# بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی کرفس کوهی در چند سیستم مدلی و روغن آفتابگردان

فاطمه احمدی، محمد شاهدی، مهدی کدیور

**چکیده**

کرفس کوهی یکی از گیاهان بومی و مرتعی ایران و از تیره چتریان می‌باشد. این گیاه از دیرباز به عنوان غذا و چاشنی توسط ساکنان اطراف رویشگاه‌های آن مصرف می‌شده است و در طب سنتی دارای اثرات ضد سرفه، ضد التهاب، ضد فشار خون و ضد رماتیسم وغیره است، اما هیچ اطلاعاتی راجع به اثرات آنتی-اکسیدانی آن وجود ندارد و این تحقیق اولین مطالعه انجام شده در زمینه خصوصیات آنتی‌اکسیدانی این گیاه است. در این تحقیق فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره متانولی گیاه کرفس کوهی با استفاده از مدل‌های خارج از بدن موجود زنده (*in vitro*) ؛ مدل بی‌رنگ شدن بتاکاروتن، DPPH (α,α-Diphenyl-β-pycrylhydrazyl) )، تیوسیانات، قدرت احیاکنندگی و اندازه‌گیری ارزش پراکسید روغن آفتابگردان مورد بررسی قرار گرفت و فعالیت عصاره با فعالیت آنتی-اکسیدانی BHT، اسید آسکوربیک و آلفاتوکوفرول مقایسه شد. مقدار کل ترکیبات فنولیک موجود در عصاره توسط اسپکتروفتومتری با روش فولین‌سیاکالتو تعیین شد و کل ترکیبات فنولیک و فلاونوئیدی گیاه به ترتیب بر اساس اکی-والانت اسید تانیک و اپی‌کاتکین گزارش گردید. در مدل سیستم DPPH و قدرت احیاکنندگی، عصاره گیاه نسبت به اسید آسکوربیک فعالیت کمتری داشت اما فعالیت عصاره گیاه نسبت به آلفاتوکوفرول و BHT بیشتر بود. اگرچه در مدل سیستم بی‌رنگ شدن بتاکاروتن فعالیت آنتی‌اکسیدانی BHT نسبت به عصاره بیشتر بود اما این تفاوت از نظر آماری معنی دار نبود($\rho \leq$ ۰/۰۱ ) و اسید آسکوربیک در این مدل کمترین فعالیت را داشت. فعالیت غلظت‌های مختلف عصاره گیاه در مدل سیستم تیوسیانات نسبت به فعالیت BHT کمتر ولی نسبت به آلفاتوکوفرول بیشتر بود. عصاره گیاه در به تأخیر انداختن اکسیداسیون روغن آفتابگردان در دمای۳±۶۰ درجه سانتیگراد در مدت زمان ۱۴ روز نسبت به BHT مؤثرتر عمل کرد.

## ۱- مقدمه

اکسیداسیون لیپیدها در حین نگهداری و فراوری غذاها نه فقط باعث از دست رفتن کیفیت تغذیه ای و هضمی غذا می‌شود بلکه محصولات اکسید شده‌ای مانند رادیکال آزاد تولید می‌کند که این ترکیبات منجر به واکنش‌های متعدد نامطلوب شیمیایی می‌شوند[۵]. امروزه به نقش رادیکال‌های آزاد و اکسیژن فعال در بیماری‌های خاص انسانی مانند سرطان، پیری و تصلب شرایین توجه زیادی می‌شود[۳۱]. آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که به طور مؤثری جلوی اکسیداسیون ترکیبات را می-گیرند[۱]. آنتی اکسیدانها در دو دسته عمده سنتزی و طبیعی طبقه بندی می‌شوند[۲۹]. با توجه به نگرانی‌هایی که راجع به اثرات سمیت زایی آنتی‌اکسیدانهای سنتزی که به طور معمول استفاده می‌شوند، مثل TBHQ، BHA، BHT و PG، ابراز شده است[۲۰] و به دلیل گستردگی زیاد و گران قیمت بودن تست‌هایی که باید روی افزودنی‌های غذایی انجام شود تا ایمنی آنها تأیید گردد، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی در خیلی از غذاها محدود شده است. جستجوی جایگزین‌های طبیعی برای آنتی-اکسیدان‌های سنتزی، منجر به بررسی آنتی‌اکسیدان‌های متعددی از منابع

گیاهی گردیده است[۱۱]. آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی زیادی با فعالیتهای آنتی‌اکسیدانی متنوع شناسایی شده است، اما امروزه به افزودن پلی-فنولها که جزء ترکیبات ثانویه گیاهان می‌باشند، به غذاها و سیستمهای بیولوژیکی توجه زیادی می‌شود. این امر به دلیل فعالیت قابل ملاحظه آنها در به دام انداختن رادیکال‌های آزاد، یعنی فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها می‌باشد[۹، ۱۷، ۲۳]. به علاوه مطالعات اپیدمیولوژیک نشان داده است که بین جذب میوه‌ها و سبزی‌ها و مرگ و میر ناشی از بیماری‌های قلبی رابطه معکوس وجود دارد[۱۵].

گیاه *Kelussia odoratissima* Mozaff. که با نام محلی کرفس کوهی شناخته شده است، به عنوان یک چاشنی مورد علاقه در بین مردم اصفهان چهارمحال-وبختیاری و کهکیلویه‌وبویراحمد رواج دارد. این گیاه به عنوان یک داروی سنتی در درمان سرماخوردگی، سرفه‌های شدید، رماتیسم، چربی خون و فشار خون و ناراحتی‌های قلبی-عروقی استفاده می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی خصوصیات آنتی‌اکسیدانی عصاره کرفس کوهی با استفاده از مدل سیستم‌های DPPH، بی‌رنگ شدن بتاکاروتن، قدرت احیاکنندگی و تیوسیانات و نیز جلوگیری از اکسیداسیون روغن آفتابگردان می‌باشد. همچنین ارتباط بین غلظت ترکیبات فنولیک و میزان اثر آنتی‌اکسیدانی گیاه بررسی می‌گردد.

## ۲- مواد و روشها

### ۲-۱- مواد شیمیایی

گیاه کرفس کوهي، از منطقه شاهان کوه واقع در فریدونشهر اصفهان تهیه شد. کربنات سدیم (بدون آب)، پتاسیم فري سیانید، بوتیلات هیدروکسي تولوئن، تري کلراستیک اسید، فریک کلرید، کلرید فروس، معرف فولین-سیوکالتو، آسکوربیک اسید و آمونیوم تیوسیانات از شرکت مرک تهیه شدند، آلفاتوکوفرول، بتاکاروتن، لینولئیک اسید، اپی‌کاتکین و DPPH از شرکت سیگما خریداري شدند. تمام محلولهای مورد استفاده در آزمایشات دارای درجه آزمایشگاهی بودند و از شرکت مرک تهیه شدند.

### ۲-۲- آماده سازی نمونه

گیاه کرفس کوهی خشک شد (در تاریکی و دمای ۳۰ درجه سانتیگراد) و تا زمان انجام آزمایش در دمای ۱۸- درجه سانتیگراد نگهداری گردید. بلافاصله قبل از انجام آزمون، نمونه با آسیاب برقي کاملاً به صورت پودر درآمد.

### ۲-۳- تهیه عصاره از گیاه کرفس کوهی

کرفس کوهی آسیاب شده (۵۰۰ میلی گرم) در لوله آزمایش وزن شد، سپس ۱۰ میلی لیتر از محلول آبی متانول به آن اضافه گردید و سوسپانسیون به آرامی هم‌زده شد. لوله‌های آزمایش به مدت ۵ دقیقه تحت تأثیر امواج ماوراء صوت قرار داده و پس از آن ۱۰ دقیقه (۱۵۰۰ g) سانتریفوژ (سیگما ۱۶-۲) شد. محلول بالای رسوب جدا شد و رسوب گیاهی باقی مانده دو بار دیگر عصاره‌گیری شد و محلول‌های حاصل از هر مرحله به محلول مرحله اول اضافه گردید. محلول حاصله، عصاره گیاه کرفس کوهی نامیده شد[۱۵].

