

بررسی میزان ترکیبات فنولی و توکوفرولی در تعدادی از روغنهای زیتون تجاری ایرانی با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا¹

مریم فهیم دانش^{1*}، مهرداد قوامی²، امیرهومن حمصی³، پرویز آبرومند³

1- دانش آموخته دکتری علوم و صنایع غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران و عضو هیات علمی دانشگاه آزاد

اسلامی واحد شهریار - شهرقدس

2- دانشیار دانشکده علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

3- استادیار دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

چکیده

روغن های زیتون بکر حاوی مقادیر زیادی ترکیبات فنولی و توکوفرولی می باشند که بر روی طعم و پایداری آن تاثیر بسزایی دارند و به همین دلیل در مقابل اکسیداسیون نسبت به روغن های تصفیه شده مقاوم تر هستند. همچنین توکوفرولها از ترکیبات مهم و حائز اهمیت روغن زیتون می باشند که خاصیت آنتی اکسیدانی و ویتامینی داشته که علاوه بر افزایش مقاومت و پایداری روغن دارای فوائد بیولوژیکی مانند کنترل رادیکالهای آزاد می باشند.

با توجه به اهمیت این دو ترکیب، در هفت نمونه روغن زیتون تجاری ایرانی بطور تصادفی از مراکز خرید جمع آوری شدند و مقدار و اجزاء ترکیبات فنولی و توکوفرولی با دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج بدست آمده نشان داد که میزان ترکیبات فنولی روغنهای زیتون ایرانی مورد آزمون بسیار ناچیز میباشد و در گروه روغنهای زیتون با میزان پلی فنل کم قرار می گیرند که با توجه به اینکه آزمونهای تایید خلوص نمونه ها انجام نشده است، می تواند ناشی از زمان و درجه حرارت بالای مرحله مالاکساز، نحوه استخراج و نوع وارسته زیتون باشد.

همچنین میزان ترکیبات توکوفرولی نیز کم بود که می تواند به علت اعمال فرایند تصفیه شدید در روغنهای زیتون ایرانی و عدم کاربرد بسته بندی مناسب در روغنهای زیتون ایرانی باشد.

کلید واژگان: روغن زیتون، توکوفرول، پلی فنل، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

1- مقدمه

در رژیم غذایی مدیترانه ای، روغن زیتون جایگاه ویژه ای را به خود اختصاص داده است. میزان مصرف سالانه روغن زیتون برای هر شخص در یونان 20 کیلوگرم، در ایتالیا 11/2 کیلوگرم و در اسپانیا 9/7 کیلوگرم برای هر نفر می باشد. مصرف سرانه روغن زیتون در ایران در

در چند سال گذشته، تحقیقات متعددی در مورد فوائد مصرف روغن زیتون و تاثیر آن در سلامتی صورت گرفته است. اطلاعات اخیر نشان داده است که ترکیبات موجود در روغن زیتون باعث کاهش بیماریهای قلبی عروقی و کاهش سرطان پروستات و روده بزرگ می شود.

1. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

* مسئول مکاتبات: fahimdanesh78@yahoo.com

ممتاز بیشتر از روغن زیتون تصفیه شده است [4]. میزان کل فنلها در روغن زیتون بین 800 - 100 mg/Kg متغیر است [5] که از این میان میزان هیدروکسی تیروزول در روغن زیتون حدود 0/25- 1/63 mg/Kg و 3/01- 14/42 mg/Kg در روغن زیتون بکر ممتاز و 0/84 - 1/74 در روغن زیتون تصفیه شده گزارش گردیده است [6].

مهمترین ترکیبات فنولی روغن زیتون در شکل 1 نشان داده شده است [1].

توکوفرونها نیز از مهمترین آنتی اکسیدانهای طبیعی موجود در روغن هستند که باعث افزایش مقاومت اکسیداتیو روغن زیتون بکر می شود فعالیت آنتی اکسیدانی این ترکیبات اساسا بستگی به غلظت و حضور ترکیبات سینرژستی دارد. [7, 8, 9] زیتون 100% خالص و بکر ممتاز درج شده است. مشخصات درج شده بر روی نمونه ها در جدول نشان داده شده است.

