www.rifst.ac.ir/jrifst.aspx
نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی
سال 1392، جلد 2، شماره 2، صفحات 193-204
DOI: 10.22101/JRIFST.2013.09.16.227

JRIFST

شناسایی و اندازه‌گیری اسیدهای فنولی، فعالیت مهارکنندگی رادیکال و قدرت احیاءکنندگی آهن عصاره‌های اتانولی و متانولی زولنگ

شهلا سلمانیان[1*]، علیرضا صادقی ماهونک[2]، معصومه جامسون[3]، بیتا طباطبایی عمید[4]

1- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد،گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
* نویسنده مسئول (shahla.salmanian@gmail.com)
2- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
3- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان
4- مربی آموزشیار دانشگاه پیام نور واحد آق قلا

چکیده

در این پژوهش میزان کل ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی، فعالیت مهارکنندگی رادیکال و قدرت احیاءکنندگی عصاره‌های اتانولی و متانولی سبزی زولنگ بومی ایران (*Eryngium caucasicum* Trautv) مورد بررسی قرار گرفت. همچنین میزان اسیدهای فنولی موجود در عصاره متانولی زولنگ با دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارائی بالا اندازه‌گیری شد. میزان ترکیبات فلاونوئیدی در عصاره متانولی زولنگ بالاتر از عصاره اتانولی بود. همچنین این عصاره از فعالیت‌های آنتی اکسیدانی بالاتری نیز برخوردار بود (p <0/05). میزان EC_{50} در آزمون مهارکنندگی رادیکال DPPH برای عصاره متانولی زولنگ 119/66 میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای آنتی اکسیدان سنتزی BHT 42/13 میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. قدرت احیاءکنندگی عصاره‌ها با افزایش غلظت افزایش یافت اما BHT قدرت احیاءکنندگی بیشتری نشان داد. شناسایی اسیدهای فنولی عصاره متانولی با کروماتوگرافی مایع با کارائی بالا حاکی از وجود اسیدهای گالیک، کلروژنیک، کافئیک و پاراکوماریک بود. اسید فنولی غالب در عصاره کلروژنیک اسید (63/07 میلی‌گرم در 100 گرم ماده خشک) شناسایی شد. بر اساس نتایج به دست آمده، می‌توان سبزی زولنگ را به عنوان منبع غنی و جدید از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به عنوان افزودنی غذایی در صنعت غذا در نظر گرفت.

تاریخ دریافت: 92/03/11
تاریخ پذیرش: 92/06/09

واژه‌های کلیدی
اسید فنولی
زولنگ
فعالیت آنتی‌اکسیدانی
قدرت احیاءکنندگی

مقدمه

امروزه آنتی‌اکسیدان‌ها به طور فزاینده‌ای به منظور به تأخیر انداختن فرآیند اکسیداسیون به مواد غذایی اضافه می‌شوند. اما به دلیل اثرات نامطلوب آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی بر سلامت، یافتن منابع آنتی‌آکسیدانی طبیعی به میزان زیادی مورد توجه محافل علمی قرار گرفته‌اند. آنتی اکسیدان‌ها در غلظت پایین به طور قابل توجهی اکسیداسیون سوبستراهای قابل اکسید را به تأخیر انداخته یا ممانعت می‌نمایند (Choe & Min, 2009; Kamkar *et al.*, 2010). مطالعات بسیاری نشان داده است که مصرف میوه‌ها و سبزیجات با کاهش خطر ابتلا به بیماری‌هایی همچون قلبی-عروقی مرتبط است. حضور ترکیبات زیست فعال با خاصیت آنتی‌اکسیدانی بویژه ترکیبات پلی‌فنولی و

ویتامین‌ها در موادغذایی با منشا گیاهی، عامل مؤثر در حفظ سلامت انسان می‌باشد (Fraga *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011).

گیاه زولنگ با نام علمی *Eryngium caucasicum* Trautv متعلق به خانواده آپیاسه[1] (تیره جعفری)، گیاهی علفی و چند ساله است که به وفور در نواحی جنگلی شمال کشور یافت می‌شود که از دیر باز مورد توجه بومیان این منطقه بوده‌است. در ایران 9 گونه گیاه علفی خاردار از این جنس وجود دارد که رایج‌ترین گونه‌های آن *E.bungei*، *E.billardieri*، *E.caucasicum* می‌باشند (قهرمان،1372؛ مظفریان، 1382). در شمال ایران برگ‌های جوان زولنگ (قابلیت مصرف تا قبل از مرحله گل‌دهی و فاز زایشی) عمدتاً از مناطق جنگلی جمع‌آوری می‌شوند و در بازارهای محلی به فروش می‌رسند. برگ‌های زولنگ به عنوان سبزی خوراکی و عامل طعم دهنده به مقدار زیادی در تهیه غذاهای محلی کاربرد دارد. (Khoshbakht *et al.*, 2007). همچنین از بخش‌های مختلف این گیاه (ریشه، ساقه، برگ و گل آذین) اسانس استخراج می‌گردد (Hashemabadi & Kaviani, 2010). در مطالعات انجام شده روی چندین گونه از جنس ارنجیوم مشخص شده است که حاوی ترکیبات اسانسی، ترپنوئیدها، ساپونین‌ها، فلاونوئیدها، کومارین‌ها، پلی‌استیلن‌ها و استروئیدها است. عصاره‌ها و ترکیبات ایزوله شده از گونه‌های ارنجیوم نقش بالقوه خود را بعنوان غذا و دارو نشان داده‌اند (Wang *et al.*, 2012). گزارش شده است که بخش‌های هوایی گونه *E. foetidum* منبع غنی از کلسیم، آهن، ریبوفلاوین، کاروتن، ویتامین‌های A، B، C و نیز اسانس است. برگ‌های جوان و تازه این گیاه حاوی 85 درصد رطوبت، 3/3 درصد پروتئین، 0/6درصد چربی، 6/5 درصد کربوهیدرات، 1/7درصد خاکستر، 0/06درصد فسفر و 0/02 درصد آهن است (Paul *et al.*, 2011). در بررسی فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی برگ و گل آذین زولنگ در مرحله گل‌دهی نتایج محققان حاکی از فعالیت آنتی‌اکسیدانی بهتر برگ از گل‌آذین در کلیه آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی (قدرت احیاءکنندگی، قدرت چلات‌کنندگی یون آهن، مهار رادیکال DPPH و نیتریک اکساید) بود (Ebrahimzadeh *et al.*, 2009). نتایج آنالیز ترکیبات تشکیل دهنده اسانس برگ‌ها و ساقه‌های زولنگ در دو مرحله رویشی و زایشی نشان داده است که نوع و میزان ترکیبات اسانس تابع تغییرات فصلی و جغرافیایی، فاز رویشی گیاه و بخش مورد استفاده گیاه است (Hashemabadi & Kaviani, 2010; Palá-Pául *et al.*, 2005). با توجه به اینکه مطالعات کمی در زمینه پتانسیل آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های مختلف گیاه زولنگ انجام شده است و نیز ناشناخته ماندن ترکیبات زیست فعال این گیاه بومی، لذا هدف از این پژوهش اندازه‌گیری فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های زولنگ و نیز شناسایی و اندازه‌گیری کمی اسیدهای فنولی این گیاه بومی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی نمونه گیاهی

