه بندی شد و پر از آب و یک مقدار معلوم از N-پنتان شد که نقش آن, حفظ روغن اساسی و جداسازی آن از آب است. همچنین، به جای یک کندانسور از نوع " انگشت- سرد", یک نوع کندانسور Allihn استفاده می شود. روغن اساسی حاصل در سولفات سدیم بی آب خشک شد و تحت نیتروژن در شیشه نمونه مهر و موم شده در 20- درجه تا زمان مورد نیاز ذخیره شد. گونه های شاهد از مواد گیاهی و روغن اساسی پونه کوهی در Department of Biochemistry و Food Chemistry, Faculty of Chemical Split, Croatia Technology رسوب داده شدند.

روغن اساسی پونه کوهی (0.5 گرم) در (ستون) ژل سیلیکا (30-60 میلی متر، Mallinckrodt Baker B.V. ، Deventer، هلند) (به طول 20 سانتی متر، i.d سانتی متر) تکه تکه شد. پنتان (50 میلی لیتر) برای به دست

sina-pub.ir

آوردن یک بخش از این ماده مورد استفاده قرار گرفت که فقط حاوی هیدروکربن غیر قطبی (کسر CH) بود و دی اتیل اتر (50 میلی لیتر) برای به دست آوردن بخشی از ترکیبات قطبی (حاوی اکسیژن, کسر CHO) مورد استفاده قرار گرفت. این بخش ها به 0.5 میلی لیتر تغلیظ شدند و به منظور بررسی نتایج جداسازی کروماتوگرافی ستون, تحت کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) بر روی صفحات ژل سیلیکا قرار گرفتند. حلال های مختلف به عنوان یک فاز متحرک استفاده شدند: n-هگزان برای بخش CH و n-هگزان: اتیل استات (v/v) 85:15 برای بخش CHO. دو درصد اسید سولفوریک-وانیلین به عنوان یک معرف آشکارسازی مورد استفاده قرار گرفت. این بخش های خاصل توسط کروماتوگرافی ستونی نیز تحت تجزیه و تحلیل GC / MS قرار گرفتند (شرایط GC / MS همانطور که در بخش 2.2 شرح داده شده است) و نتایج جداسازی مناسب تایید شد.

به منظور به دست آوردن بخشی از ترکیبات فنلی، 1 گرم روغن اساسی در 5 میلی لیتر پنتان حل شد و با محلول هیدروکسید سدیم (20٪) در آب استخراج شد. در این روش، ترکیبات فنلی از لایه پنتان حذف شدند. فاز آبی، حاوی نمک های سدیم ترکیبات فنلیک محلول، با حلال اسید هیدروکلریک (10٪) در آب خنثی شدند. در نهایت، جداسازی ترکیبات فنلی توسط استخراج با پنتان (5 * 5ml) انجام شد. اثربخشی این روش جداسازی توسط TLC در صفحات ژل سیلیکا مورد آزمایش قرار گرفت (فاز متحرک: n-هگزان: اتیل استات 85:15 V / V) و خلوص کسر ترکیبات فنلی تایید شد. این نتایج جداسازی توسط دستگاه تجزیه و تحلیل GC / MS (شرایط GC / MS همانطور که در بخش 2.2 شرح داده شده است) نیز تایید شد.

یدروکسیتولوئن بوتیله، α-توکوفرول، 2.2'- دی فنیل-پیکریل هیدرازیل، اسید تیوباربیتوریک، بتاکاروتن، اسید اسکوربیک و همه حلال های اعمال شده دارای خلوص بودند و از Fluka Chemie Buchs, Switzerland به دست آمد. سولفات سدیم بی آب از Merck, Darmstadt, Germany به دست آمد.

GC-MS .2.2

sina-pub.ir

تجزیه و تحلیل ترکیبات فرار بر روی یک سیستم Hewlett-Packard GC–MS اجرا شد (GC 5890 series II; MSD 5971A, Hewlett Packard, Vienna, Austria). ستون پلی اتیلن گلیکول سیلیس-جوش خورده HP-20 M (50 متر * 0.2 میلی متر، ضخامت 0.2 میلی متر، Hewlett-Packard، Vienna,Austria) به طور مستقیم به طیف سنج جرمی تزویج شد. گاز حامل, هلیم بود (1 میلی لیتر / دقیقه). برنامه مورد استفاده, 4 دقیقه هم دما در 70 درجه، پس از آن 4 درجه / دقیقه برای 180 درجه و 10 دقیقه همدما بود. دمای پورت تزریق, 250 درجه بود و درجه حرارت آشکارساز, 280 درجه بود. یونیزاسیون اجزای نمونه در حالت EI (70 ولت) انجام شد.