2-2 - مواد و استاندارد ها

استونیتریل، متانول، هگزان، ایزوپروانل فیلتر شده توسط کاغذ صافی 1/5 μm، اسید استیک و آب همگی مناسب برای آنالیز HPLC بوده و از کارخانه مرک خریداری شدند.

استاندارد توکوفرونها (مرک)

اسید کافئیک، تیروزول، اسید سینرژیک و اسید فرولیک (سیگما)

2-3 - مشخصات دستگاه HPLC برای

آنالیز پلی فنلها

استخراج ترکیبات فنولی از روغن زیتون بر اساس روش Cortesi در سال 2002 انجام شد [12].

10 گرم روغن را در 50 ml هگزان حل نموده و سپس محلول حاصله را با 20 ml محلول متانولی 60% شستشو داده شد. این کار 3 بار تکرار شد و سپس محلول متانولی را هر بار جدا کرده و جمع آوری شد. فاز متانولی را توسط دستگاه تبخیر کننده دوار خشک نموده و با افزودن 5 ml متانول آماده تزریق به دستگاه HPLC شد.

10 سال گذشته بیش از 3 برابر افزایش یافته است. میزان مصرف سرانه این محصول از 30 گرم در سال 72 به 10 گرم در پایان سال 83 رسیده است [1].

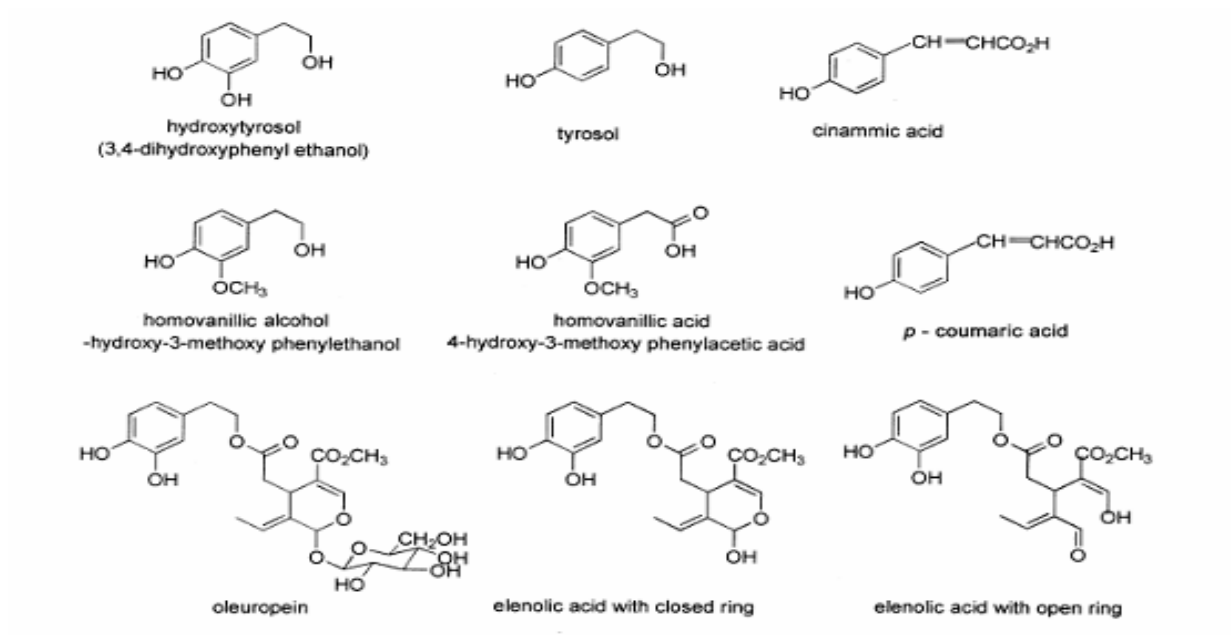
روغن زیتون حاوی بیش از 30 ترکیب فنولی متفاوت است که بسیاری از آنها در مقاومت روغن زیتون به فساد اکسیداتیو نقش موثری دارند. همچنین رابطه مستقیمی بین میزان ترکیبات فنولی و مقاومت روغن زیتون بکر وجود دارد. مهمترین ترکیبات فنولی روغن زیتون، اولئوروپین، هیدروکسی تیروزول و تیروزول می باشند که با افزایش درجه رسیدگی میوه زیتون، مقدار اولئوروپین کاهش می یابد [2]. میزان ترکیبات فنولی روغن زیتون بستگی به فاکتورهای متعددی دارد، اما مهمترین آنها نحوه استخراج روغن زیتون و شرایط نگهداری روغن زیتون است [3].

