ارزیابی و مقایسه ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی-آبی و متانولی پوست نارنج

مهسا مایلی[۱]، حسین تاجیک[۲]، تورج مهدی‌زاده*[۳]، فاطمه اسماعیلی[۱]

تاریخ دریافت : ۱۳۹۶/۲/۱۲
تاریخ پذیرش :۱۳۹۷/۲/۹

چکیده

واکنش‌های اکسیداسیون با تولید رادیکال‌های آزاد، سلامت انسان را به خطر می‌اندازند و باعث کاهش کیفیت حسی و تغذیه‌ای غذا می‌شوند. از این رو، تلاش‌هایی برای یافتن آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی و موثر گیاهی صورت گرفته است. در این مطالعه، ارزیابی میزان فنل تام و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در عصاره اتانولی-آبی و متانولی مربوط به پوست میوه نارنج و مقایسه آن با آنتی‌اکسیدان مصنوعی بوتیل هیدروکسی تولوئن صورت گرفت. میزان ترکیبات فنلی به روش فولین سیوکالتو بررسی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی با سه آزمون قدرت احیاکنندگی، مهار DPPH و ABTS ارزیابی شد. محتوای فنلی برای عصاره اتانولی و متانولی به ترتیب ۰/۸۲ ± ۵۹/۳۸ و ۰/۵۱ ±۵۰/۹۶ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم عصاره، اندازه گیری شد. در آزمون درصد بازدارندگی رادیکال آزاد، عصاره‌ها اثر مهاری قابل‌توجهی نشان دادند؛ ولی در آزمون ABTS، اثر عصاره متانولی بیشتر از اتانولی بود. یافته‌ها نشان می‌دهد که هر دو نوع عصاره، دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی نسبتاً مناسبی هستند؛ به همین علت، می‌توانند به عنوان یک منبع بالقوه طبیعی در صنایع غذایی و داروئی پیشنهاد شوند.

واژه‌های کلیدی: ***اکسیداسیون، پوست میوه، عصاره طبیعی، فنل کل***

مقدمه

تغییرات اکسیداتیو در مواد غذایی از طریق ایجاد ترکیباتی باعث کاهش طعم، کیفیت حسی و تغذیه‌ای مواد غذایی می‌شوند (Akoh, 2017). همچنین واکنش‌های اکسیداسیون به دلیل تولید رادیکال‌های آزاد سلامت انسان را به مخاطره می‌اندازند. این رادیکال‌ها آغازگر واکنش‌های اکسیداسیون هستند که به آسیب یا مرگ سلول‌ها منجر می‌شوند(Kulshreshtha *et al.*, 2011).

۱- کارشناس ارشد بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۲-استاد، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۳- استادیار، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
*(نویسنده مسئول: t.mehdizadeh@urmia.ac.ir)

ص این مقاله برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد رشته بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی نگارنده اول، به راهنمایی اساتید دکتر حسین تاجیک و دکتر تورج مهدی زاده بوده و در دانشگاه ارومیه انجام گرفته است.

ترکیبات ROS و RNS (Reactive oxygen species and reactive nitrogen species) به ترتیب گونه‌های واکنشی اکسیژن و نیتروژن هستند که روند اکسایشی را در سلول‌ها ایجاد می‌کنند. این‌گونه‌ها دو نقش سمی و مفید ایفا می‌کنند؛ به این صورت که، در سطوح پایین یا متوسط اثرات مفیدی بر روی پاسخ‌های سلولی و عملکرد سیستم ایمنی بدن دارند و در غلظت‌های بالا، استرس اکسیداتیو ایجاد می‌کنند (Weidinger & Kozlov., 2015). استرس اکسیداتیو نقش عمده‌ای در توسعه بیماری‌های مزمن و تحلیل برنده مانند سرطان، آرتروز، پیری، اختلالات خود ایمنی، قلبی-عروقی و بیماری‌های عصبی ایفا می‌کند (Pacher *et al.*, 2007).