شاخص های نگهداری خطی برای تمام ترکیبات توسط تزریق همزمان نمونه با محلول حاوی سری همولوگ C8- C22 N-آلکان (Van Den Dool, & Kratz, 1963) تعیین شد. مواد تشکیل دهند تک توسط شاخص های حفاظت مشابه آنها با ارجاع به ترکیبات شناخته شده از داده های متون مختلف (adams، 1995)، و همچنین با مقایسه طیف های جرمی آنها با طیف ترکیبات شناخته شده و یا با طیف ذخیره شده در پایگاه داده های طیفی جرم Wiley مشخص شد (Vienna,Austria ،Hewlett-Packard).

2.3. تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی با آزمون رنگبری بتاکاروتن (BCB)

فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیبات فرار پونه کوهی با توجه به نسخه اصلاح شده روش رنگبری بتاکاروتن (Pratt، 1980) تعیین شد. بتاکاروتن (0.1 میلی گرم) در یک فلاسک جوشاندن همراه با اسید لینولئیک (20 میلی گرم) و توئین 40 (100 میلی گرم) اضافه شد که همه در کلروفرم حل شدند. پس از تبخیر تا خشک شدن، تحت خلاء در 50 درجه توسط یک تبخیرکننده دوار، آب مقطر اکسیژنه (50 میلی لیتر) اضافه شد و این ترکیب برای 1 دقیقه در یک در یک صداساز (یاخته یا ویروس و غیره را در معرض انرژی صوتی قرار دادن) برای تشکیل امولسیون A تحت امولسیون قرار گرفت. 200 میلی لیتر حلال اتانولی از هر آنتی اکسیدان (غلظت های حلال ها 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 و 4.0 g/l بودند) با 5 یملی لیتر امولسیون A در کاوت های درپوشدار باز ترکیب شد. یک کنترل

sina-pub.ir

بدون آنتی اکسیدان، متشکل از 200 میلی لیتر اتانول و 5 میلی لیتر امولسیون تهیه شد. یک امولسیون دوم (B) متشکل از 20 میلی گرم اسید لینولئیک، 100 میلی گرم توئین 40 و 50 میلی لیتر آب اکسیژنه تهیه شد. اتانول (200 میلی لیتر)، که 5 میلی لیتر امولسیون B به آن اضافه شد، برای صفر کردن اسپکتروفتومتر استفاده شد. خواندنیهای تمام نمونه ها بلافاصله برداشته شد (t = 0) و در فواصل 15 دقیقه برای 120 دقیقه در اسپکتروفتومتر Perkin-Elmer Lambda EZ 201 در طول موج 470 نانومتر گرفته شدند. کووت ها در 50 درجه بین اندازه گیری ها ترموستات شدند. همه تعیین ها در دو نسخه انجام شد. مهار درصد از داده ها با استفاده از فرمول کمی اصلاح شده (Mallet, Cerati, Ucciani, Gamisana, & Gruber, 1994) محاسبه شد:

$$\%\ \text{inhibition} = \left[\left(A_{A(120)} - A_{C(120)}\right)/\left(A_{C(0)} - A_{C(120)}\right)\right] \times 100$$

که در آن $A_{A(120)}$ جذب آنتی اکسیدان در t = 120 دقیقه، $A_{C(120)}$ جذب کنترل در t = 120 دقیقه است، و $A_{C(0)}$ جذب کنترل در t = 0 دقیقه است.

2.4. تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی روش مهار رادیکال 2.2’- دی فنیل-پیکریل هیدرازیل (DPPH)

فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیبات فرار پونه کوهی از نظر هیدروژن اهداکننده یا توانایی مهار رادیکال، با استفاده از رادیکال DPPH پایدار اندازه گیری شد (Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, 1995). یک حلال متانولی (50 میلی لیتر) از آنتی اکسیدان (غلظت ها حلال ها, 1.05، 2.0، 4.0، 6.3، 8.4، 10.5، 12.6، 16.8، 21.0، 25.2، 29.4، 33.6، 40.0، 45.0 و 50.0 گرم / L بودند) در یک کووت قرار داده شد و 2 میلی لیتر از محلول متانولی 6×10^{-5} M DPPH اضافه شد. اندازه گیری های جذب بلافاصله آغاز شد. کاهش جذب در طول موج 517 نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر Perkin-Elmer بعد از 1 ساعت برای تمام نمونه ها انجام شد. متانول برای صفر کردن اسپکتروفتومتر استفاده شد. جذب رادیکال DPPH بدون آنتی اکسیدان، یعنی کنترل، روزانه اندازه گیری شد. مراقبت های ویژه برای به حداقل رساندن افت فعالیت رادیکال آزاد از محلول رادیکال DPPH