این تحقیق در بهار و تابستان 1391 در آزمایشگاه تجزیه علوم و صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. گیاه زولنگ (قبل از مرحله گل دهی) از حواشی مناطق جنگلی شهرستان گرگان (جنگل محمدآبادکتول)، در اوایل فصل بهار جمع آوری شد. شناسایی گونه زولنگ مورد بررسی (*E.caucasicum*)، توسط مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان (بخش هرباریوم) انجام گردید. سبزی‌های زولنگ (بخش هوائی) بلافاصله پس از جمع‌آوری و جداسازی ناخالصی‌ها، در آون با دمای 40 درجه سانتی‌گراد خشک گردیدند و توسط آسیاب به ذرات بسیار ریز تبدیل و از الک با مش 40 گذرانده و تا زمان آزمایش در کیسه‌های محافظ به هوا و رطوبت (مقدار رطوبت نهایی 11/25 درصد) در فریزر با دمای 18- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جهت سنجش مقدار ترکیبات فنول و فلاونوئید کل از عصاره استخراجی از گیاه قبل از مرحله تغلیظ و خشک کردن و جهت ارزیابی فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی از پودر فریز درایر شده استفاده گردید (Arabshahi-Delouee & Urooj, 2007).

1- *Apiaceae*

تهیه عصاره و پودرفنولی

جهت تهیه عصاره، میزان 100 میلی‌لیتر از حلال‌های اتانول و متانول 80 درصد (حجمی: حجمی) با 10 گرم از پودر خشک گیاه مخلوط و در انکوباتور شیکردار (ساخت ایران، شرکت ژال تجهیز) با دمای 25 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بعد از طی مدت زمان 24 ساعت عصاره‌ها با کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف شدند. عصاره‌های متانولی و اتانولی توسط تبخیرکننده چرخشی تحت خلأ (ساخت آلمان، IKA, RV05 Basic) دردمای40 درجه سانتی‌گراد تغلیظ و سپس جهت حذف کامل حلال با خشک‌کن انجمادی (ساخت کره جنوبی، Operun, FDB550) خشک و به پودر تبدیل شدند. با محاسبه وزن اولیه بالن و وزن نهایی آن که حاوی ماده خشک بر جای مانده است، مقدار کل ماده خشک استخراج شده (بازده استخراج) در مرحله استخراج محاسبه شد و به صورت درصد (گرم به صد گرم نمونه خشک) بیان گردید. پودرهای حاصل جهت انجام آزمایشات بعدی در فریزر 18- درجه سانتی‌گراد (ساخت آمریکا، Whirlpool WVG301) نگهداری شدند (Arabshahi-Delouee & Urooj, 2007).

اندازه‌گیری مقدار ترکیبات فنولی کل

میزان کل ترکیبات فنولی با روش فولین-سیوکالتو[1] اندازه‌گیری شد (Slinkard & Singleton, 1977). در این روش میزان 20 میکرولیتر از محلول عصاره (قبل از مرحله تغلیظ و خشک نمودن با فریز درایر) با 1/160 میلی‌لیترآب مقطر و 100میکرولیتر معرف فولین سیوکالتو مخلوط شد. بعد از گذشت 1 تا 8 دقیقه، 300 میکرولیتر محلول کربنات سدیم (20درصد) به آن‌ها افزوده شد. لوله‌های آزمایش بعد از تکان دادن درون حمام آب با دمای 40 درجه سانتی‌گراد قرارگرفته و پس از گذشت 30 دقیقه جذب آن‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر (ساخت انگلستان، PG instrument) در طول موج 760 نانومتر خوانده شد. جهت رسم منحنی استاندارد از اسید گالیک استفاده شد. میزان کل ترکیبات فنلی موجود در عصاره با استفاده از معادله بدست آمده از منحنی استاندارد محاسبه و نتایج بر حسب میلی‌گرم اسید گالیک در هرگرم عصاره بیان شد. آزمایش‌ها در سه تکرار انجام و میانگین آن‌ها گزارش شد.

اندازه‌گیری مقدار ترکیبات فلاونوئیدی کل

سنجش میزان فلاونوئید کل به روش رنگ سنجی آلومینیوم کلرید با روش Chang و همکاران (2002) اندازه‌گیری شد. در این روش میزان 0/5 میلی‌لیتر از محلول عصاره (قبل از مرحله تغلیظ و خشک نمودن با فریز درایر) با 1/5 میلی‌لیتر اتانول 95درصد، 0/1 میلی‌لیتر آلومینیوم کلرید 10درصد، 0/1 میلی‌لیتر استات پتاسیم یک مولار و 2/8 میلی‌لیتر آب‌مقطر مخلوط گردید. بعد از نگهداری نمونه‌ها در دمای اتاق به مدت 30 دقیقه، جذب مخلوط در 415 نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. از کوئرستین به منظور رسم منحنی استاندارد استفاده شد. میزان کل ترکیبات فلاونوئیدی موجود در عصاره با استفاده از معادله بدست آمده از منحنی استاندارد محاسبه و نتایج بر حسب میلی‌گرم کوئرستین در هر گرم عصاره بیان شد. آزمایش‌ها در سه تکرار انجام و میانگین آن‌ها گزارش گردید.

قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH

توانایی مهار رادیکال آزاد به روش Shimada و همکاران (1992)، انجام شد. برای این منظور، محلول‌هایی با غلظت‌های مختلف (300-50 میکروگرم در میلی‌لیتر) از عصاره‌های پودر شده و نیز آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT در حلال متانول آماده شدند. یک میلی‌لیتر از محلول متانولی DPPH[2] (با غلظت یک میلی‌مولار) به 3 میلی‌لیتر از عصاره افزوده و مخلوط حاصله به شدت هم‌زده شد. لوله‌های آزمایش به مدت 30 دقیقه در محل تاریک قرارگرفتند. بعد از این مدت میزان جذب در طول موج 517 نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. لازم به‌ذکر است که در نمونه شاهد، عصاره با 3 میلی‌لیتر متانول جایگزین شد. در نهایت درصد مهار

1- Folin-Ciocalteu

2 -2,2-diphenyl-1- picryl hydrazyl

رادیکال‌های DPPH توسط عصاره با فرمول زیر محاسبه گردید.

رابطه (1)

$(Ac-As)/Ac\times100$ =درصد مهار رادیکال آزاد

که در این رابطه A_c و A_s به ترتیب جذب کنترل و جذب نمونه می‌باشند.

معمولاً برای مقایسه فعالیت ضدرادیکالی عصاره‌های مختلف از فاکتوری تحت عنوان EC_{50} استفاده می‌شود. طبق تعریف EC_{50} به غلظتی از عصاره اطلاق می‌گردد که در آن 50 درصد از رادیکال‌های آزاد DPPH موجود در محیط واکنش مهار شوند. بنابراین هر چه این غلظت کمتر باشد، نشان‌دهنده این است که عصاره مورد نظر فعالیت ضدرادیکالی بیشتری دارد.

قدرت احیاءکنندگی آهن

توانایی عصاره‌ها برای احیاء آهن سه ظرفیتی توسط روش Yildirim و همکاران (2001)، تعیین شد. در این روش، محلول‌هایی با غلظت‌های مختلف (800- 200 میکروگرم در میلی‌لیتر) از عصاره‌های پودر شده و نیز آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT به ترتیب در حلال‌های استخراجی و متانول تهیه گردیدند. یک میلی‌لیتر از محلول عصاره یا آنتی‌اکسیدان‌سنتزی با 2/5 میلی‌لیتر بافر فسفات (pH= 6/6 و2/ 0=M) و 2/5 میلی‌لیتر پتاسیم فری‌سیانید (10 گرم در لیتر) مخلوط شد و به مدت نیم ساعت در حمام آب با دمای 50 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس 2/5 میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید10 درصد (وزنی:حجمی) به نمونه‌ها اضافه شد و به مدت 10 دقیقه با سرعت g 1650 سانتریفوژ (ساخت کانادا، CenturionK2042) شدند. از محلول روئی پس از سانتریفوژ 2/5 میلی‌لیتر به دقت برداشته و پس از افزودن 2/5 میلی‌لیتر آب مقطر و 0/5 میلی‌لیتر کلرید آهن (III) (1 گرم در لیتر)، جذب نمونه‌ها در طول موج 700 نانومتر خوانده شد. میزان جذب بالا نشان دهنده قدرت احیاءکنندگی بالای عصاره‌ها می‌باشد.

شناسایی و اندازه‌گیری کمی اسیدهای فنولی

آماده سازی عصاره گیاهی جهت تعیین نوع و میزان اسیدهای فنولی موجود در عصاره زولنگ به روش Kwok و همکاران (2010) با کمی تغییرات انجام شد. شناسایی و اندازه‌گیری ترکیبات فنولی توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارائی بالا (KNAUER smart line 1000، ستون $RP-C_{18}$ با ابعاد 4/6 × 250 میلی‌متر و اندازه ذرات 5 میکرومتر) انجام شد. مقدار 1 گرم از پودر خشک گیاه در 30 میلی‌لیتر حلال (متانول 80 درصد) به مدت 12 ساعت در دمای محیط با انکوباتور شیکردار (200 دور در دقیقه) همزده شد. پس از این مرحله، بخش جامد به وسیله کاغذ صافی واتمن شماره یک جدا گردید و عمل استخراج مجدد با حلال تازه به مدت 30 دقیقه توسط حمام فراصوت در دمای محیط (ساخت ایتالیا، Euronda 4D) انجام شد. عصاره‌های حاصل از دو مرحله با هم ادغام شدند و بخشی از حلال در دمای 40 درجه سانتی‌گراد توسط دستگاه تبخیرکننده چرخشی تغلیظ گردید. سپس میزان 20 میکرولیتر از عصاره بعد از عبور از فیلتر سرنگی 0/2 میکرون به ستون HPLC تزریق گردید. سیستم مورد استفاده در این بررسی گرادیان و فاز متحرک شامل آب با 2 درصد اسید استیک (حلال1) و متانول (حلال2)، سرعت جریان فاز متحرک در ستون 1 میلی‌لیتر در هر دقیقه، دمای ستون 28 درجه سانتی‌گراد طول موج 280 و 330 نانومتر بود. جهت شناسایی نوع اسیدهای فنولی از استانداردهای گالیک اسید، کلروژنیک اسید، کافئیک اسید، پارا کوماریک اسید و فرولیک اسید (شرکت سیگما) استفاده شد. با مقایسه زمان تاخیر و سطح زیر منحنی نمونه با نمونه‌های استاندارد، میزان اسیدهای فنولی شناسایی و میزان این ترکیبات با رسم منحنی های استاندارد تعیین گردید.

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل نتایج به دست آمده مربوط به اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و نیز ارزیابی فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد و قدرت احیاءکنندگی در قالب فاکتوریل به صورت طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار صورت پذیرفت. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SAS نسخه 9/1 و

مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح اطمینان 5 درصد انجام شد و نمودارها با نرم افزار Excel رسم گردیدند.