بدن انسان دارای چندین مکانیسم برای مقابله با استرس اکسیداتیو است؛ برای نمونه، می‌توان به تولید آنتی‌اکسیدان در بدن به‌طور طبیعی و یا دریافت آن از طریق غذاها و مکمل‌ها اشاره کرد (Valko *et al.*, 2006; Chatterjee *et al.*, 2006). آنتی‌اکسیدان‌ها همچنین، برای جلوگیری از تغییرات اکسیداتیو، به مواد غذایی اضافه می‌شوند. بسیاری از آنتی‌اکسیدان‌هایی که در حال حاضر استفاده می‌شوند مصنوعی هستند؛ ازجمله، بوتیل هیدروکسی آنیزول و بوتیل هیدروکسی تولوئن که مطالعات سمّی بودن آنها را نشان داده است (Akoh, 2017). این یافته‌ها، علاقه‌ی مصرف‌کنندگان به آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی را تقویت کرده است. به همین علت، مصرف این گونه مواد غذایی طبیعی نزد مصرف‌کنندگانی که معتقد هستند این مواد سالم‌تر، کم‌خطرتر و ایمن‌تر از آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی هستند، اهمیت ویژه‌ای دارد (Raikos, 2017).

در طول روند آبگیری مرکبات، هزاران تن محصول فرعی تولید می‌گردد که عمدتاً برای تغذیه حیوانات استفاده می‌شود. این محصولات، به دلیل دارا بودن محتوای بالایی از فیبر، می‌توانند یک منبع غنی از فیبر در رژیم غذایی باشند (Lario *et al.*, 2004; Mandalari *et al.*, 2006). از طرفی، محصول جانبی مرکبات نه‌تنها به خاطر محتوای فیبر آن، بلکه به دلیل ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آن می‌تواند قابل‌توجه باشد (Kang *et al.*, 2006; Zia-ur-Rehman, 2006). این محصولات، دارای فیبر و ویتامین بالا؛ همچنین شامل سایر ترکیبات فعال زیستی مرتبط از قبیل فلاونوئیدها و ترپن‌ها هستند که خواص آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی اعمال می‌کنند (Lario *et al.*, 2004). امروزه، روش‌های زیادی جهت ارزیابی تأثیر این آنتی‌اکسیدان‌ها وجود دارد؛ مانند مهار رادیکال‌های آزاد، قدرت احیاکنندگی، ظرفیت جذب رادیکال‌های اکسیژن، روش رنگ‌بری بتاکاروتن، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی معادل ترولکس، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی‌کل و غیره. در هر یک از روش‌های ذکرشده، اساس واکنش و نوع سوبسترای اکسید شونده متفاوت است. برای ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی بهتر است از روش‌هایی استفاده کرد که شامل مجموعه‌ای از روش‌های شیمیایی و بیوشیمیایی باشند.

نارنج (*Citrus aurantium*) معمولاً با عنوان sour orange، orange bitter یا Seville orange شناخته می‌شود. این گونه، به دلیل داشتن ترکیبات زیست فعال مختلف مانند ترکیبات فنولیک، فلاونویید، اسانس و ویتامین برای اهداف دارویی استفاده می‌شود.

قسمت‌هایی که اکثراً مصرف دارویی دارد شامل پوست، شکوفه و برگ‌های این گیاه است (Moraes *et al.*, 2009; Rouseff & Perez-Cacho, 2007).