sina-pub.ir

(1958 Blois) باید اتخاذ شود. همه تعیین ها در سه تکرار انجام شد. مهار درصدی رادیکال DPPH توسط نمونه ها با توجه به فرمول Yen and Duh (1994) محاسبه شد:

$$\text{درصد ممانعت} = \left(\left(A_{C(o)} - A_{A(t)}\right) / A_{C(o)}\right) \times 100$$

که در آن $A_{C(o)}$ جذب کنترل در t = 0 دقیقه و $A_{A(t)}$ جذب آنتی اکسیدان در t = 1 ساعت است.

2.5. تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی با سنجش گونه های واکنشی اسید تیوباربیتوریک (TBARS)

برای اندازه گیری ظرفیت آنتی اکسیدانی بالقوه با استفاده از هموژنه های زرده تخم مرغ به عنوان محیط غنی از چربی, سنجش TBARS اصلاح شده (Ruberto و Baratta، 2000) استفاده شد. به طور خلاصه، 0.5 میلی لیتر از هموژنه بافت (w/v) 10% و 0.1 میلی لیتر از حلال های نمونه مورد آزمایش در متانول استفاده شدند (غلظت حلال ها, 4.0, 20.0 and 40.0 g/l بودند)، که بلافاصله قبل از استفاده آماده بودند و به یک لوله آزمایش اضافه شدند و تا 1.0 میلی لیتر با آب مقطر هم زده شدند. 0.05 میلی لیتر از حلال 2،20-آزوبیس (2-آمیدینو پروپان) دی هیدروکلرید (0.07 M) در آب برای القای پراکسیداسیون لیپیدی اضافه شد. 1.5 میلی لیتر از 20٪ اسید استیک (با pH 3.5) و 1.5 میلی لیتر 0.8٪ (W / V) اسید تیوباربیتوریک در 1.1٪ (W / V) محلول سولفات سدیم دودسیل اضافه شد و در نتیجه مخلوط حاصل به صورت گردابی شد و پس از آن در 95 درجه برای 60 دقیقه گرم شد. پس از خنک کردن، 5.0 میلی لیتر از بوتان-1-OL به هر لوله اضافه شد و پس از آن به طور گسترده گردابی شد و در 1200 گرم به مدت 10 دقیقه سانتریفوژ شد. جذب لایه فوقانی آلی با استفاده از اسپکتروفتومتر (Perkin-Elmer Lambda EZ 201, Roma, Italia)، با تظنیم در در طول موج 532 نانومتر اندازه گیری شد. تمام مقادیر بر اساس شاخص درصد آنتی اکسیدان (AI٪) بودند:

$$\text{AI}\% = (1 - A_T/A_C) \times 100$$

که در آن AC مقدار جذب کنترل به طور کامل اکسید شده و At جذب نمونه آزمایش است.

sina-pub.ir

3. نتایج و بررسی

3.1. ترکیب شیمیایی روغن اساسی پونه کوهی

نوک های گلدار و ساقه های خشک شده پونه کوهی, 2.9٪ روغن اساسی به همراه داشتند. تعیین ترکیب درصد نمونه ها بر اساس نرمالسازی منطقه اوج بدون استفاده از عوامل اصلاح بود. همانطور که در جدول 1 نشان داده شده است، یازده ترکیب در روغن اساسی بدون شکنش مشخص شدند که 97.9٪ از روغن مجموع را ارائه دادند. ترکیبات اصلی, تیمول مونوترپن فنلی (35.0٪) و کارواکرول (32.0٪) بودند. دیگر ترکیبات مهم هیدروکربن monoterpenic G-terpinene (10.5٪)، P-cymene (9.1٪) و A-terpinene (3.6٪) بودند. پس از شکنش، برخی از ترکیبات دیگر مشخص شدند که به این معنی است که تجزیه و تحلیل کامل تر به دست آمد. نتایج مشابه برای پونه کوهی از ریشه یونانی (Vokou ، Kokkini ، و Bessiere، 1993) گزارش شدند. ترکیب شیمیایی بخش های مختلف، در جدول 1 گزارش شده است.