اما در کل میزان کل ترکیبات فنولی در روغن زیتون بکر حداکثر فعالیت آنها در روغن در غلظت 400-600 ppm گزارش گردیده است. میزان کل توکوفرونها در روغن زیتون بکر حدود 125-200 ppm گزارش گردیده است. که بیشترین میزان را ایزومر آلفا توکوفرول یا ویتامین E با 52-87% و مقدار 200 ppm-125 را در نقایسه با سایر ایزومرها به خود اختصاص داده است [10, 11]. پس از آن بتا توکوفرول 20 - 15% و گاما توکوفرول 23-7% می باشند. با توجه به اهمیت این ترکیبات و ارزش غذایی و نقش آنها در سلامتی، در این تحقیق میزان این ترکیبات در روغنهای زیتون مورد مصرف در ایران مورد بررسی قرار گرفت.

2 - مواد و روشها

2-1 - نمونه گیری

7 نمونه از روغن های زیتون تجاری ایرانی با مارکهای مختلف و 1 نمونه روغن زیتون بکر ممتاز ایتالیایی برای مقایسه ترکیبات فنولی به صورت کاملا تصادفی انتخاب شدند. بر روی برجسب همگی آنها به جز شماره 7 که " تصفیه شده و بی بو " ذکر شده بود، سایر نمونه ها روغن



شکل 1 مهمترین ترکیبات فنولی روغن زیتون

جدول 2 میزان پلی فنلهای مختلف در نمونه های روغن زیتون (ppm)

مقدار کل ppm	LIG-AG	OL-AG	LIG	LIG-DHDCM	OL-DHDCM	TY	OH-TY	نمونه
3/12	0	0	0/29	0/54	0	2/30	0	1
12/32	0	0	5/93	0/54	0	4/94	0	2
13/16	0/90	0/097	4/48	0/75	3/45	3/50	0	3
10/52	0	0	3/91	1/91	1/23	3/47	0	4
4/23	0	0	0	0	0	4/23	0	5
16/14	0	0	0	9/23	0/93	5/98	0	6
0/48	0	0	0	0	0	0/48	0	7
90/41	0/71	9/02	25/48	30/30	21/05	3/03	0/81	بکر

3- نتایج و بحث

3-1- توکوفرولها

در روغن زیتون میزان آلفا توکوفرول از سایر اجزاء توکوفرولی بیشتر است و در کلیه نمونه ها مقدار آلفا توکوفرول بیشترین مقدار توکوفرولی را دارا می باشد. میزان کل توکوفرولها در نمونه ها از 75 (نمونه 2) تا 164 mg/kg (نمونه 5) نشان داده شد.

میزان کل توکوفرولها نشان دهنده کیفیت روغن، شرایط استخراج و نحوه نگهداری روغن نیز می باشد. زیرا مقدار زیادی از توکوفرولها در طی فرایند تصفیه کردن از بین می روند معمولاً نمونه هایی که میزان کل توکوفرول آنها بین 100 تا 300 ppm باشد از نظر کیفیت روغنهای زیتون خوب و مناسبی می باشند. نمونه های 7، 2، نمونه هایی هستند که روش تولید و استخراج آنها چندان مناسب نبوده و باعث از دست دادن مقادیر زیادی از توکوفرولها شده است و یا اینکه نحوه بسته بندی و نگهداری آنها نامناسب بوده است.