نتایج و بحث

مقدار ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی کل

مقایسه میانگین میزان کل ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی استخراج شده توسط حلال‌های متانول و اتانول 80 درصد در جدول 1 آورده شده است. مقدار کل ترکیبات فنولی به روش فولین سیوکالتو و بر مبنای منحنی استاندارد اسید گالیک (r^2=0/9987 ، Y=0/0669x + 0/0116) و مقدار کل ترکیبات فلاونوئیدی به روش رنگ سنجی آلومینیوم کلرید و بر مبنای منحنی استاندارد کوئرستین (r^2=0/9991 ، Y= 14/564x - 0/0007) محاسبه گردید. نتایج آنالیز واریانس نشان داد، نوع حلال مورد استفاده جهت استخراج تأثیر معنی‌داری (p <0/05) بر مقدار ترکیبات فلاونوئیدی عصاره‌ها دارد، اما تفاوت معنی‌داری در میزان فنول کل عصاره‌ها مشاهده نشد.

جدول 1- مقایسه میانگین مقدار کل ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و بازده استخراج عصاره های زولنگ

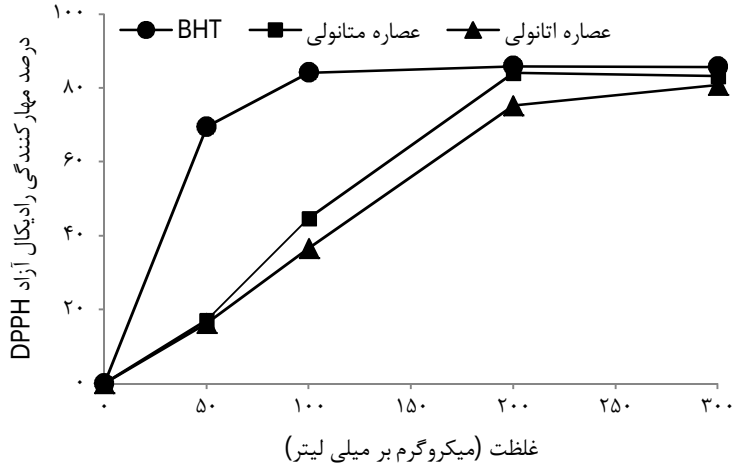
نمونه	فنول کل (میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره)	فلاونوئید کل (میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره)	بازده استخراج (درصد)
عصاره اتانولی	25/85±2/74[a]	13/17±0/13[a]	27/44±1/7[a]
عصاره متانولی	26/36±2/35[a]	17/73±0/1[b]	27/13±1/5[a]

حروف غیرمشابه در هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان 5درصد است.

Jung و همکاران (2006) نیز اختلاف معنی‌داری در میزان ترکیبات فنولی کل عصاره‌های اتانولی، متانولی (به ترتیب 23/33، 22/86 میلی‌گرم در گرم عصاره) برگ جینسنگ مشاهده نکردند. محتوای ترکیبات فنول و فلاونوئید کل عصاره متانولی برگ‌های زولنگ (*E.caucasicum*) در مرحله گل‌دهی به ترتیب 37/6 میلی‌گرم گالیک اسید در گرم پودر عصاره و 60 میلی‌گرم کوئرستین در گرم پودر عصاره گزارش شده است (Ebrahimzadeh *et al.*, 2009). جمشیدی و همکاران (1389) میزان فنول و فلاونوئید عصاره متانولی *E.campestre* L. را به ترتیب 53/7 میلی‌گرم گالیک اسید در گرم پودر خشک و 43/78 میلی‌گرم کوئرستین در گرم پودر خشک اندازه‌گیری نمودند. محتوای فنول عصاره متانولی *E. maritimum* به ترتیب 16/44 (میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک) گزارش شده است (Meot-Duros *et al.*, 2008). بر مبنای تحقیقات انجام شده، محتوای ترکیبات فنول و فلاونوئید گونه‌های مختلف جنس ارنجیوم تابع نوع و میزان ترکیبات پلی‌فنولی، تغییرات فصلی، مکان جغرافیایی، فاز رویشی گیاه و بخش مورد استفاده گیاه می باشد (Wang, *et al.*, 2012). بازده استخراج عصاره اتانولی سبزی زولنگ مورد بررسی در مقایسه با بازده عصاره اتانولی چندین گونه رشد یافته در ترکیه بالاتر بود (Küpeli *et al.*, 2006). از آنجائیکه هیچ یک از روش‌های رنگ سنجی نمی‌تواند همه انواع فلاونوئیدها را شناسایی کند و در روش رنگ سنجی آلومینیوم کلرید تنها فلاون‌ها و فلاونول‌ها قادرند کمپلکس پایداری با آلومینیوم کلرید را تشکیل دهند و از نظر کمی اندازه‌گیری شوند (*Chang* et al., 2002)، لذا می‌توان نتیجه گرفت میزان این گروه از فلاونوئیدها در عصاره متانولی زولنگ بالاتر از سایر فلاونوئیدها است. میزان کل ترکیبات فنولی به تنهایی معیار دقیق و ثابتی جهت اثبات قدرت آنتی‌اکسیدانی بالای یک نمونه نیست، بلکه ماهیت، نوع و میزان ترکیبات منفرد فنول و فلاونوئید یک ماده گیاهی شاخص قدرت آنتی‌اکسیدانی بالای آن است. از سوی دیگر تعیین مقدار ترکیبات فنولی توسط روش فولین سیوکالتو یک سنجش قطعی از مقدار فنول کل نیست. انواع مختلفی از ترکیبات فنولی وجود دارند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها بستگی به ساختار آن‌ها دارد. معرف فولین سیوکالتو به صورت غیر اختصاصی با ترکیبات فنولی واکنش می‌دهد. علاه بر این به جز ترکیبات فنولی، سایر ترکیبات موجود در عصاره نظیر قندها، آمینواسیدها، اسیدهای آلی، آمین‌های آروماتیک و ویتامین‌ها نیز قادر به احیاء این معرف می‌باشند (Mohsen & Ammar, 2009).

فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH

مهار رادیکال‌های آزاد یکی از شناخته شده‌ترین مکانیسم‌هائی است که به واسطه آن ترکیبات آنتی‌اکسیدانی می‌توانند اکسیداسیون چربی‌ها را مهار نمایند. در این روش نتایج بر حسب درصد کاهش در میزان جذب محلول‌های DPPH در حضور عصاره نسبت به محلول DPPH فاقد عصاره بیان می‌گردد (Ferreres *et al.*, 2007). نتایج آنالیز واریانس نشان داد، نوع و غلظت عصاره‌ها و آنتی آکسیدان سنتزی تاثیر معنی‌داری بر میزان مهار رادیکال‌های آزاد داشتند (P <0/05). هم‌چنین نتایج حاکی از آن بود که توانایی عصاره‌ها در مهار رادیکال‌های آزاد وابسته به غلظت بوده و با افزایش غلظت فعالیت ضد رادیکالی آن‌ها افزایش می‌یابد. شکل 1 میزان مهار رادیکال‌های آزاد توسط غلظت‌های مختلف عصاره‌های الکلی زولنگ و آنتی اکسیدان سنتزی BHT را نشان می‌دهد. در محدوده غلظت 300- 50 میکروگرم در میلی‌لیتر، درصد فعالیت مهارکنندگی آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT، 85/77- 69/60 درصد؛ عصاره اتانولی 80 درصد، 80/82- 16/30 درصد و عصاره متانولی 80درصد، 83/29- 17/17 درصد اندازه‌گیری شد. در تمامی غلظت‌های مورد بررسی فعالیت مهارکنندگی عصاره متانولی بالاتر از عصاره اتانولی زولنگ بود. فعالیت ضدرادیکالی عصاره‌های زولنگ در غلظت‌های بالا قابل رقابت با آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT بود. نتایج تحقیق حاضر با نتایج Sun و همکاران (2011) و Mok و همکاران (2012) همخوانی داشت. این محققین گزارش نمودند که فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH عصاره‌های گیاهی وابسته به غلظت است و با افزایش غلظت اثر مهارکنندگی شدت یافت.



شکل 1- مقایسه میانگین درصد مهار رادیکال‌های DPPH در غلظت‌های مختلف عصاره‌های زولنگ و آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT

در این بررسی مقادیر EC_{50} برای عصاره‌های زولنگ تعیین و با آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT مقایسه گردید (جدول 2). همانطور که در جدول دیده می‌شود، بین عصاره‌های فنولی مختلف سبزی زولنگ اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. در بین عصاره‌های زولنگ، کمترین میزان EC_{50} متعلق به عصاره متانولی بود. بیشترین میزان EC_{50} و در نتیجه کمترین توانایی در مهار رادیکال‌های آزاد به عصاره اتانولی تعلق داشت. کمترین میزان EC_{50} مشاهده شده در جدول به آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT تعلق داشت.

جدول 2- مقایسه میانگین EC_{50} برای عصاره های مختلف زولنگ و BHT در روش مهار رادیکال های آزاد DPPH

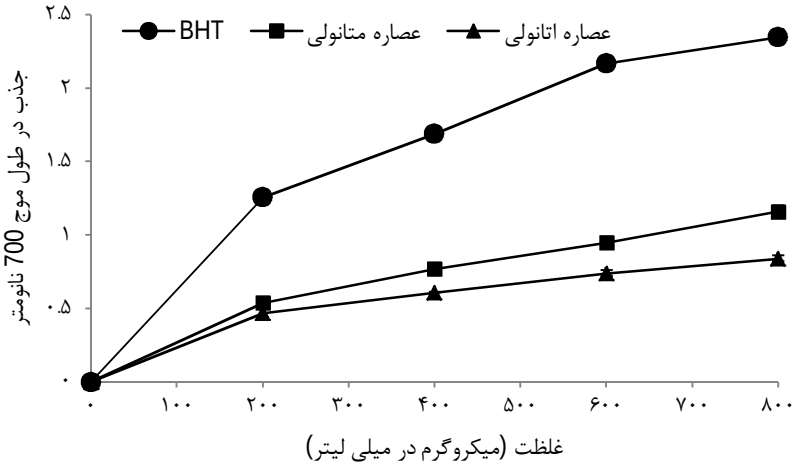
نمونه	EC_{50}(میکروگرم در میلی لیتر)
BHTآنتی‌اکسیدان سنتزی	42/13[a]
عصاره متانولی	119/66[b]
عصاره اتانولی	135/22[c]

حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال 5 درصد است.

تفاوت‌های مشاهده شده بین EC_{50} عصاره‌های مختلف در این تحقیق را می‌توان به تفاوت در نوع ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی آن‌ها نسبت داد. محققان، فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی عصاره‌های گیاهی را با میزان بالای فنول‌ها و فلاونوئیدهای موجود در عصاره‌ها مرتبط می‌دانند. میزان EC_{50} عصاره متانولی *E.campestre* L.، 249/73 میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش شده است که در مقایسه با گونه مورد بررسی در این مطالعه (119/66 میکروگرم در میلی لیتر) بالاتر است (جمشیدی و همکاران، 1389).

قدرت احیاءکنندگی آهن

در این روش احیا آهن III به عنوان معیاری برای قابلیت الکترون‌دهی ترکیبات فنولی به‌کار می‌رود. این مسئله، مکانیسم مهمی را در فرایند اکسیداسیون ترکیب های فنولی تشکیل می‌دهد. ظرفیت دهندگی الکترون (نیروی احیاءکنندگی) مرتبط با فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات زیستی می‌باشد (Arabshahi-Delouee & Urooj, 2007). نتایج آنالیز واریانس حاکی از آن بود که عصاره‌ها از نظر قدرت احیاءکنندگی اختلاف معنی‌داری ($P<0/05$) با یکدیگر و با آنتی‌اکسیدان سنتزی دارند. هم‌چنین با افزایش غلظت، میزان جذب محلول‌های حاوی عصاره به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت. شکل 2 مقایسه میانگین میزان جذب غلظت‌های مختلف عصاره‌های اتانولی و متانولی سبزی زولنگ و آنتی اکسیدان BHT را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد در تمامی غلظت‌های مورد بررسی آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT دارای بیشترین قدرت احیاءکنندگی است. در محدوده غلظت 800-200 میکروگرم در میلی‌لیتر میزان فعالیت احیاءکنندگی آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT، عصاره متانولی و عصاره اتانولی به ترتیب در محدوده 2/45- 1/26، 1/40- 0/54 و 0/93- 0/47 میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره تعیین گردید. با افزایش غلظت میزان فعالیت احیاءکنندگی عصاره متانولی نسبت به عصاره اتانولی زولنگ بیشتر بود.