هفده ترکیبات در بخش (CH) هیدروکربن با G-terpinene (31.0٪)، P-cymene (22.1٪)، یک terpinene (10.4٪) و transcaryophyllene (9.1٪) به عنوان اجزای اصلی مشخص شدند. بخشی با ترکیبات حاوی اکسیژن که شامل چهار ترکیب بود، توسط تیمول (47.3٪) و کارواکرول (46.4٪) به عنوان ترکیبات عمده نشان داده شدند. کسر فنلی تنها حاوی دو ترکیب، تیمول (58.9٪) و کارواکرول (41.1٪) بود.

جدول 1: ترکیب (مساحت٪) از روغن اساسی مرزنجوش

sina-pub.ir

No.	Compound	RI[a]	Area%	
			In total oil	In fraction
Hydrocarbons CH fraction (CH)				
1.	α-Thujene	1031	1.4	5.2
2.	β-pinene	1102	–	0.7
3.	Myrcene	1149	–	6.1
4.	α-Terpinene	1161	3.6	10.4
5.	γ-Terpinene	1231	10.5	31.0
6.	*p*-Cymene	1247	9.1	22.1
7.	Terpinolene	1262	–	0.9
8.	Alloocimene[b]	1351	–	0.3
9.	α-Copaene	1466	–	0.4
10.	β-Burbonene	1496	–	0.3
11.	*trans*-Caryophyllene	1578	2.4	9.1
12.	Aromadendrene	1583	–	0.4
13.	α-Humulene	1638	–	1.5
14.	Ledene	1644	–	0.3
15.	β-Bisabolene	1694	1.4	2.0
16.	δ-Cadinene	1729	0.5	3.8
17.	α-Muurolene	1735	–	0.2
				Total 95.8
Oxygen containing compounds fraction (CHO)				
18.	1-Octen-3-ol	1411	1.0	0.8
19.	Borneol	1653	1.0	1.0
20.	Thymol	2115	35.0	47.3
21.	Carvacrol	2140	32.0	46.4
			Total 97.9	Total 95.5
Phenolic fraction				
1.	Thymol	2115	58.9	
2.	Carvacrol	2140	41.1	
				Total 00.0

[a] Retention indices relative to C_8–C_{22} alkanes on polar HP-20M column.
[b] Correct isomer is not identified.

3.2. فعالیت آنتی اکسیدانی روغن اساسی پونه کوهی

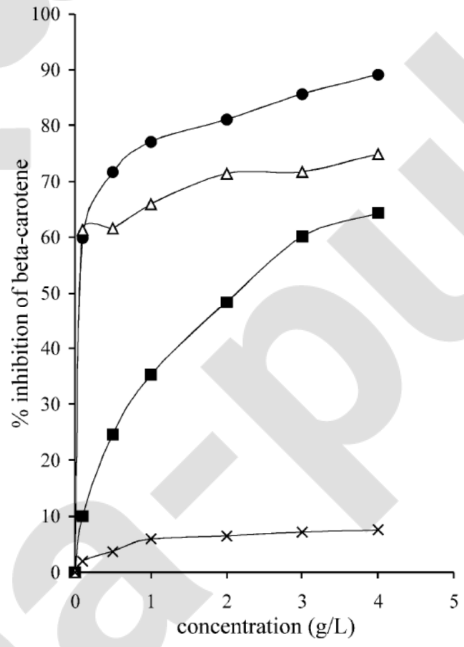
3.2.1. روش رنگبری بتاکاروتن

روش BCB مبتنی بر از دست دادن رنگ زرد بتاکاروتن به علت واکنش آن با رادیکال ها که توسط اکسیداسیون اسید لینولئیک در یک امولسیون تشکیل می شود می باشد. نرخ رنگبری بتاکاروتن می تواند در حضور آنتی اکسیدان ها کند شود. این واقعیت در ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی روغن اساسی پونه کوهی در مقایسه با آنتی اکسیدان

sina-pub.ir

های مصنوعی و طبیعی به خوبی شناخته شده، یعنی BHT، اسید اسکوربیک (ویتامین C) و α-توکوفرول (ویتامین E) استفاده می شود.