3-2- پلی فنل ها

بر اساس تحقیقات متعدد، روغنهای زیتون بر اساس میزان پلی فنل به 3 دسته تقسیم می شوند [3]:

- روغنهایی با میزان پلی فنل زیاد، بیشتر از 300 mg/kg
- روغنهایی با میزان پلی فنل متوسط، بین 100-300 mg/kg
- روغنهایی با میزان پلی فنل کم، کمتر از 300 mg/kg

میزان کل فنلها در نمونه های مختلف در شکل 3 نشان داده شده است.

شکل 6 کروماتوگرام ترکیبات فنولی توسط HPLC نمونه های روغن زیتون ایرانی را نشان می دهد. همچنین ترکیبات فنولی یک نمونه روغن زیتون بکر ایتالیایی نیز جهت مقایسه مورد آزمایش قرار گرفت که در شکل 5 کروماتوگرام پلی فنولی روغن زیتون بکر ایتالیایی نشان داده شده است.

در جدول 2 میزان کل پلی فنلها و شاخص ترین پلی فنلها در نمونه های روغن زیتون نشان داده شده است.

مشخصات دستگاه HPLC بشرح ذیل می باشد:

Varian 9010(USA)

ستون (S2 ODS Spherisorb) با مشخصات 250 mm طول ستون، 4/6 mm قطر داخلی، 5 μm اندازه ذرات (waters)

فاز متحرک شامل:

حلال A (آب / اسید فسفریک، 99/5 : 0/5 حجمی / حجمی)

حلال B (متانول / استونیتریل، 50:50 حجمی / حجمی)

برنامه ریزی دستگاه برای استفاده از حلال بشرح زیر می باشد:

95% (B) / 5% (A) in 0 min
70% (B) / 30% (A) in 25 min
62% (B) / 38% (A) in 40 min
45% (B) / 45% (A) in 45 min
52.5% (B) / 47.5 % (A) in 5 min
100% (A) in 5 min.

برای آنالیز کمی کل پلی فنلها، از اسید سینرژیک در

280 نانومتر استفاده شده است.

4-2- دستگاه HPLC با شرایط زیر برای آنالیز

توکوفرولها مورد استفاده قرار گرفت:

- فاز متحرک شامل محلول 2 پروپانول / هگزان به نسبت (1 : 99) حجمی

- پمپ HPLC با فشار بالا Hnauer 64

- والو تزریق دستی لوپ 20 μL، Pheodyne 7/25

- دتکتور UV قابلیت تنظیم در طول موج 292 نانومتر

- ستون S5w (Waters ،Spherisorb HPLC USA)

مشخصات 25 cm طول، 4/6 mm و قطر ذرات

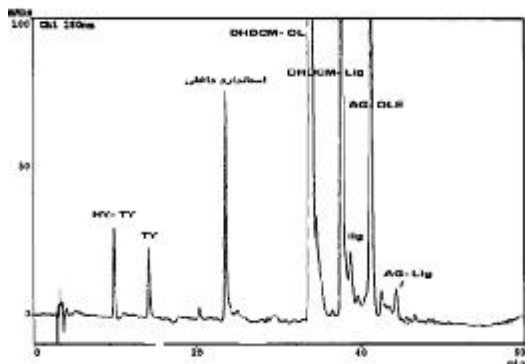
داخلی 5 mm جریان فاز متحرک 1 ml/min

اندازه گیری توکوفرولها و توکوتری انولها در چربیها و

روغنهای نباتی با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

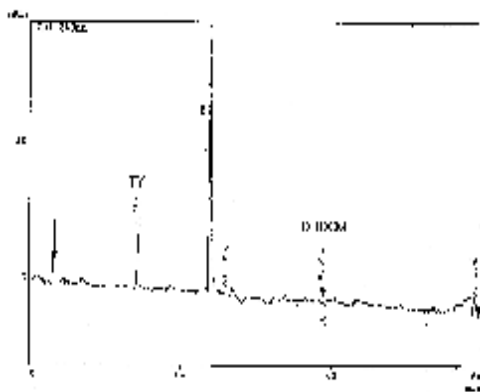
بر اساس استاندارد IUPAC به شماره 2-432/1 انجام

شد [13].