شکل 2- مقایسه میانگین قدرت احیاءکنندگی غلظت‌های مختلف عصاره‌های زولنگ و آنتی اکسیدان سنتزی BHT

اختلاف مشاهده شده بین عصاره‌ها از نظر قدرت احیاءکنندگی را می‌توان به تفاوت در نوع ترکیبات فنولی استخراج شده توسط هر یک از این حلال‌ها نسبت داد. میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولی مختلف با توجه به ساختار شیمیائی آنها متفاوت است. علاوه بر این در طی فرآیند استخراج ترکیبات دیگری که حلالیت بالائی در آب و محلول‌های الکلی دارند، همراه با ترکیبات فنولی وارد عصاره می‌شوند. از آنجائی‌که برخی از این ترکیبات نظیر اسید اسکوربیک، اسیدهای آمینه، پروتئین‌ها و قندها خود اهداء کننده‌ی الکترون می‌باشند بنابراین در صد بیشتری از یون‌های آهن سه ظرفیتی با جذب الکترون احیا شده و بنابراین شدت جذب محلول افزایش می‌یابد (Rumbaoa *et al.*, 2009). محققان گزارش نموده‌اند که عصاره‌های گیاهی حاوی مقادیر بالایی از ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی از فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی‌تری نیز برخوردار بودند. در نتیجه، ظرفیت دهندگی الکترون (نیروی احیاءکنندگی)

مرتبط با فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات زیست فعال است (Sun *et al.*, 2007; Sahreen *et al.*, 2010). در بررسی قدرت احیاءکنندگی عصاره متانولی *E.caucasicum* در مرحله گل دهی، Ebrahimzadeh و همکاران (2009)، گزارش نمودند که با افزایش غلظت میزان فعالیت احیاءکنندگی عصاره نیز افزایش یافت. نتایج حاصل از این تحقیقات با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد.

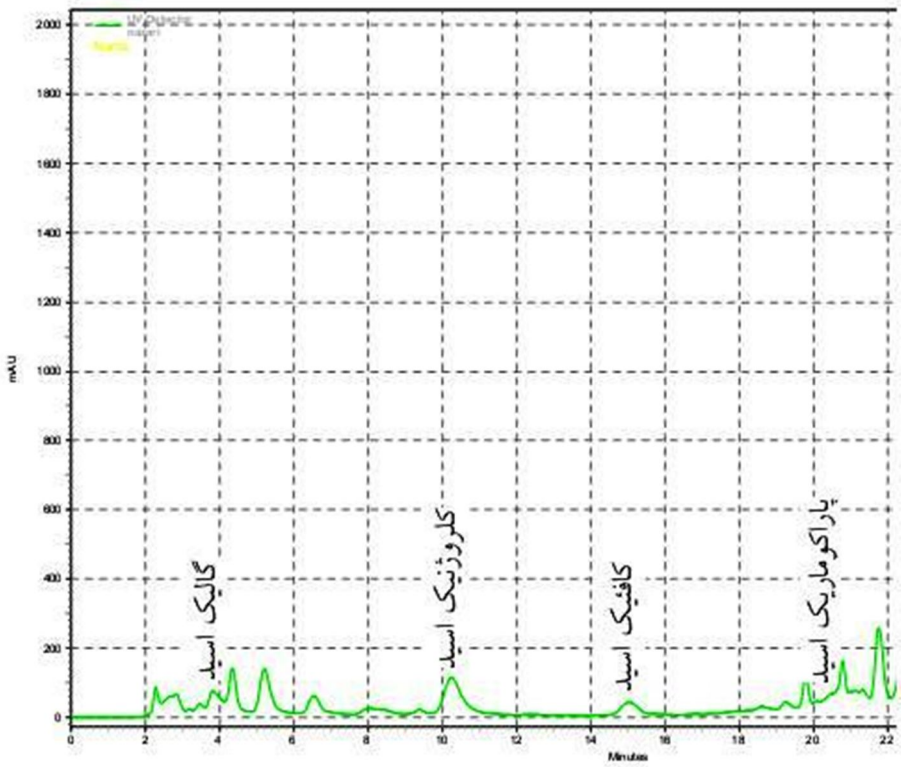
تعیین اسیدهای فنولی

به منظور شناسایی اسیدهای فنولی موجود در سبزی زولنگ از کروماتوگرافی مایع با کارائی بالا استفاده شد. به دلیل دارا بودن بالاترین محتوای فلاونوئید کل و بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی در عصاره متانولی زولنگ، نوع و میزان اسیدهای فنولی این عصاره شناسایی و مقادیر آن در جدول 3 گزارش شده است.

جدول 3- اسیدهای فنولی موجود در عصاره متانولی سبزی زولنگ

اسید فنولی	زمان بازداری (دقیقه)	مقدار (میلی‌گرم در 100 گرم بافت خشک گیاه)
گالیک اسید	3/81	7/39
کلروژنیک اسید	10/25	63/07
کافئیک اسید	15/01	6/89
پارا کوماریک اسید	20/48	0/16
فرولیک اسید	21/13	-

میزان گالیک اسید، کلروژنیک اسید، کافئیک اسید، پاراکوماریک اسید و فرولیک اسید برای اولین بار در سبزی زولنگ اندازه‌گیری شد. اسید فنولی غالب در عصاره سبزی زولنگ کلروژنیک اسید (63/07 میلی‌گرم در 100 گرم بافت خشک) شناسایی شد. از بین اسیدهای فنولی مورد بررسی، فرولیک اسید در عصاره متانولی سبزی زولنگ شناسایی نشد و کمترین اسید فنولی مورد بررسی در عصاره، پاراکوماریک اسید (0/16 میلی‌گرم در 100 گرم بافت خشک) بود.