## ۲-۴- اندازه‌گيري مقدار كل تركيبات فنوليك و فلاونوئيدها در كرفس كوهي

### ۲-۴-۱- اندازه‌گیری مقدار کل ترکیبات فنولیک

مقدار کل ترکیبات فنولیک موجود در عصاره این گیاه توسط رنگ-سنجی به روش فولین-سیوکالتو[1]، که توسط سینگلتون و راسی تغییر داده شده، مورد بررسی قرار گرفت. مقدار ۰/۵ میلی لیتر از عصاره استخراجی، حاصل از روش استفاده شده در بند۲-۳، با ۲/۵ میلی لیتر از معرف فولین-سیوکالتو که ۱۰ برابر رقیق شده بود (توسط آب مقطر) و ۲ میلی لیتر از محلول کربنات سدیم ۷/۵ درصد به خوبی مخلوط شد و لوله‌های آزمایش به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب گرم ۴۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد. سپس مقدار جذب محلول توسط دستگاه اسپکتروفتومتر(دو پرتویی ماورابنفش-مرئی، شرکت کام اسپک مدل ام ۳۵۰ ، ساخت انگلستان) در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد. مخلوطی از متانول ۸۰ درصد و واکنشگرها به عنوان شاهد استفاده شد. مقدار کل ترکیبات فنولیک از روی معادله خط رسم شده برای اسید تانیک[2]، بر مبنای اسید تانیک و به صورت میلی گرم در گرم ماده خشک بیان گردید[۲۳].

### ۲-۴-۲- اندازه‌گيري مقدار كل فلاونوئيدها در كرفس كوهي

۰/۲۵ ميلي ليتر از عصاره درون لوله آزمايش توسط ۱/۲۵ ميلي ليتر آب مقطر رقيق شد و به آن ۷۵ ميكروليتر محلول ۵ درصد نيتريت سديم اضافه گرديد. بعد از ٦ دقيقه، ۱۵۰ ميكروليتر از محلول ۱۵ درصد كلريد آلومينيوم (با ٦ مولكول آب) افزوده شد و به مدت ۵ دقيقه در دماي اتاق نگهداري گرديد. بعد از افزودن ۰/۵ ميلي ليتر از محلول سود يك مولار،حجم كل توسط آب مقطر به ۲/۵ ميلي ليتر رسانده شد. بعد از اينكه نمونه‌ها به خوبي مخلوط گرديد ميزان جذب در طول موج ۵۱۰ نانومتر توسط دستگاه اسپكتروفتومتر خوانده شد. نمونه شاهد كه حاوي ۰/۲۵ ميلي ليتر آب مقطر به جاي نمونه عصاره بود براي صفر كردن دستگاه استفاده شد[۱۸] و مقدار كل فلاونوئيدهاي موجود در عصاره بر اساس اكي‌والانت اپي‌كاتكين و به صورت ميلي گرم در گرم ماده خشك بيان شد.

## ۲-۵- مدل سيستم‌هاي بررسي اثر آنتي‌اكسيداني كرفس كوهي

### ۲-۵-۱- به دام انداختن رادیکال‌های آزاد با استفاده از روش DPPH

برای تعیین قدرت عصاره گیاه در به دام انداختن رادیکال‌های آزاد DPPH، غلظت‌های مختلف از عصاره کرفس کوهی (PE) ، BHT، آسکوربیک اسید (As) و آلفاتوکوفرول (Toc) داخل لوله‌های آزمایش مختلف ریخته شد و حجم نهایی با افزودن محلول متانول ۸۰ درصد در ۱۰۰ میکرولیتر تنظیم گردید. ۵ میلی لیتر از محلول متانولی DPPH (۰/۱ میلی مولار) به لوله‌های آزمایش افزوده شد و لوله‌های آزمایش به شدت هم زده شدند، سپس به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۷ درجه سانتیگراد قرار گرفتند و جذب محلول‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر در مقابل متانول به عنوان شاهد خوانده شد. نمونه کنترل مانند بالا تهیه

---

[1] Folin-Ciocalteu
[2] Tannic acid

شد با این تفاوت که در لوله آزمایش به جای عصاره ۱۰۰ میکرولیتر متانول ۸۰ درصد اضافه گردید.

فعالیت به دام انداختن رادیکال در عصاره‌ها و نمونه‌های BHT، اسید آسکوربیک و آلفاتوکوفرول به صورت درصد بازدارندگی بیان شد و با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید[۲۷]:

درصد به دام انداختن رادیکال آزاد = ۱۰۰* (میزان جذب نمونه − میزان جذب کنترل) / میزان جذب کنترل

## ۲-۵-۲- اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از روش بی رنگ شدن بتاکاروتن

روش اسپکتروفتومتری میلر که بر اساس توانایی عصاره‌ها در کم کردن مقدار از دست رفتن اکسیداتیو بتاکاروتن در یک امولسیون بتاکاروتن/لینولئیک اسید می‌باشد، مورد استفاده قرار گرفت. ۰/۲ میلی گرم از بتاکاروتن کریستاله در ۱۰ میلی لیتر کلروفرم حل گردید و ۱ میلی لیتر از محلول تهیه شده به فلاسک ته‌گردی که حاوی ۲۰ میلی گرم لینولئیک اسید و ۲۰۰ میلی گرم توئین ۴۰ بود افزوده گردید[۲۰] پس از خارج شدن کلروفرم توسط گاز ازت[۲۲] ۵۰ میلی لیتر آب مقطر اکسیژنه شده[۲۸] به فلاسک افزوده گردید و فلاسک برای تشکیل امولسیون به شدت هم زده شد. ۵ میلی لیتر از امولسیون تهیه شده به لوله‌های آزمایش که حاوی ۰/۲ میلی لیتر از غلظت‌های مختلف نمونه و استانداردها بود، اضافه گردید و بلافاصله در زمان صفر جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۷۰ نانومتر خوانده شد. یک نمونه کنترل که حاوی ۰/۲ میلی لیتر متانول ۸۰ درصد به جای نمونه‌ها بود، برای مقایسه فعالیت آنتی-اکسیدانی استفاده گردید. سپس درب لوله‌های آزمایش بسته شد و در حمام آب گرم با دمای ۵۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. جذب نمونه‌ها در فواصل زمانی مشخصی اندازه گیری گردید، تا زمانی که بتاکاروتن در نمونه کنترل کاملاً بی رنگ گردید. امولسیون دیگری فاقد بتاکاروتن ساخته شد و ۵ میلی لیتر از آن به ۰/۲ میلی لیتر متانول ۸۰ درصد افزوده گردید و به عنوان شاهد استفاده شد[۲۰].

فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید[۲۷]:

$$AA = ۱۰۰\left[۱-\frac{A_0 - A_t}{A_0^{\circ} - A_t^{\circ}}\right]$$

AA : فعالیت آنتی‌اکسیدانی

$A_0$ و $A_0^{\circ}$ : مقدار جذب نمونه و کنترل در زمان صفر

$A_t$ و $A_t^{\circ}$ : مقدار جذب نمونه و کنترل پس از ۱۸۰ دقیقه

## ۲-۵-۳- بررسي قدرت احياكنندگي

در اين مدل سيستم، ميزان توانايي احياكنندگی عصاره گياه كرفس كوهي با آنتي‌اكسيدان‌هاي BHT، اسيد آسكوربيك و آلفاتوكوفرول مقايسه شد و برای انجام آزمايش، ۰/۵ ميلي ليتر از عصاره گياه كرفس كوهي كه حاوي غلظت‌هاي مختلف تركيبات فنوليك بود با ۰/۵ ميلي ليتر بافرفسفات (pH=۶/۶ و ۲ مولار) و ۰/۵ ميلي ليتر محلول ۰/۱ درصد پتاسيم فري سيانيد[۱] در لوله‌هاي آزمايش مخلوط گرديد و لوله هاي

---

[۱] Potassium Ferricyanide[$K_3(Fe(CN)_6$]

آزمايش به مدت ۲۰ دقيقه در حمام آب گرم با دماي ۱±۵۰ درجه سانتيگراد قرار داده شدند. پس از افزودن ۰/۵ ميلي ليتر از محلول ۱۰ درصد تري‌كلراستيك اسيد، مخلوط به مدت ۱۰ دقيقه در دستگاه سانتريفوژ با دور g*۱۵۰۰ سانتريفوژ گرديد و سپس ۱/۰ ميلي ليتر از محلول بالاي لوله آزمايش برداشته شد و با ۱/۰ ميلي ليتر آب مقطر و ۰/۲ ميلي ليتر از محلول ۰/۱ درصد، فريك كلريد (با ٦ مولكول آب)[1] به خوبي مخلوط گرديد سپس لوله‌هاي آزمايش به مدت ۱۰ دقيقه در دماي اتاق (۲±۲۸ درجه سانتيگراد) قرار داده شدند و بعد از سپري شدن مدت زمان لازم ميزان جذب در طول موج ۷۰۰ نانومتر بررسي شد و از متانول ۸۰ درصد براي صفر كردن دستگاه اسپكتروفتومتر استفاده گرديد. مقدار جذب نمونه كنترل كه به جاي عصاره گياه حاوي متانول ۸۰ درصد بود قرائت گرديد و از مقدار جذب تمام نمونه‌ها كسر شد. آنتي‌اكسيدان‌هاي استاندارد آلفاتوكوفرول، BHT و آسكوربيك اسيد نيز براي مقايسه قدرت احياكنندگي نمونه استفاده شد. مقدار جذب بيشتر نشان دهندة قدرت احياكنندگي بيشتر مي باشد[۱۳].