DHDCM = تیروزول
TY-HY = هیدروکسی تیروزول
OL = دی آلدئید دکربوکسی متیل اولئوروپین
AG-OLE = آگلیکون اولئوروپین
Lig = لیگنان
Lig_DHDCM = دی آلدئید دکربوکسی متیل لیگستروزید
AG-Lig = آگلیکون لیگنان

شکل 5 کروماتوگرام HPLC ترکیبات فنولی روغن زیتون بکر

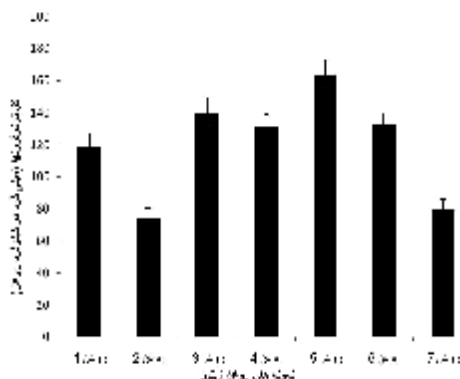


شکل 6 کروماتوگرام HPLC ترکیبات فنولی نمونه 1

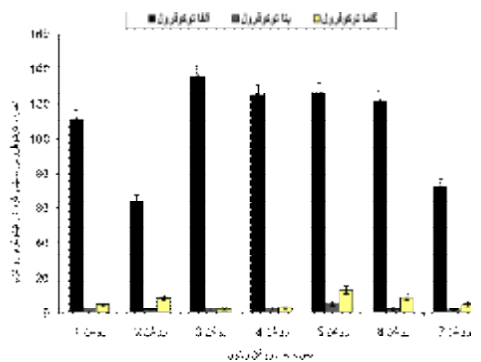
4- نتیجه گیری

همانطور که در جدول 2 نشان داده شده است میزان پلی فنل‌های موجود در روغن‌های زیتون ایرانی بسیار کم و ناچیز می باشد حتی در مورد نمونه 6 که روغن زیتون بکر ایرانی است مقدار کل پلی فنلها بسیار ناچیز می باشد. یکی از فاکتورهای بسیار مهم در میزان پلی فنلها نحوه استخراج روغن می باشد. معمولاً روشهای استخراج با پرس و یا دکانتور میزان پلی فنل بیشتری نسبت به روش استخراج با سانتیفوژ دارند زیرا در این روش مقدار

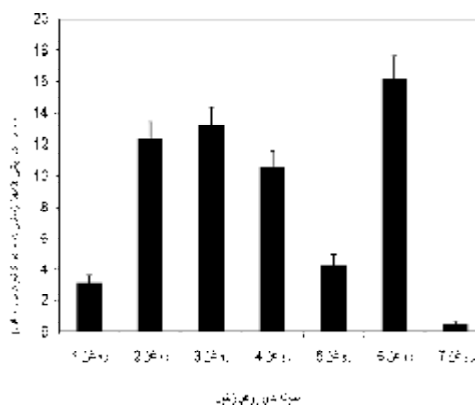
همچنین مقادیر پلی فنل‌های موجود در یک روغن زیتون بکر ایتالیایی نیز در جدول نشان داده شده است.