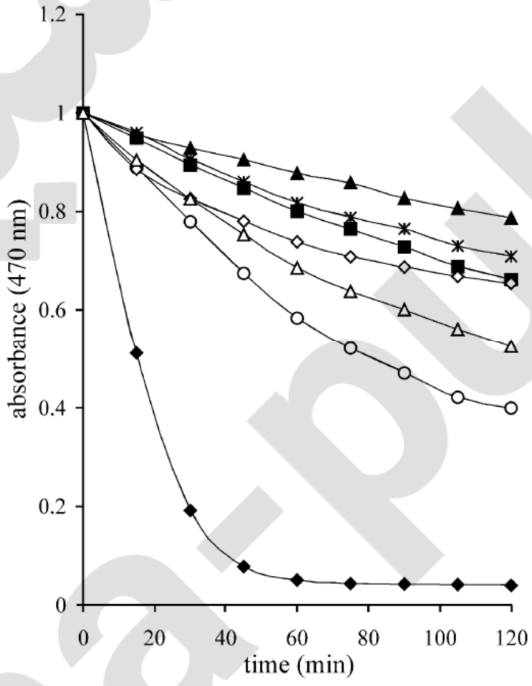
شکل. 1, فعالیت آنتی اکسیدانی کلی روغن اساسی پونه کوهی را در مقایسه با فعالیت آنتی اکسیدانی BHT، توکوفرول-α و اسید اسکوربیک نشان می دهد. قدرت آنتی اکسیدانی در جهت BHT> توکوفرول-α > روغن اساسی> اسید اسکوربیک کاهش یافت. BHT و توکوفرول-α قویترین آنتی اکسیدان بودند. در مقایسه، روغن اساسی اثر آنتی اکسیدانی نسبتا چشمگیری را نشان داد، در حالی که اسید اسکوربیک هیچ فعالیت آنتی اکسیدانی را نشان نداد. به جز اسید اسکوربیک، این غلظت, قدرت آنتی اکسیدانی هر نمونه را تحت تاثیر قرار می دهد. مهار 50٪ به ترتیب با مقدار $<0.1\ \mathrm{gl}^{-1}$ از BHT و توکوفرول-α یا مقدار $2\ \mathrm{gl}^{-1}$روغن اساسی مجموع، انجام گرفت.



شکل. 1. فعالیت آنتی اکسیدانی کلی روغن اساسی پونه کوهی: $(\blacksquare)$، BHT، $(\bullet)$، α-توکوفرول، (Δ)، اسید اسکوربیک $(\times)$ که توسط روش رنگبری بتاکاروتن ارزیابی شده است.

sina-pub.ir

شکل. 2, کاهش در جذب بتاکاروتن در حضور روغن اساسی مجموع پونه کوهی ، و همچنین بخش ها و یا ترکیبات مختلف آن را نشان می دهد. نمونه شاهد بدون اضافه نمودن آنتی اکسیدان با بیشترین سرعت اکسید شد و نرخ نزولی رنگبری در حضور CH> کارواکرول> تیمول> روغن اساسی کل> بخش فنلی> بخش CHO نشان داده شد. بخش CHO, قوی ترین آنتی اکسیدان بود که نشان می دهد فعالیت آنتی اکسیدانی روغن اساسی پونه کوهی به علت مواد تشکیل دهند قطبی تر است. در میان اینها, این حقیقت که بخش CHO, به صورت آنتی اکسیدان نسبت به بخش فنلی یا مواد تشکیل خالص آن, تیمول و کارواکرول موثرتر است, نشان می دهد که همکاری در میان ترکیبات حاوی اکسیژن حداقل دارای نقش تعیین کننده است. از سوی دیگر, اثربخشی کمتر روغن کل در مقایسه با بخش CHO ممکن است ناشی از غلظت کمتر ترکیبات حاوی اکسیژن در روغن کل و به دلیل حضور هیدروکربن ها باشد که نشاندهنده کمترین فعالیت آنتی اکسیدان در موقع ایزوله کردن به صورت بخش CH است.



شکل. 2. نرخ رنگبری بتاکاروتن در کنترل بدون آنتی اکسیدان ،(◆) , روغن اساسی پونه کوهی ،(■)، بخش CHO (▲) , بخش ترکیبات ،(*), بخش CH (○)، تیمول (◇) , و کارواکول ،(Δ). غلظت روغن اساسی کلی, بخش های آن و ترکیبات خالص $4\ g/l$ بود.

sina-pub.ir

در این میان، این واقعیت که بخش CHO به عنوان آنتی اکسیدان از بخش فنل یا تیمول ترکیبات خالص و کارواکرول آن موثر تر است نشان می دهد که همکاری میان ترکیبات جزئی حاوی اکسیژن, نقش تعیین کننده ای دارند. از سوی دیگر، اثربخشی کمتر روغن مجموع در مقایسه با بخش CHO ممکن است به دلیل غلظت کمتر ترکیبات حاوی اکسیژن در روغن مجموع و به دلیل حضور هیدروکربن ها باشد که پایین ترین فعالیت آنتی اکسیدانی را در زمانی نشان داد که به صورت بخش CH جدا شد.