شکل 3- کروماتوگرام اسیدهای فنولی موجود در عصاره متانولی سبزی زولنگ

اسیدهای فنولی، مشتقات هیدروکسیل شده بنزوئیک اسید و سینامیک اسید می‌باشند. هیدروکسی سینامیک اسیدها به فراوانی در اغلب گیاهان یافت می‌شوند که متداول‌ترین این ترکیبات کلروژنیک اسید، کافئیک اسید، پارا کوماریک اسید و فرولیک اسید می‌باشند، اما میزان هیدروکسی بنزوئیک اسید گیاهان خوراکی به طور کلی بسیار پایین است. اختلاف این دو گروه از مشتقات در الگوهای هیدروکسیلاسیون و متوکسیلاسیون حلقه آروماتیک آن‌ها است. اکثر مطالعات مزیت‌های سلامتی‌بخش اسیدهای فنولی را با فعالیت آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات مرتبط دانسته‌اند (Mattila & Hellström, 2007; Bondia-Pons *et al.*, 2009). هیدروکسی سینامیک اسیدها، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت به هیدروکسی بنزوئیک اسیدها دارند که این فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا در مشتقات هیدروکسی سینامیک اسیدها ناشی از حضور یک زنجیره جانبی پروپنوئیک به جای یک گروه کربوکسیل است (Natella *et al.*, 1999). محققان بیان نموده‌اند که مشتقات هیدروکسی سینامیک اسیدها مانند کافئیک اسید و فرولیک اسید، فعالیت مهارکنندگی رادیکال موثری را دارا می‌باشند (Andreasen *et al.*, 2001; Vuorela *et al.*, 2004). کافئیک اسید در ساختار خود دارای 2 گروه هیدروکسیل است و از استری شدن آن با اسید کوئینیک، کلروژنیک اسید حاصل می‌گردد. محققان زیادی با مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی کافئیک اسید و کلروژنیک اسید گزارش کردند، استری شدن کافئیک اسید با اسیدکوئینیک از قدرت آنتی‌اکسیدانی و توانایی مهار رادیکال‌های آزاد آن می‌کاهد. پاراکوماریک اسید نیز با داشتن یک گروه هیدروکسیل می‌تواند نقش به سزائی در مهار رادیکال‌های آزاد داشته باشد، اما قدرت آنتی‌اکسیدانی آن کمتر از فرولیک اسید و کافئیک اسید است. گالیک اسید از مشتقات هیدروکسی بنزوئیک اسیدها بوده و در ساختار خود دارای 3 گروه هیدروکسیل می‌باشد و به دلیل قطبیت بالا زودتر از سایر ترکیبات از ستون خارج می‌شود (Andreasen *et al.*, 2001; قادری قهفرخی و همکاران، 1390). نتایج به دست آمده در آنالیز ترکیبات فنولی عصاره زولنگ، نتایج حاصل از آزمون‌های ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی را تائید می‌نماید. حضور اسیدهای فنولی نظیر گالیک اسید، کلروژنیک اسید، کافئیک اسید و پارا کوماریک اسید قدرت آنتی‌اکسیدانی بالای عصاره متانولی زولنگ را تائید می‌نماید.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان دادند که عصاره متانولی سبزی زولنگ با بیشترین مقدار ترکیبات فلاونوئیدی از فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH و قدرت احیاءکنندگی آهن بالاتری نیز برخوردار بود. حضور اسیدهای فنولی بویژه گالیک اسید، کلروژنیک اسید و کافئیک اسید در عصاره سبزی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجه این عصاره همراه است. با توجه به عدم پذیرش افزودنی‌های شیمیایی و آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی از سوی مصرف کنندگان به دلیل اثرات نامطلوب این ترکیبات بر سلامت انسان، مطالعات بیشتر در زمینه کاربرد عصاره زولنگ در فرمولاسیون مواد غذایی به عنوان یک منبع جدید و بالقوه از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی پیشنهاد می‌گردد.

منابع

1- جمشیدی، م.، احمدی آشتیانی، ح.ر.، رضازاده، ش.، فتحی آزاد، ف.، مازندرانی، م. و خاکی، آ. 1389. بررسی و مقایسه ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی چند گونه گیاهی بومی مازندارن. فصلنامه گیاهان دارویی، 34: 177- 183.

2- قهرمان، ا. 1372. کورموفیت‌های ایران (سیستماتیک گیاهی). چاپ اول مرکز نشر دانشگاهی تهران.

3- قادری قهفرخی، م.، صادقی ماهونک، ع.ر.، اعلمی، م.، خمیری، م. و رضائی، ر. 1390. ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی و ضدرادیکالی عصاره متانولی دو واریته بلوط و تعیین نوع ترکیبات فنولی با کروماتوگرافی مایع با کارائی بالا. نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران، 7: 180- 190.

4- مظفریان، و. 1382. فرهنگ نامهای گیاهان ایران. چاپ سوم انتشارات فرهنگ معاصر.

5- Andreasen, M.F., Landbo, A.K., Christensen, L.P., Hansen, A. & Meyer, A.S. 2001. Antioxidant effects of phenolic rye (*Secale cereale* L.) extracts, monomeric hydroxycinnamates, and ferulic acid dehydrodimers on human low-density lipoproteins. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49: 4090–4096.

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

7- Bondia-Pons, I., Aura, A.M., Vuorela, S., Kolehmainen, M., Mykkänen, H. & Poutanen, K. 2009. Review rye phenolics in nutrition and health. Journal of Cereal Science, 49: 323–336.

8- Chang, C., Yang, M., Wen, H. & Chern, J. 2002. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. Food and Drug Analysis, 10; 178-182.

9- Choe, E. & Min, B.D. 2009. Mechanisms of antioxidants in the oxidation of food. Comprehensive Review in Food Science and Food Safety, 8: 345-358.

10- Ebrahimzadeh, M.A., Nabavi, S.F., & Nabavi, S.M. 2009. Antioxidant activity of leaves and inflorescence of *Eryngium Caucasicum* Trautv at flowering stage. Pharmacognocy Research, 1(6): 435-439.

11- Ferreres, F., Sousa, C., Valento, P., Seabra, R.M., Pereira, J.A. & Andrade, P.B. 2007. Tronchuda cabbage (*Brassica oleracea* L. var. costata DC) seeds: phytochemical characterization and antioxidant potential. Food Chemistry, 101: 549-558.

12- Fraga, G.C., Galleano, M., Verstraeten, V.S. & Oteiza, I.P. 2010. Review basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. Molecular Aspects of Medicine, 31: 435–445.

13- Hashemabadi, D. & Kaviani, B. 2010. Seasonal and geographical variations in the essential oils of *Eryngium caucasicum* Trautv growing in Iran. American-Eurasian Journal Agricaltural & Environmental Science, 8(2): 212-215.

14- Jung, C. H., Seog, H. M., Choi, I. W., Park, M. W. & Cho, H. Y. 2006. Antioxidant properties of various solvent extracts from wild ginseng leaves. Learning With Technologies, 39: 266-274.