شکل 2 میزان کل توکوفرولها در نمونه های روغن زیتون



شکل 3 میزان آلفا، بتا و گاما توکوفرول در نمونه های روغن زیتون



شکل 4 میزان کل ترکیبات فنولی نمونه های روغن زیتون

- [6] Nergiz. C, and Unal.K. 1991. Effect of method of extraction on the total polyphenol, 1,2-Diphenol content, and stability of virgin olive oil. *J.Sci.Food Agric.* 56:79- 84
- [7] Montedoro. G. F, Servili.M, Baldioli.M, Selvaggi.R, Miniati.E. 1992 .Simple and hydrolysable phenolic compounds in olive oil. 2.Initial characterization of the hydrolysable fraction .*J.Agric.Food Chem.*, 40, 1577-1580.
- [8] Statue M. T, Huang.S.W.,Frankel.E.N. 1995. Effect of natural antioxidants in virgin olive oil on oxidative stability of refined , bleached and deodorized olive oil.*J.Am.Oil Chem.Soc.*, 72, 1131-1137.
- [9] Brenes M,Garcia.A,Garcia.P,Rios.J.J,Garrido.A. 1999. Phenolic compounds in Spanish olive oil.*J.Agric.Food Chem*, 47, 3535-3540.
- [10] Pirisi F.M. .Angioni A. Bandino G. Cabras P . 1998 .. Photolysis of α -tocopherol in olive oils model systems. *J. Agric. Food Chem.* 46, 4529-4533.
- [11] Deiana M. Rosa A. Cao C.F. 2002. Novel approach to study oxidative stability of extra virgin olive oils: importance of α -tocopherol concentration. *J.Agric. Food Chem.*, 50, 4342- 4346.
- [12] Cortesi. N, Rovellini. P, Fusari. P.2002. Dosaggio dei biofenoli degli oli vergini di olive: Idrossitirosoli, Tirosolo, Agliconi secoiriodi, Acidi secoiridoidi, Lignani e Flavonoidi. *Riv.Ital.Sostanze Grasse*.79: 145-150.
- [13] IUPAC methods n°2432. (1992).
- [14] Harwood.J, Aparicio.R.2000. Handbook of olive oil, analysis and properties.An Aspen Publication.Maryland.
- زیادی از ترکیبات فنولی همراه با آب شسته شده و خارج می شود. به همین دلیل میزان پلی فنلهای روغنهای زیتون تصفیه شده معمولاً بسیار ناچیز است. نمونه های 5 و 7 تحت تاثیر فرایند تصفیه مقادیر زیادی از پلی فنلها را از دست داده اند. شاخصترین پلی فنلها در همه نمونه های روغن زیتون تیروزول و هیدروکسی تیروزول می باشند که نقش موثری در پایداری و مقاومت روغن دارند. میزان توکوفرولها و پلی فنلها در روغنهای زیتون ایرانی نمونه های انتخاب شده بسیار کم می باشد و با توجه به اینکه تعیین هویت و صحت این روغنهای زیتون صورت نگرفته است، بنابراین از عوامل متعددی که باعث کاهش این ترکیبات می شوند ، می توان به اعمال فرایند تصفیه شدید، بسته بندی ها ی نامناسب و عدم رعایت اصول نگهداری روغن زیتون را نام برد. همچنین میزان ترکیبات فنلی روغن زیتون تحت تاثیر وارسته، شرایط کاشت، درجه رسیدگی در هنگام برداشت و فرایند استخراج می باشد [14].

5- منابع

- [1] Maghsodi. Shahram. 1374. Technology of olive and olive products. Publisher, Agriculture Science. Page 20-21.
- [2] Baldioli. M. Servili. G, Perretti. G, Montedoro.F. 1996. Antioxidant activity of tocopherols and phenolic compounds of virgin olive oil. *J.Am.Oil Chem.Soc.*, 73, 1589-1593 .
- [3] Boskou D. 1996. Olive Oil Chemistry and Technology. AOCS Press, Champaign, 52-83 pp
- [4] Solinas. M , Di Giovacchino, and Mascolo.A. 1978 . The Polyphenols of olive oil. Note III : Influence of Temperature and Kneading time on the oil polyphenol content, *Riv.Ital.Sostanze Grasse* 55:19-23.
- [5] Servili. M, Baldioli.M, Mariotti.F, Montedoro.G.F. 1999. Phenolic composition of olive fruit and virgin olive oil :Distribution in the constitutive parts of fruit and evolution during oil mecjhanical extraction process. *Acta Hortic.* 474 : 609-613.