با وجود این واقعیت که ترکیب قطبی اسید اسکوربیک, آنتی اکسیدان به خوبی شناخته شده است، آزمون رنگبری بتاکاروتن, خواص آنتی اکسیدانی آن را نشان نمی دهد. این پدیده جالب که به عنوان "پارادوکس قطبی" فرموله می شود, قبلاً گزارش شده است (Frankel, Huang, Kanner, & German, 1994; Koleva, van Beek, Linssen, de Groot, & Evstatieva, 2002; Porter, 1993). آنتی اکسیدان های قطبی باقی مانده در فاز آبی امولسیون در فاز چربی بیشتر رقیق می شوند و در نتیجه در حفاظت از اسید لینولئیک کمتر موثر هستند.

3.2.2. روش مهار رادیکال DPPH

بسیاری از گونه های رادیکال با واکنش پذیری متفاوت در طول یک اکسیداسیون لیپید تشکیل می شوند (,OH. ,-. L.,LOO., LO., etc. O2). DPPH رادیکال آلی نسبتا پایدار به طور گسترده ای در تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیبات تک و همچنین عصاره های گیاهی مختلف استفاده شده اند (Brand-Williams et al., 1995; Yen & Duh, 1994). این روش مبتنی بر کاهش حلال های DPPH الکلی در حضور یک آنتی اکسیدان اهداکننده هیدروژن است. حلال های DPPH, باند جذب قوی را در طول موج 517 نانومتر با ظاهر رنگ بنفش عمیق نشان می دهند. این جذب ناپدید می شوند و بی رنگ شدن حاصل, میزان عناصر با توجه به درجه کاهش است. DPPH باقی مانده اندازه گیری شده به طور معکوس متناسب با فعالیت مهار رادیکالی آنتی اکسیدان است (Blois 1958).

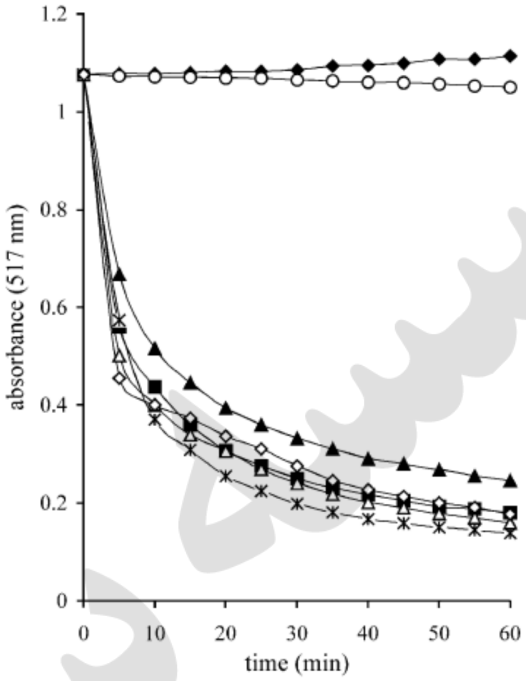
sina-pub.ir

این روش به منظور بررسی خواص آنتی اکسیدانی روغن اساسی پونه کوهی در مقایسه با آنتی اکسیدان های طبیعی و مصنوعی شناخته شده، توکوفرول- α ، اسید آسکوربیک و BHT (جدول 2) استفاده شد. اسید اسکوربیک، توکوفرول- α و BHT, بالاترین فعالیت مهار رادیکالی را نشان دادند، در حالی که فعالیت روغن اساسی پونه کوهی و کسرهای آن و یا ترکیبات خالص بسیار پایین تر بودند. تحقیقات ما نشان می دهد که روش DPPH مستقل از قطبیت زیرلایه است. نویسندگان دیگر گزارش داده اند که قطبیت زیرلایه بر فعالیت مهار DPPH تاثیر نمی گذارد. (Koleva et al., 2002; Pekkarinen, Stockmann, Schwarz, Heinonen, & Hopia, 1999; Yamaguchi, Taka Matoba, & Terao, 1998). پتوصیف شد که توانایی های مهار رادیکال برخی از ترکیبات را می توان با رفتار سینتیکی مختلف آنها تحت تاثیر قرار داد (Bondet، Brand-Williams, & Berset, 1997). برای ترکیبات واکنش دهنده آهسته, این تاثیر به مکانیسم واکنش دادن پیچیده نسبت داده شد. در مطالعه ما، احتمالاً ترکیبات از روغن اساسی پونه کوهی شامل یک یا چند واکنش ثانویه می شوند که منجر به کاهش کندتر حلال های DPPH می شود.