### ۲-۵-۴- بررسي قدرت آنتي‌اكسيداني با استفاده از مدل سيستم تيوسيانات

براي بررسی فعاليت آنتی‌اكسيدانی عصاره گياه در اين مدل سيستم ابتدا امولسيون اسيد لينولئيك با مخلوط كردن ۰/۲۸ گرم اسيد لينولئيك با ۰/۲۸ گرم توئين ٤۰ و ۵۰ ميلي ليتر بافر فسفات (pH= ۷/۰ و ۰/۲ مولار) و انجام هموژنيزاسيون تهيه شد. عصار كرفس كوهي در غلظت-هاي مختلف تركيبات فنوليك در متانول ۸۰ درصد تهيه شد و ۰/۵ ميلي ليتر از نمونه‌ها با ۲/۵ ميلي ليتر امولسيون اسيد لينولئيك و ۲/۵ ميلي ليتر فسفات بافر (pH= ۷/۰ و ۰/۲ مولار) مخلوط گرديد، لوله‌هاي آزمايش به مدت ۱۵۰ ساعت در دماي ۳۷ درجه سانتيگراد قرار داده شدند. نمونه كنترل مانند آنچه كه ذكر شد ولي فاقد عصاره گياه تهيه شد. هر ۲٤ ساعت از مخلوطي كه در ۳۷ درجه سانتيگراد قرار داده شده بود، ۰/۱ ميلي ليتر برداشته شد و با ۵/۰ ميلي ليتر محلول اتانول ۷۵ درصد و ۰/۱ ميلي ليتر از محلول آمونيوم تيوسيانات[2] ۳۰ درصد و ۰/۱ ميلي ليتر محلول فروس كلريد[3] ۲۰ ميلي مولار تهيه شده در اسيد كلريدريك ۳/۵ درصد، مخلوط گرديد، مخلوط به مدت ۳ دقيقه در دماي اتاق قرار داده شد و توسعه رنگ در طول موج ۵۰۰ نانومتر توسط اسپكتروفتومتر خوانده شد و از متانول ۸۰ درصد براي صفر كردن دستگاه استفاده شد. فعاليت آنتي‌اكسيداني در ۱۲۰ ساعت با استفاده از فرمول زير محاسبه گرديد[۲۴]:

$$\text{درصد فعاليت آنتي-اكسيداني} = [\,(\text{افزايش جذب}) * ۱۰۰\,] - ۱۰۰$$

BHT و آلفاتوكوفرول به عنوان آنتي‌اكسيدان‌هاي استاندارد براي مقايسه قدرت آنتي‌اكسيداني استفاده شدند.

---

[1] Iron (III) chloride ($FeCl_3.6H_2O$)
[2] Ammonium thiocyanate ($NH_4SCN$)
[3] Iron (II)chloride

### ۲-۵-۵- اثر عصاره گیاه کرفس کوهی در به تأخیر انداختن اکسیداسیون روغن آفتابگردان

عصاره گیاه کرفس کوهی و آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT در تیمارهای، ۵۰۰ قسمت در میلیون کرفس کوهی به همراه ۲۰۰ قسمت در میلیون BHT (A)، ۵۰۰ قسمت در میلیون کرفس کوهی (B)، ۲۵۰ قسمت در میلیون کرفس کوهی به همراه ۲۰۰ قسمت در میلیون BHT (C)، ۲۵۰ قسمت در میلیون کرفس کوهی (D)، ۲۰۰ قسمت در میلیون BHT (E) و نمونه فاقد آنتی-اکسیدان (کنترل،F)، به ۲۱ گرم روغن آفتابگردان درون شیشه‌های تیره رنگ افزوده شد و پس از بستن درب شیشه‌ها به مدت ۱۴ روز در دمای ۳ ± ۶۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد[۲۰] و در روزهای صفر، سه، هفت و چهاردهم عدد پراکسید نمونه‌های روغن با استفاده از روش AOAC تعیین شد[۱۲]. در این آزمایش به جای دمای نزدیک به ۱۰۰ درجه سانتیگرادکه باعث می‌شود هیدروپراکسیدها تجزیه شوند و آنتی‌اکسیدان-های سنتزی به صورت فرار درآیند و در نتیجه فعالیت آنتی‌اکسیدانی ضعیفی نشان دهند از درجه حرارت ۳±۶۰ استفاده شد. روند افزایش عدد پراکسید نشان دهنده کارآیی آنتی‌اکسیدان در به تأخیر انداختن اکسیداسیون می‌باشد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید[۲۰]:

درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی = ۱۰۰ - [(افزایش عدد) / (افزایش عدد) * ۱۰۰]

### ۲-۶- طرح آماری مورد استفاده و روش آنالیز نتایج

برای آنالیز نتایج حاصل از آزمایشات از نرم افزارهای SAS و SPSS و روش‌های آزمون مقایسه میانگین (دانکن) و رگرسیون خطی در قالب طرح کاملاً تصادفی و آزمایشات فاکتوریل با ۲ یا ۳ تکرار استفاده شده است.

## ۳- نتایج و بحث

### ۳-۱- تعیین مقدار کل ترکیبات فنولیک

مقدار کل ترکیبات فنولیک استخراج شده از گیاه کرفس کوهی ۰/۰۱±۱/۰۳۳ میلی گرم در گرم وزن خشک گیاه محاسبه شد.

کاهکونن و همکارانش (۱۹۹۹) گزارش کردند که مقدار ترکیبات فنولیک در گیاهان مورد آزمایش آنها بسیار متنوع بوده است، و این مقدار بین ۰/۲ تا ۱۵۵/۳ میلی گرم اکی‌والانت گالیک اسید در گرم ماده خشک گیاه متفاوت بوده است. در بین گیاهان خوراکی، کمترین مقدار ترکیبات فنولیک در غلات و سبزیجات یافت شد، در حالی که خانواده توتها حاوی مقدار زیادی ترکیبات فنولیک بودند و مقادیر متوسط ترکیبات فنولیک در عصاره گیاهان علفی یافت شد[۱۵].

### ۳-۲- محاسبه مقدار کل فلاونوئیدها

نتایج حاصل از محاسبه مقدار کل فلاونوئیدها در عصاره متانولی کرفس کوهی نشان داد که مقدار کل فلاونوئیدها در عصاره این گیاه برابر با ۰/۰۶±۰/۵۹۵میلی گرم در گرم وزن خشک گیاه است و نسبت مقدار کل فلاونوئیدها به کل ترکیبات فنولیک محاسبه شده، ۵۸ درصد است. این نسبت نشان می‌دهد که در کرفس کوهی حدود نصف ترکیبات فنولیک استخراج شده را فلاونوئیدها تشکیل می‌دهند.