15- Kamkar, A., Jebelli Javan, A., Asadi, F. & Kamalinejad, M. 2010. The antioxidative effect of Iranian *Mentha pulegium* extracts and essential oil in sunflower oil. Food and Chemical Toxicology, 48: 1796–1800.

16- Khoshbakht, K., Hammer, K. & Pistrick, K. 2007. *Eryngium caucasicum* Trautv cultivated as a vegetable in the Elburz Mountains (Northern Iran). Genetic Resources and Crop Evolution, 54(2): 445-8.

17- Küpeli, E., Kartal, M., Aslan, S. & Yesilada, E. 2006. Comparative evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive activity of Turkish *Eryngium* species. Journal of Ethnopharmacology, 107: 32–37.

18- Kwok, C.Y., Wong, C.N.Y., Mabel, Y.C.Y., Yu, P.H.F., Au, A.L.S., Poon, C.C.W., Seto, S.W., Lam, T.Y., Kwan, Y.W. & Chan, S.W. 2010. Consumption of dried fruit of *Crataegus pinnatifida* (hawthorn) suppresses high-cholesterol diet-induced hypercholesterolemia in rats. Journal of Functional Foods, 2: 179-186.

19- Mattila, P. & Hellström, J. 2007. Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products. Journal of Food Composition and Analysis, 20: 152 – 160.

20- Meot-Duros, L., Le Floch, G. & Magné, C. 2008. Radical scavenging, antioxidant and antimicrobial activities of halophytic species. Journal of Ethnopharmacology, 116: 258–262.

21- Mohsen, S.M. & Ammar, A.S.M. 2009. Total phenolic contents and antioxidant activity of corn tassel extracts. Food Chemistry, 112: 595-598.

22- Mok, S.Y., Choi, M.J., Kim, J., Cho, E.J. & Lee, S. 2012. Antioxidant activity of the methanolic extract of the newly generated vegetable, baemuchae (xBrassicoraphanus). Food and Chemical Toxicology, 50: 848–853.

23- Natella, F., Nardini, M., Di Filici, M. & Scaccini, C. 1999. Benzoic acid and cinnamic acid derivatives as antioxidants, structure–activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47: 1453–1459.

24- Palá-Pául, J., Pérez-Alonso, M.J., Velasco-Negueruela, A., Varadé, J., Villa, A.M., Sanz, J. & Brophy, J. 2005. Analysis of the essential oil composition from the different parts of *Eryngium glaciale* Boiss from Spain. Journal of Chromatography A, 1094: 179–182.

25- Paul, J. H. A., Seaforth, C. E. & Tikasingh, T. 2011. *Eryngium foetidum* L.: a review. Fitoterapia, 82: 302–308.

26- Rumbaoa, R.G.O., Cornago, D.F. & Geronimo, I.M. 2009. Phenolic content and antioxidant capacity of Philippine potato (*Solanum tuberosum*) tubers. Food Composition and Analysis, 22 (6): 546- 550.

27- Sahreen, S., Rashid Khan, M. & Ali Khan, R. 2010. Evaluation of antioxidant activities of various solvent extracts of *Carissa opaca* fruits. Food Chemistry, 122: 1205-1211.

28- Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K. & Nakamura, T. 1992. Antioxidative properties of xanthin on auto oxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. Agricultural and Food Chemistry, 40: 945-948.

29- Slinkard, K. & Singleton, VL. 1977. Total phenol analysis; automation and comparison with manual methods. American Journal of Enology and Viticulture, 28: 49-55.

30- Sun, L., Zhang, J., Lu, X., Zhang, L. & Zhang, Y. 2011. Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves. Food and Chemical Toxicology, 49: 2689-2696.

31- Sun, T., Powers, J. R. & Tang, J. 2007. Evaluation of the antioxidant activity of asparagus, broccoli and their juices. Food Chemistry, 105: 101- 106.

32- Vuorela, S., Meyer, A.S. & Heinonen, M. 2004. Impact of isolation method on the antioxidant activity of rapeseed meal phenolics. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52: 8202–8207.

33- Wang, S., Melnyk, J.P., Tsao, R. & Marcone, M.F. 2011. Review how natural dietary antioxidants in fruits, vegetables and legumes promote vascular health. Food Research International, 44: 14–22.

34- Wang, P., Su, Z., Yuan, W., Deng, G. & Li, SH. 2012. Phytochemical constituents and pharmacological activities of *eryngium* L. (piaceae). Pharmaceutical Crops, 3: 99-120.

35- Yildirim, A., Mavi, A. & Kara, A. A. 2001. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. Agricultural and Food Chemistry, 49: 4083-4089.

Identification and quantification of phenolic acids, radical scavenging activity and ferric reducing power of *Eryngium caucasicum* Trautv. ethanolic and methanolic extracts

Shahla Salmanian[*1], Alireza Sadeghi Mahoonak[2], Masoume Jamson[3], Bita Tabatabaee Amid[4]

1- MSc. graduated student, Department of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Science & Natural Resources
* Corresponding author (shahla.salmanian@gmail.com)
2- Associate professor, Department of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Science & Natural Resources
3- MSc. graduated student, Department of Food Science & Technology, Islamic Azad University, Damghan Branch
4-Lecturer, Pyam Noor University, Aqala Branch, Golestan

Abstract

In this study, the total phenolic and flavonoid compounds, radical scavenging activity and reducing power of ethanolic and methanolic extracts of *Eryngium caucasicum*- Trautv.- (a native vegetable of Iran) were evaluated. Also, the phenolic acids of methanolic extract were determined by high performance liquid chromatography. Total flavonoid content and antioxidant activities of the methanolic extract were higher than those of the ethanolic extract ($p< 0.05$). EC_{50} for DPPH radical-scavenging activity was 119.66 for the methanolic extract and 42.13 µg/ml for synthetic antioxidant BHT. Ferric (III) reducing power of the extracts increased in a dose-dependent manner however BHT showed higher reducing power. Phenolic acids were identified by reversed-phase high performance liquid chromatography. Gallic acid, cholorogenic acid, caffeic acid and *p*-coumaric were found in the methanolic extract. Chlorogenic acid was the predominant phenolic acid in the extract (63.07 mg/100g DW). On the basis of the results, *Eryngium caucasicum*- Trautv.- could be used as a novel food additive which is rich in natural antioxidants for food industry.

Keywords: Antioxidant activity, *Eryngium caucasicum*, Phenolic acid, Reducing power