شکل. 3, میزان توانایی اهدای هیدروژن روغن اساسی مجموع پونه کوهی، کسرهای آن و ترکیبات خالص تیمول و کارواکرول آن را نشان می دهد. تنها بخش CH مهار رادیکال بسیار ضعیف را نشان داد. همه آنتی اکسیدان های دیگر بررسی شده در بالا تقریبا اثر آنتی اکسیدانی یکسانی را نشان دادند.

شکل. 3. کاهش حلال های DPPH الکلی: نرخ توانایی اهدای هیدروژن کنترل بدون آنتی اکسیدان (◇)، روغن اساسی پونه کوهی (■) ، کسر CHO (▲) ، کسر ترکیبات فنلی (*)، کسری CH (○) ، تیمول (◇) و کارواکرول (Δ). غلظت روغن اساسی مجموع، کسرها و ترکیبات خالص 2.4 گرم / L بودند.

sina-pub.ir



جدول 2: مهار رادیکال روغن اساسی پونه کوهی، کسرهای آن، BHT، توکوفرول و اسید اسکوربیک با DPPH

Antioxidant	IC_{50}[a]
Total essential oil	0.5
CH fraction[b]	/
CHO fraction	0.5
Phenolic fraction	0.4
Thymol	0.5
Carvacrol	0.4
BHT	1.8×10^{-2}
α-Tocopherol	8.6×10^{-3}
Ascorbic acid	4.4×10^{-3}

[a] Concentration (g/l) for a 50% inhibition.
[b] CH fraction could not inhibit 50% of the reaction under test conditions.

TBARS .3.2.3

این روش شناخته شده به عنوان روش سنجش گونه های واکنشی اسید تیوباربیتوریک (TBARS)، مربوط به اندازه گیری اسپکتروفتومتری رنگدانه صورتی تولید شده از طریق واکنش اسید تیوباربیتوریک (TBA) با مالون دی آلدئید

sina-pub.ir

(MDA) و محصول دیگر چربی پراکسیداسیون ثانویه است. ارزیابی جذب در طول موج 532 نانومتر, یک معیار از حد تنزل لیپید را ارائه می دهد.

روغن اساسی مجموع پونه کوهی، کسرهای آن و ترکیبات خالص آن برای توانایی خود در عمل نمودن به عنوان عوامل مهار رادیکال در مقایسه با خود و توکوفرول- α و BHT مورد بررسی قرار گرفتند. همانطور که در جدول 3 نشان داده شده است، قدرت آنتی اکسیدانی در جهت توکوفرول- α > BHT> روغن اساسی کاهش یافت. روغن اساسی مجموع، کسر CHO، تیمول و کارواکرول خالص، و همچنین کسری CH هیدروکربن تقریباً قدرت آنتی اکسیدانی یکسانی را به نمایش گذاشتند. این غیر منتظره نبود، زیرا Ruberto و Baratta (2000) نتایج TBA مشابهی را نشان دادند آنها حدود 100 ترکیب خالص از روغن اساسی مجموع را آزمایش نموده اند و به طور قابل ملاحظه ای تایید کرده اند که هیدروکربن مونوترپن G-terpinene، A-terpinene، P-cymene یک فعالیت بسیار بالا را نشان می دهد. در مطالعه ما, این ترکیبات, اجزای اصلی بخش CH می باشند. از نتایج نشان داده شده در جدول 3، آشکار است که نتایج غلظت بالاتر به یک اثر آنتی اکسیدانی بالاتر منجر می شود.

جدول 3: فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیبات روغن اساسی پونه کوهی، توکوفرول- α و BHT که با استفاده از روش اسید تیوباربیتوریک اندازه گیری شده است.

Antioxdants	AI%[b]		
	100 ppm[a]	500 ppm	1000 ppm
Total essential oil	29.9±8.0	52.9±4.0	64.7±5.2
CH fraction	22.2±1.1	50.6±1.2	60.2±6.7
CHO fraction	26.7±8.0	42.5±4.3	56.7±4.9
Phenolic fraction	33.4±7.1	47.5±4.9	58.6±1.8
Thymol	24.0±2.9	–	41.5±2.2
Carvacrol	24.0±3.7	–	52.8±2.7
α-Tocopherol	72.6±3.6	–	90.0±1.8
BHT	37.5±1.9	–	68.6±1.1

3.2.4. مقایسه روش ها

sina-pub.ir

همانطور که قبلاً شرح داده شد (Frankel و همکاران، 1994؛ Koleva و همکاران، 2002)، استفاده از روش های مختلف در ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی لازم است. این مطالعه نشان می دهد که هیچ روش آزمایش واحد برای تخمین فعالیت آنتی اکسیدانی یک نمونه مورد مطالعه مناسب نیست. ترکیبی از سه روش، مورد استفاده در این مطالعه، یک انتخاب خوب برای ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی روغن اساسی پونه کوهی بود و می تواند برای سایر تحقیقات مشابه توصیه شود.