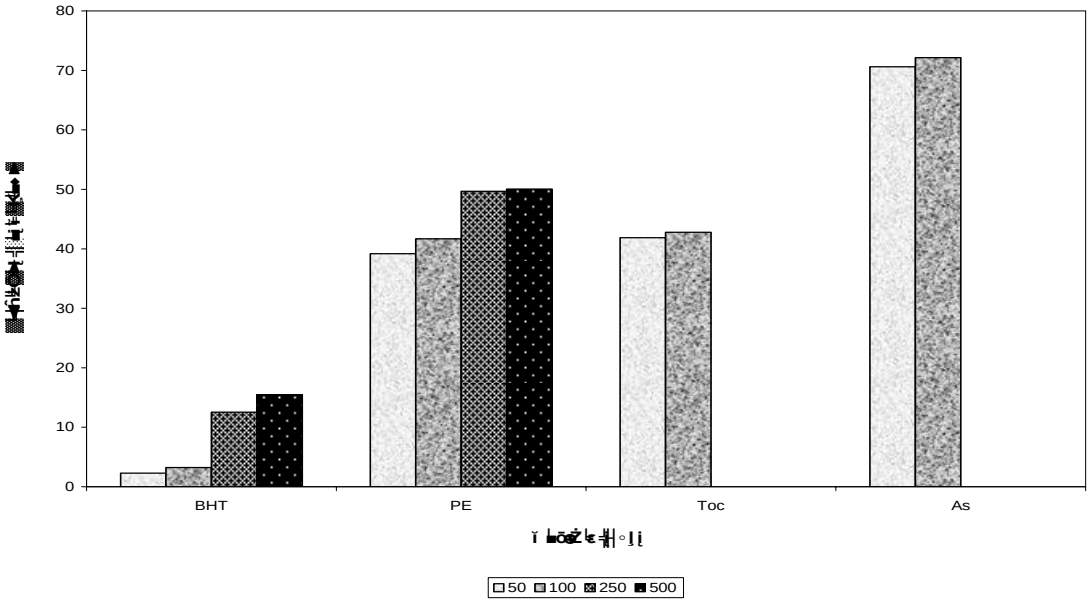
مقدار کل فلاونوئیدها در یک نوع ریحان[1] توسط ویرا و همکاران (۲۰۰۱)، گزارش شده است که این مقدار بسیار متنوع است و بین ۰/۰۱ تا ۲/۹ میلي گرم در گرم وزن خشك برگهاي گیاه متفاوت است[۳۰]. این تفاوت ممکن است به دلیل تفاوت در واریته و یا شرایط متفاوت رشد باشد [۱۰] .

## ۳-۴- بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی کرفس کوهی

### ۳-۴-۱- به دام‌انداختن رادیکال‌هاي آزاد با استفاده از روش DPPH

رادیکال‌هاي DPPH پایدار هستند و سرعت تخریب و واکنش‌پذیري آنها نسبت به سایر ترکیبات پایین مي‌باشد[۲۵] اما یك آنتي‌اکسیدان از طریق دادن اتم هیدروژن به مولکول DPPH آن‌را غیر فعال مي‌نماید و باعث کاهش جذب محلول مي‌گردد که به صورت کم رنگ شدن از ارغواني به زرد قابل تشخیص است[۲۰].

درصد به دام انداختن رادیکال‌های آزاد توسط ترکیبات فنولیک در شکل ۱ نشان داده شده است و این نتایج به صورت درصد احیا رادیکال-های اولیه DPPH که توسط ترکیبات مورد آزمون جذب شده اند بیان شده است. اسید آسکوربیک (۵۰ و ۱۰۰ قسمت در میلیون) در این مدل سیستم با فعالیتی در حدود ۷۱/۳۷ % بیشترین فعالیت را داشت. عصاره گیاه و آلفا-توکوفرول فعالیت متوسطی نشان دادند. فعالیت عصاره گیاه در غلظت ۱۰۰ قسمت در میلیون معادل فعالیت آلفا-توکوفرول (۵۰ و ۱۰۰ قسمت در میلیون) بود و تمامی این تیمارها به طور قابل ملاحظه ای ($\rho<0/01$) از BHT بهتر بودند.




شکل ۱- فعالیت به دام انداختن رادیکال آزاد توسط عصاره گیاه (PE)، آلفاتوکوفرول (Toc)، اسید آسکوربیک (As) و BHT در روش DPPH در غلظتهای مختلف (قسمت در میلیون).

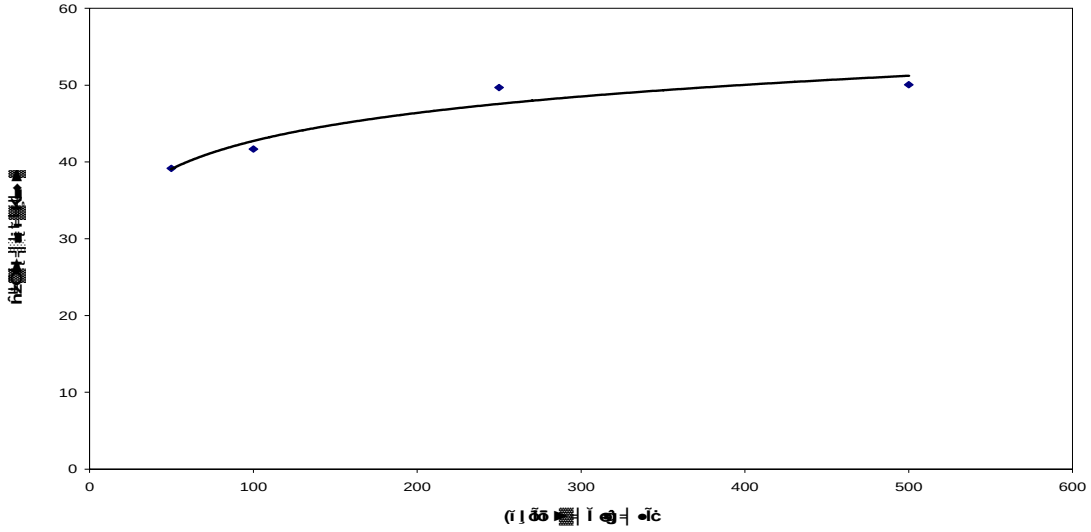
فعالیت عصاره گیاه در دو غلظت ۵۰۰ و ۲۵۰ قسمت در میلیون تفاوت معنی داری نداشت (شکل ۲)، در واقع مي‌شود نشان داد که یك

---

[1] *Ocimum gratissimum*

غلظت بحراني از تركيبات فنوليك براي حصول فعاليت آنتي‌اكسيداني مطلوب كافي است. در اين مرحله تأثير اشباعيت[1] ظاهر مي‌شود و اضافه كردن مقادير بيشتري از تركيبات آنتي‌اكسيداني، فعاليت آنتي‌اكسيداني را افزايش نمي‌دهد.

چووان و همكاران (۲۰۰٤)، گزارش كردند، با اينكه غلظت تركيبات فنوليك اندازه‌گيري شده به روش فولين‌ـسيوكالتو در عصاره آبي حاصله از پونه كوهي (۳۹/٤ ميلي گرم در گرم وزن خشك) بيشتر ازغلظت اين تركيبات در عصاره متانولي اين گياه (۳۵/٤۳ ميلي گرم در گرم وزن خشك) مي‌باشد اما فعاليت عصاره متانولي گياه در مدل DPPH بيشتر (۸۲ درصد) از فعاليت عصاره آبي آن (۸۰ درصد) است در واقع نتايج اين محققان نشان مي‌دهد كه طبيعت فيزيكوشيميايي تركيبات فنوليك موجود در عصاره نسبت به غلظت اين تركيبات، نقش تعيين‌كننده‌تري در فعاليت آنتي‌اكسيداني عصاره دارد[۴]. فعاليت عصاره متانولي پونه كوهي در غلظت ٥ ميكرو گرم، در مدل سيستم DPPH برابر ۳۷ درصد گزارش شده است[۲].




شكل ۲- همبستگي بين غلظت تركيبات فنوليك و اثر به دام انداختن راديكال DPPH

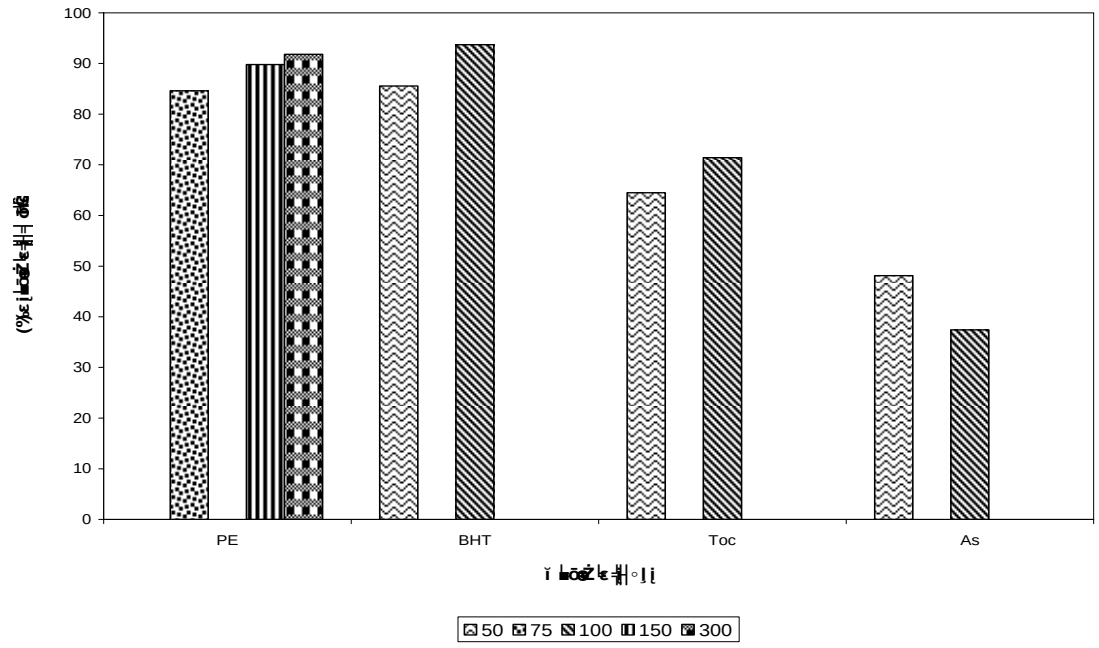
در چغندر سوئيسي رابطه خطي خوبي بين محتواي كل تركيبات فنوليك و درصد به دام انداختن راديكال DPPH وجود دارد، اين نتايج نشان مي-دهد كه مي‌توان ظرفيت به دام انداختن راديكال آزاد را به غلظت گروه-هاي هيدروكسيل فنولي موجود ارتباط داد[۲۴].

### ۳-۴-۲- روش بي‌رنگ شدن بتاكاروتن

اساس اين مدل سيستم بي‌رنگ شدن بتاكاروتن مي‌باشد كه مكانيسم آن واكنش بتاكاروتن با راديكال آزاد توليد شده در نتيجه تشكيل هيدروپراكسيد از لينولئيك اسيد است[۱۷].

---

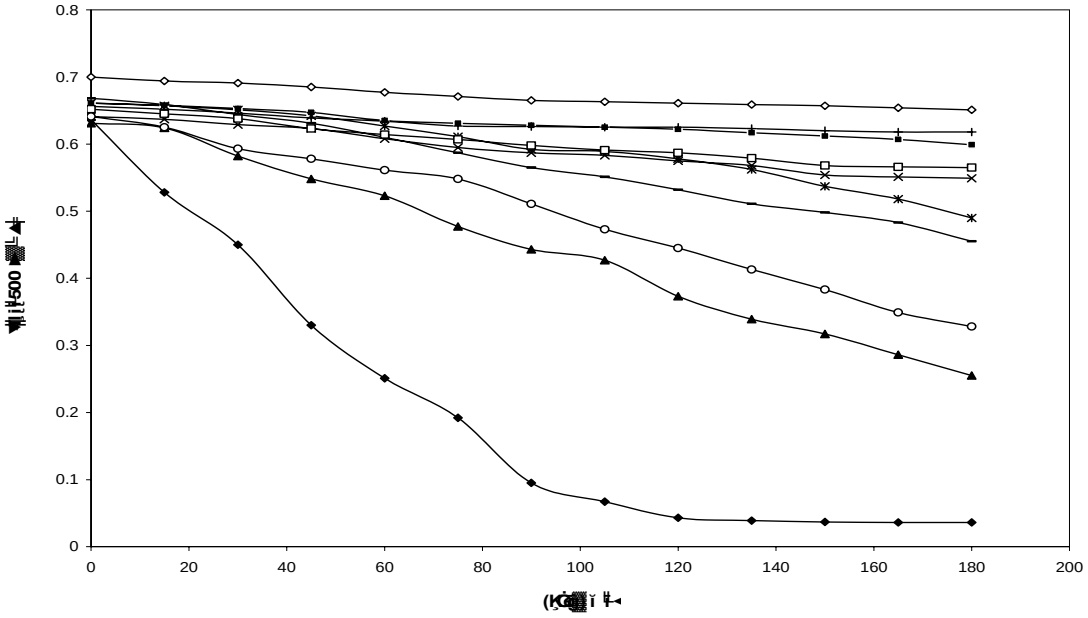
[1] Saturation effect




شکل ۳- اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره کرفس کوهی در مدل سیستم بتاکاروتن در مقایسه با آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی و سنتزی BHT، آلفاتوکوفرول و آسکوربیک اسید در غلظتهای مختلف (قسمت در میلیون).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه که از طریق بی رنگ شدن بتاکاروتن اندازه‌گیری شده است در مقایسه با فعالیت BHT، آلفاتوکوفرول و آسکوربیک اسید در شکل ۳ نشان داده شده است. با اینکه بیشترین اثر آنتي‌اکسیداني در مدل سیستم بي‌رنگ شدن بتاکاروتن مربوط به BHT در غلظت ۱۰۰ قسمت در میلیون مي‌باشد اما فعالیت عصاره کرفس کوهي در غلظت‌هاي ۳۰۰ و ۱۵۰ قسمت در میلیون که به ترتیب بعد از BHT قرار گرفته‌اند، تفاوت معني داري ($\rho<0/01$) با اثر BHT ندارد که نشان دهندة قابلیت عصاره این گیاه جهت استفاده به عنوان آنتي‌اکسیدان طبیعي مي‌باشد. فعالیت بالاي آنتي‌اکسیداني ترکیبات فنولیك حاصل از گیاه کرفس کوهي نشانه فعالیت بیولوژیکي عصاره این گیاه در جلوگیري از تجزیه اکسیداتیو لیپیدهاي غشایي است.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی به این ترتیب BHT> عصاره گیاه> آلفا-توکوفرول> اسید آسکوربیک کاهش می‌یابد. در مقایسه با آلفا-توکوفرول که فعالیت قابل ملاحظه‌ای نشان داد، اسید آسکوربیک فعالیت آنتی‌اکسیدانی نداشت. به استثنای اسید آسکوربیک، برای سایر تیمارها بین غلظت آنتی‌اکسیدان و فعالیت آن رابطه مستقیمی وجود داشت. شکل ۴ میزان کاهش جذب بتاکاروتن را حضور ترکیبات مورد آزمون نشان می‌دهد. مشاهده شد در نمونه کنترل که فاقد آنتي‌اکسیدان است میزان جذب به سرعت کاهش یافته و افت شدیدي داشته است. در مورد اسید آسکوربیك هم تقریباً چنین وضعیتي مشاهده شد.




شکل ۴- سرعت بی رنگ شدن بتاکاروتن در کنترل بدون آنتی‌اکسیدان (♦)؛ عصاره گیاه در غلظت ۷۵ (*)، ۱۵۰ (▪) و ۳۰۰ (◊) قسمت در میلیون؛ BHT، آلفاتوکوفرول و اسید آسکوربیک به ترتیب در غلظتهای ۵۰ (▫)، (-)، (○) و ۱۰۰ (+)، (*) ، (▲) قسمت در میلیون.

برخلاف این واقعیت که اسید آسکوربیك یك آنتي‌اکسیدان شناخته شده است آزمون بي‌رنگ شدن بتاکاروتن ویژگي آنتي‌اکسیداني این ترکیب را نشان نداد در واقع اسید آسکوربیك که یك آنتي‌اکسیدان قطبي است در فاز آبي امولسیون باقي مي‌ماند و وارد فاز روغني نمي‌شود و در فاز روغني غلظت کمي دارد در نتیجه در محافظت از اسید لینولئیك در برابر اکسیداسیون کمتر مؤثر مي‌باشد. این پدیده اخیراً گزارش شده و به عنوان "Polar paradox" نام‌گذاري شده است[۱۷]. طبق تعریفي که براي پدیدة Polar paradox ذکر مي‌شود، آنتي‌اکسیدان‌هاي آبدوست در محیط روغني[1] نسبت به انواع آبگریز مؤثرتر هستند در حالي که آنتي‌اکسیدان‌هاي آبگریز در امولسیون‌ها فعالیت بیشتري نشان مي‌دهند[۱۹].