روش BCB از چربی امولسیون شده استفاده می کند که تعدادی از متغیرهای موثر بر فعالیت آنتی اکسیدانی نمونه مورد بررسی را عرضه می کند و می تواند برای دستیابی به نتایج تجدید پذیر نسبتاً پیچیده باشد. با این حال، اگر این حقیقت نادیده گرفته شود، روش BCB می تواند به طور خاص برای تحقیقات آنتی اکسیدان های چربی دوست و برای بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی روغن اساسی مناسب مفید باشد. از سوی دیگر اگر ترکیبات قطبی (اسید اسکوربیک، اسید رزمارینیک، اسید کافئیک و غیره) تنها با استفاده از روش BCB آزمایش شوند, می توان آنها را به عنوان آنتی اکسیدان ضعیف در نظر گرفت. با این حال، فعالیت قوی آنتی اکسیدانی این ترکیبات را می توان با سایر روش های آزمایش ثابت نمود (Koleva و همکاران، 2002).

روش DPPH سریع تر از روش BCB است و می تواند در تحقیقات آنتی اکسیدان های جدید برای برآورد سریع و اطلاعات اولیه توانایی های مهار رادیکال مفید باشد. این روش حساس است و به مقدار کمی از نمونه ها نیاز دارد (Blois، 1958). روش TBA نیز حساس است و به نتایج قابل تکرار دستیابی پیدا می کند. این روش برای به دست آوردن اطلاعات مفید در یک محیط شبیه به وضعیت زندگی واقعی ارجح است. هر دو روش DPPH و TBA، به طور مشابه, آزمایش مواد چربی دوست و آب دوست را میسر می سازند.

برآورد درست یک فعالیت آنتی اکسیدانی روغن اساسی پونه کوهی, به ارزیابی غلظت مطلوب آن نیاز دارد. از آنجا که ویژگی و حساسیت برای هر روش مورد استفاده متفاوت هستند، استفاده از مقادیر مساوی آنتی اکسیدان ها برای هر آزمون غیر ممکن بود. از سوی دیگر، اثر استفاده از مقادیر مختلف آنتی اکسیدان ها در آزمون های مختلف, مقایسه

sina-pub.ir

نتایج به دست آمده را دشوار می سازد. با این حال، به رغم این واقعیت و به طور مستقل از روش انتخاب شده، اندازه گیری چند-غلظت, یک تصویر جامع تر از فعالیت آنتی اکسیدانی روغن اساسی پونه کوهی را فراهم می کند.

در نتیجه، همانطور که قبلاً نوشته شده است (Koleva و همکاران، 2002)، قدرت آنتی اکسیدانی به روش انتخاب شده، غلظت و ماهیت و خواص فیزیکی-شیمیایی آنتی اکسیدان مورد مطالعه بستگی دارد. در مطالعه حاضر، تایید شد که نمونه های آنتی اکسیدان یکسان, مقادیر مختلف آنتی اکسیدانی را بسته به غلظت و پارامتر اندازه گیری شده آنتی اکسیدان نشان می دهند. دستیابی به چند اندازه گیری غلظت مختلف برای جلوگیری از این نتیجه نادرست در این موارد مهم است.

ما (Milos و همکاران، 2000) نشان دادیم که روغن اساسی پونه کوهی, تشکیل هیدروپراکسیداز مهارشده را نشان می دهد و کسر CHO بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی را نشان می دهد. این مطالعه، با استفاده از سه روش مختلف تایید کرد که روغن اساسی پونه کوهی دارای خواص آنتی اکسیدانی قابل توجه است. اثر آنتی اکسیدانی به علت حضور تیمول و کارواکرول است، اما یک اثر هم افزایی ممکن میان ترکیبات حاوی اکسیژن را نیز تواند پیشنهاد نمود. این نتایج نشان می دهد که روغن اساسی پونه کوهی را می توان به عنوان منبع بالقوه آنتی اکسیدان های طبیعی برای صنایع غذایی استفاده نمود, به طوری که بررسی کاربرد آن به عنوان افزودنی آنتی اکسیدان طبیعی در برخی از محصولات غذایی نهایی جالب است.