تپ و همکاران (۲۰۰۵)، در تحقیقی که روی گیاه *Salvia tomentosn* (Miller) انجام دادند فعالیت آنتي‌اکسیداني قسمت محلول در آب عصاره متانولی این گیاه را در مدل سیستم بي‌رنگ شدن بتا کاروتن ۹۰/۶ درصد گزارش کرده‌اند که فعالیت این عصاره نزدیك به فعالیت آنتي‌اکسیدان سنتزي BHT بوده است[۲۸].

### ۳-۴-۳- بررسی قدرت احیاکنندگی

احیا آهن معمولاً به عنوان شاخصی برای فعالیت الکترون دهندگی، که مکانیسمی مهم در فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولیك است، استفاده می‌شود[۶]. در این مدل سیستم احیا آهن (III) از طریق تولید کمپلکس رنگی به نام پروسین بلو[2] اندازه‌گیری می‌شود[۱۶].

قدرت احیاکنندگی غلظتهای مختلف از عصاره گیاه و ترکیبات استاندارد در جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج جدول نشان می‌دهد

---

[1] Bulk oil

[2] Prussian Blue [$Fe_4(Fe(CN)_6)_3$]

که بهترین عملکرد مربوط به آسکوربیک اسید بوده است و پس از آن به ترتیب عصاره کرفس کوهی، BHT و آلفاتوکوفرول قرار دارند. قدرت احیا کنندگی ترکیبات فنولیک موجود در عصاره کرفس کوهي تفاوت معنی دار ($\rho<0/01$) با اثر احیاکنندگي BHT و آلفاتوکوفرول ندارد و در نتیجه می‌توان عصاره این گیاه را به عنوان یک ترکیب احیاکننده مؤثر معرفی نمود. عصاره گیاه دارای خاصیت الکترون دهندگی بود و توانست رادیکال‌های آزاد را به محصولات پایدارتری تبدیل کند و واکنش-های زنجیره‌ای رادیکال آزاد را خاتمه دهد.

جدول ۱- قدرت احیا کنندگی عصاره گیاه در مقایسه با اسید آسکوربیک، BHT و آلفاتوکوفرول.

| غلظت (قسمت در میلیون) | جذب در ۵۰۰ نانومتر | | | |
|---|---|---|---|---|
| | عصاره گیاه | اسید آسکوربیک | BHT | آلفاتوکوفرول |
| ۵۰ | — | ۰/۷۴ | ۰/۲۴ | ۰/۰۴ |
| ۱۰۰ | ۰/۰۸ | ۱/۶۹ | ۰/۶۴ | ۰/۲۱ |
| ۳۰۰ | ۰/۵۰ | — | — | — |
| ۵۰۰ | ۰/۹۱ | — | — | — |

تاناکا و همکاران (۱۹۸۸)، نشان دادند که با افزایش قدرت احیاکنندگي، فعالیت آنتي‌اکسیداني به صورت تابع نمایي افزایش می‌یابد در واقع این محققان نشان دادند که داشتن اثر آنتي‌اکسیداني ملزم به وجود قدرت احیاکنندگي است[۷].

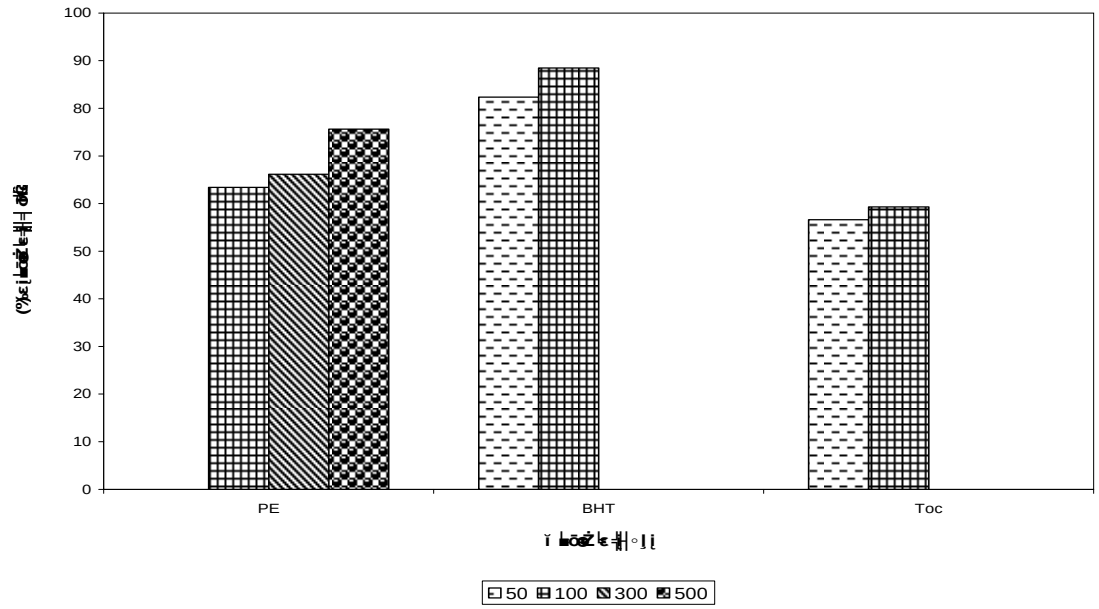
در یك میلي گرم از عصاره دالس[1] مقدار کل ترکیبات فنولیك معادل ۱۰/۳ میکروگرم اسید گالیك می‌باشد. یووان و همکاران (۲۰۰۵)، قدرت احیاکنندگي عصاره دالس را در مدل سیستم قدرت احیاکنندگي معادل ۹/۶۸ میکروگرم L-آسکوربیك اسید گزارش کرده اند[۳۲].

### ۳-۴-۴- بررسي فعالیت آنتي‌اکسیداني با استفاده از روش تیوسیانات

روش تیوسیانات براي تعیین مقدار پراکسید در مرحله آغازین اکسیداسیون لیپیدها استفاده می‌گردد. در این مدل سیستم هرچه شدت رنگ قرمز بیشتر باشد، نشانه اکسید شدن مقدار بیشتري از اسید لینولئیك است[۱۴] و غلظت پراکسیدها با افزایش فعالیت آنتي‌اکسیداني کاهش می‌یابد[۸].

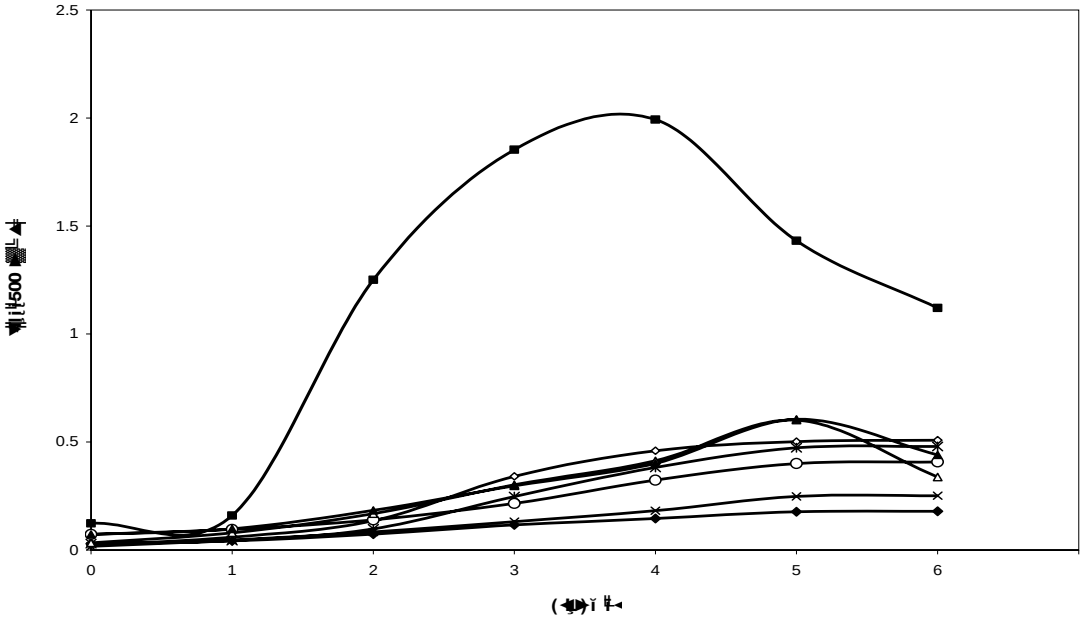
---

[1] Dulse (*Palmana palmate*)




شکل ۵- فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه (PE)، BHT و آلفاتوکوفرول (Toc) در غلظتهای مختلف (قسمت در میلیون) در مدل تیوسیانات.

در مدل سیستم تیوسیانات فعالیت آنتي‌اکسیداني ترکیب مورد آزمون در مقایسه با کنترل به صورت درصد فعالیت آنتي‌اکسیداني نشان داده مي‌شود. همانطور که در شکل ۵ دیده می‌شود عصاره گیاه بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را در غلظت ۵۰۰ قسمت در میلیون نشان داد (AA=۷۵/۶۱) با اینکه فعالیت آن کمتر از فعالیت BHT (AA=۸۸/۴۶، ۱۰۰ قسمت در میلیون) بود اما نسبت به فعالیت آلفاتوکوفرول در غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰ قسمت در میلیون (۵۶/۶۱ و ۵۹/۲۸= AA%، به ترتیب) بیشتر بود. نتایج حاصل از این مدل سیستم نشان داد که افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی در این سیستم با افزایش مقدار کل ترکیبات فنولیک موجود در عصاره همخوانی دارد، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که کل ترکیبات فنولیک هر عصاره مسئول فعالیت آنتی-اکسیدانی آن می‌باشد. این نتایج نشان مي‌دهد که عصاره کرفس کوهي با رادیکال‌ها بویژه رادیکال‌هاي پراکسي که عوامل اصلي پیشرفت اتواکسیداسیون چربي‌ها مي‌باشند، واکنش مي‌دهند و در نتیجه واکنش‌هاي زنجیره‌اي را پایان مي‌دهند.




شکل ۶- افزایش جذب در کنترل (▪)؛ عصاره گیاه در غلظتهای ۱۰۰ (◊)، ۳۰۰ (*) و ۵۰۰ (○)؛ BHT و آلفاتوکوفرول به ترتیب در غلظتهای ۵۰ (*)، (Δ) و ۱۰۰ (♦)، (▲) قسمت در میلیون در مدل سیستم تیوسیانات.

کمترین افزایش جذب مربوط به BHT است و بعد از آن نمونه‌هاي حاوي عصاره کمترین افزایش جذب را نشان مي‌دهند (شکل ۶). در نمونه کنترل که فاقد آنتي‌اکسیدان است تا روز چهارم میزان جذب به سرعت افزایش مي‌یابد اما از آن به بعد تا روز ششم سیر نزولي طي مي‌کند. روند مشابهي در مورد آلفاتوکوفرول هم مشاهده مي‌گردد با این تفاوت که میزان جذب تا روز پنجم افزایش یافته و بعد از آن در روز ششم کاهش یافته است. کاهش جذب به دلیل تجزیه هیدروپراکسیدهاي تولید شده مي‌باشد این ترکیبات به ترکیبات ثانویه اکسیداسیون مانند مالون آلدهید تبدیل مي‌شوند این ترکیبات ناپایدار هستند و در این روش قابل اندازه‌گیري نمي‌باشند. هرچه مقدار جذب کمتر باشد فعالیت آنتي-اکسیداني کل بیشتر است. نتایج نشان می‌دهد که عصاره گیاه قادر است با رادیکالهای آزاد به ویژه رادیکالهای پراکسی که عامل اصلی پیشرفت اتواکسیداسیون چربی ها هستند [۲۶] واکنش دهد و در نتیجه مانع انجام واکنشهای زنجیره ای شود.

پیو و همکاران (۲۰۰٤)، فعالیت آنتي‌اکسیداني عصاره برگ‌هاي قرمز نوعي چغندر سوئیسي[1] را در مدل سیستم تیوسیانات در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلي لیتر، ۷۲/۵ درصد گزارش کردند فعالیت این عصاره معادل و یا کمي بیشتر از فعالیت آلفاتوکوفرول گزارش شده است (فعالیت آنتي‌اکسیداني آلفاتوکوفرول برابر با ۷۱/۸ درصد گزارش شده است) اما نسبت به BHT که درصد فعالیت آنتي‌اکسیداني آن معادل ۸۸/۲ درصد می‌باشد، فعالیت کمتری داشته است[۲۴].

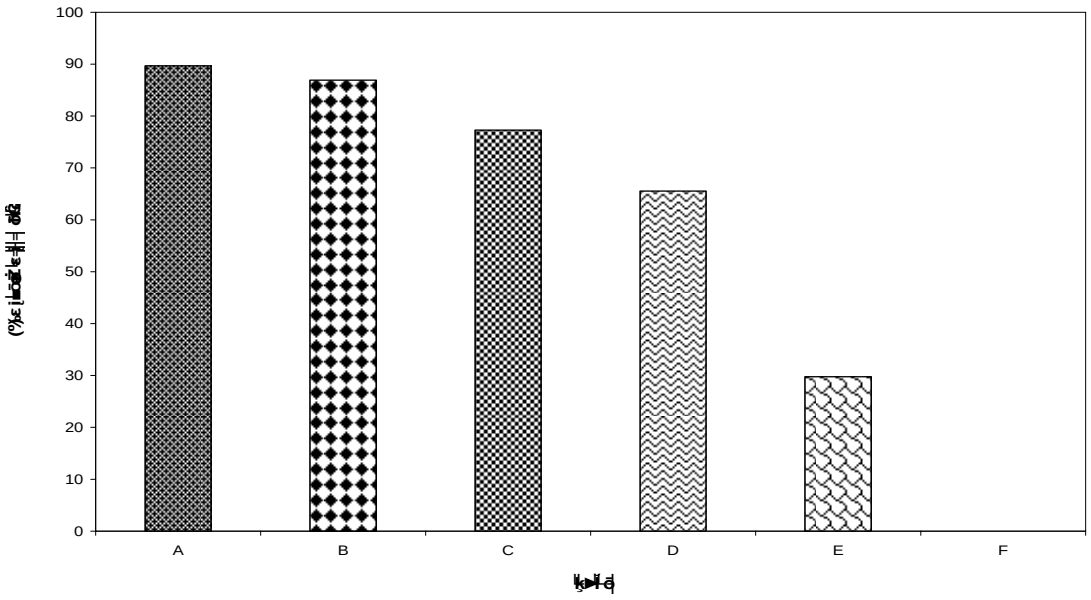
---

[1] Swiss Chard

### ۳-۴- ۵- بررسي اثر آنتي‌اكسيداني عصاره كرفس كوهي در روغن

دوره اكسيداسيون به مدت ۱۴ روز در دماى ۳ ± ۶۰ درجه سانتيگراد در شكل ۷ نشان داده شده است. نتيجه جالب حاصله از شكل ۷، فعاليت آنتي‌اكسيداني بيشتر نمونه C، نسبت به نمونه A مي‌باشد البته از نظر آماري اين دو تيمار تفاوت معني‌داري با هم ندارند. معنى دار نبودن تفاوت تيمارهاى C و A مي‌تواند ناشي از تأثير اشباعيت در مورد تركيبات فنوليك باشد يعني افزايش غلظت اين تركيبات در روغن آفتابگردان در غلظت بيشتر از ۲۵۰ قسمت در ميليون روي فعاليت آنتي-اكسيداني تركيبات فنوليک اثري ندارد و حتي شايد افزايش غلظت باعث ايجاد اثر پرواكسيداني گردد. دليل ديگري كه مي‌توان براي اين مشاهده ذكر كرد اثر سينرژيستي BHT و عصاره كرفس كوهي در غلظت‌هاي كم است. اثر آنتي‌اكسيداني تيمار B بين دو تيمار A و D قرار دارد مي‌توان نتيجه گرفت كه وقتى تركيبات فنوليک در غلظت‌هاى بالا حضور دارند، BHT روي فعاليت تركيبات فنوليك موجود در عصاره كرفس كوهي اثر سينرژيستي ندارد از طرفي مجدداً عدم تأثير افزايش غلظت تركيبات فنوليك بر روي اثر آنتي‌اكسيداني اين تركيبات اثبات مي‌شود. كمترين اثر آنتي‌اكسيداني در اين سيستم مربوط به نمونه‌اى است كه در آن BHT به تنهايى استفاده شده است.

پژوهش‌هاى متعددى در زمينه اثر آنتى‌اكسيدانى ادويه‌ها روى پايدارى روغن‌ها و غذاهاى حاوى روغن انجام گرفته است. چى من و جاسور اثبات كردند كه افزودن عصاره رزمارى و يک نوع نعناع به روغن پالم فساد اكسيداتيو روغن و محصول سرخ شده را در طى سرخ كردن به تأخير مى‌اندازد[۳]. پترسون (۲۰۰۱)، گزارش كرد كه عصاره جوي دو سر در غلظت ۰/۱ - ۰/۰۵ درصد باعث بهبود پايداري روغن در دماي سرخ كردن مي‌شود. نتايج اين محققان نشان داد كه اثر عصاره جو دو سر قوي-تر از اثر BHT و TBHQ بوده است[۲۱].




شكل ۷- فعاليت آنتى‌اكسيدانى بعد از ۱۴ روز و در دماى ۳±۶۰ درجه سانتيگراد

### ۴- تشكر و قدردانى

بدين وسيله از آقايان مهندس بهمن بهرامى (گروه علوم و صنايع غذايى، دانشگاه صنعتى اصفهان) و مهندس سيد حميد خشوعى (گروه علوم

دامی، دانشگاه صنعتی اصفهان)، به دلیل کمکهای ایشان تشکر و قدردانی می‌گردد.

## ۵- منابع


[1] Abdalla, A. E. and Roozen, J. P., 1999, "Effect of plant extracts on the oxidative stability of sunflower oil and emulsion", *Food Chem.*, Vol.64, pp. 323-329.

[2] Cervato, G., Carabelli, M., Gervasio, S., Cittera, A., Cazzola, R. and Cestaro, B., 2000, "antioxidant properties of oregano (*Origanum vulgar*) leaf extracts", *J. Food Biochem.*, Vol. 24, pp. 453-465.

[3] Che Man, Y. B. and Jaswir, I., 2000, "Effect of rosemary and sage extracts on frying performance of refined, bleached and deodorized (RBD) palm olein during deep-fat frying", *Food Chem.*, Vol. 69, pp. 301-307.

[4] Chun, S. S., Vattem, D. A., Lin, Y. T. and Shetty, K., 2005, "Phenolic antioxidants from clonal Oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*", *Process Biochem.*, Vol. 40, No. 2, pp. 809-816.

[5] Cuvelier. M. E., Berset. C. and Richard. H., 1994. Antioxidant constituents in sage (*Salvia officinalis*). *J. Agric. Food Chem.*, 42: 665.669.

[6] Dorman, H.J.D., Peltoketo, A., Hiltunen, R. and Tikkanen, M. J., 2003, Characterisation of the antioxidant properties of deodourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food Chem.*, Vol.83, No. 2, pp. 255-262.

[7] Duh, P. D. and Yen, G. C., 1997, "Antioxidative activity of three herbal water extracts", *Food Chem.*, Vol. 60, No. 4, pp. 639-645.

[8] Endrini, S., Rahmat, A., Ismail, P. and Yun Hin, T. Y., 2002, "Anticarcinogenic properties and antioxidant activity of Henna (*Lawsonia inermis*)", *J. Med. Sci.*, Vol. 2, No. 4, pp. 194-197.

[9] Hagerman, A. E., Riedl, K. M., Jones, G. A., Sovik, K. N., Ritchard, N. T., Hartzfeld, P. W. and Riechel, T. L., 1998, "High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants", *J. Agric. Food Chem.*, Vol.46, No. 5, pp. 1887-1892.

[10] Häkkinen, S., Heinonen, M., Kärenlampi, S., Mykkänen, H., Ruuskanen, J. and Törrönen, R., "Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries", *Food Res. Int.*, Vol. 32, pp. 345-353, 1999.

[11] Heinonen. I, M., Lehtonen. P. J. and Hopia. A. I., 1998. Antioxidant activity of berry and fruit wines and liquors. *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 46, pp. 25-31.

[12] Helrich, K., 1990, *Official methods of analysis of the association of official analysis chemists*, 15$^{th}$Ed, Association of Official Analysis Chemists, Virginia.

[13] Hwang, J. Y., Shue, Y. S. and Chang, H. M., 2001, "Antioxidative activity of roasted and defatted peanut kernels", *Food Res. Int.*, Vol. 34, pp. 639-647.

[14] Jayaprakasha, G. K., Singh, R. P. and Sakaria, K. K., 2001, "Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models *in vitro*", *Food Chem.*, Vol. 73, pp. 285-290.

[15] Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S. and Heinonen, M, 1999, "Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds", *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 47, No. 10, pp. 3954-3962.

[16] Koşar, M., Dorman, H.J.D. and Hiltunen, R., 2005, "Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected Lamiaceae species, *Food Chem.*, Vol. 91, pp. 525-533.

[17] Kulisic, T., Radonic, A., Katalinic, V. and Milos, M., 2004, "Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil", *Food Chem.*, Vol. 85, pp. 633-640.

[18] Liu, M., Li, X. Q., Weber, C., Lee, C. Y., Brown, J. and Liu, R. H., 2002, "Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries", *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 50, No. 10, pp. 2926-2930.

[19] Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Domínguez, J. M., Sineiro, J., Domínguez, H., José Núñez, M. and Parajó, J. C., 2001, "Natural antioxidants from residual sources", *Food Chem.*, Vol. 72, pp. 145-171.

[20] Moure, A., Franco, D., Sineiro, J., Domínguez, H., Núñez, M. J. and Lema, J. M., 2000, "Evaluation of extracts from *Gevuina avellana* Hulls as antioxidants", *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 48, No. 9, pp. 3890-3897.

[21] Peterson, D. M., 2001, "Oat Antioxidants", *J. Cereal Sci.*, Vol. 33, pp. 115-129.

[22] Peterson, D. M., Emmons, C. L. and Hibbs, A. H., 2001, "Phenolic antioxidants and antioxidant activity in pearling fractions of oat groats", *J. Cereal Sci.*, Vol. 33, pp. 97-103.

[23] Pinelo, M., Rubilar, M., Sineiro, J. and Núñez, M. J., 2004, "Extraction of antioxidant phenolics from almond hulls (*Prunus amygdalus*) and pine sawdust (*Pinus pinaster*). *Food Chem.*, Vol. 85, pp. 267-273.

[24] Pyo, Y. H., Lee, T. C., Logendra, L. and Rosen, R. T., 2004 "Antioxidant activity and phenolic compounds of Swiss chard (*Beta vulgaris* subspecies *cycla*) extracts", *Food Chem.*, Vol. 85, pp. 19-26.

[25] Schwars, K., Bertelsen, G., Nissen, L. R., Gardner, P. T., Heinonen, M. I., Hopia, A., Huynh-Ba, T., Lambelet, P., McPhail, D., Skibsted, L. H. and Tijburg, L., 2001, "Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation: comparition of antioxidant assay based on radical

scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds", *Eur. Food Res. Technol.*, Vol. 212, pp. 319-328.
[26] Shahidi, F. and Wanasundara, P.K.J., 1992, Phenolic antioxidants, *Critic Rev. Food Sci. Nutr.*, Vol. 32, pp. 67-103.
[27] Singh, R. P., Chudambara Murthy, K. N. and Jayaprakasha, G. K., 2002, "Studies on the antioxidant activity of Pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using *in vitro* models", *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 50, No. 1, pp. 81-86.
[28] Tepe, B., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M. and Polissiou, M., 2005, "Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae)", *Food Chem.*, Vol. 90, pp. 333-340.
[29] Velioglu. Y. S., Mazza. G., Gao. L. and Oomah. B. D., 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 46, pp. 4113-4117.
[30] Vieira, R. F., Grayer, R. J., Patonb, A. and Simona, J. E., 2001, "Genetic diversity of *Ocimum gratissimum* L. based on volatile oil constituents, flavonoids and RAPD markers", *Biochem. System. Ecol.*, Vol. 29, pp. 287-304.
[31] Yen. G. C., Chen. H. Y. and Peng. H. H., 1997. Antioxidant and pro-oxidant effectds of various tea extracts. *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 45, pp. 30-34.
[32] Yuan, Y. V., Bone, D. E. and Carrington, M. F., 2005, "Antioxidant activity of dulse (*Palmaria palmata*) extract evaluated *in vitro*", *Food Chem.*, Vol. 91, pp. 485-494.