مطالعات متعددی در مورد خواص و ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی پوست نارنج انجام شده است؛ ازجمله، ترابلسی و همکاران (Trabelsi *et al.*, 2014) نشان دادند که عصاره متانولی پوست نارنج بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را در مقایسه با اسانس دارد. نتایج ادریری و همکاران (Ouedrhiri *et al.*, 2015) نیز نشان داد که اسانس پوست، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به برگ دارد. سارو و همکاران (Sarrou *et al.*, 2013) فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس پوست، شکوفه و برگ‌های نارنج را مورد بررسی قراردادند. آزمون DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) اسانس نشان داد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی به ترتیب در برگ‌های کهنه، شکوفه‌ها، برگ‌های تازه و سپس در پوست بیشتر بوده است. لاگا- بنامروچه و مدنی (Lagha-Benamrouche & Madani, 2013) نیز نشان دادند که در میان برگ و پوست مربوط به ۷ واریته از پرتقال، نارنج بالاترین ظرفیت را برای کاهش میزان اکسیداسیون لینولئیک اسید و بتاکاروتن دارد (۷۷ درصد). همچنین، در این مطالعه نارنج بالاترین فعالیت آنتی رادیکالی را نشان داد. تفاوت در خصوصیات عملکردی عصاره‌های گیاهی، مانند اثرات آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی، به دنبال استفاده از روش‌های مختلف استخراج و نوع حلال‌های مورد استفاده توسط محققین زیادی گزارش شده است. از آنجا که هیچ تحقیقی در ارتباط با تفاوت در عملکرد آنتی اکسیدانی عصاره‌های استخراج شده از پوست نارنج با حلال‌های مختلف وجود ندارد، در این تحقیق به این موضوع پرداخته می‌شود.

مواد و روش‌ها

رادیکال ۲و۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH)، پتاسیم فری‌سیانید، آهن III کلرید و کلیه مواد شیمیایی و حلال‌های مورداستفاده در این تحقیق، با خلوص بالا، از شرکت مرک آلمان تهیه شد. معرف فولین سیوکالتو، اسید گالیک، ۲و۲-آزینو بیس۳-اتیل بنزوتیازولین-۶- سولفونیک اسید و پرسولفات پتاسیم نیز از شرکت سیگمای آمریکا تهیه شد.

آماده‌سازی عصاره‌ها

نارنج، پس از خریداری از بازار محلی آمل، توسط گروه علوم باغبانی دانشگاه ارومیه از نظر جنس و گونه به تائید رسید. برای تهیه عصاره، پوست نارنج در سایه خشک و سپس با آسیاب به ذرات ریز تبدیل و از الک با اندازه ۶۰ مش گذرانده شد. سپس ۲۰۰ گرم پوست نارنج به یک لیتر حلال متانول برای عصاره متانولی، و اتانول و آب به نسبت ۷۰ به ۳۰ برای عصاره اتانولی-آبی افزوده شد و مخلوط حاصل بعد از مخلوط کردن به مدت ۲۴ ساعت روی شیکر، از فیلتر با کاغذ صافی معمولی عبور داده شد؛ سپس، در دستگاه روتاری تحت خلا ء قرار گرفت. عصاره حاصل درون پلیت ریخته شد و پس از تبخیر حلال در آون ۴۰ درجه سانتی‌گراد تا زمان مصرف در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

اندازه‌گیری میزان کل ترکیبات فنلی

میزان کل ترکیبات فنلی با روش فولین سیوکالتو اندازه‌گیری شد. ۵۰۰ میکرولیتر عصاره در غلظت‌های مختلف با ۲۲۵۰ میکرو لیتر آب مقطر و ۲۵۰ میکرولیتر فولین سیوکالتو مخلوط و بعد از گذشت ۵ دقیقه، ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷/۵ درصد به آن‌ها افزوده شد. بعد از قرار دادن نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت در تاریکی، جذب آن‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول‌موج ۷۶۰ نانومتر خوانده شد و نتایج برحسب میلی‌گرم اسید گالیک در گرم عصاره بیان شد (Ordoñez *et al*., 2006).

بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره به روش DPPH

در این روش، توانایی دادن اتم هیدروژن یا الکترون توسط عصاره‌های مختلف، از روی میزان بی‌رنگ کردن محلول بنفش DPPH در متانول، سنجیده می‌شود. ۲ میلی‌لیتر DPPH به ۰/۵ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره و آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT افزوده شد و مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در محل تاریک قرار گرفت. میزان جذب در طول‌موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. در نمونه کنترل، ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره با متانول جایگزین شد. درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH با فرمول زیر محاسبه شد (Akowuah *et al*., 2005)،

درصد مهار رادیکال آزاد = (Ac-As)/Ac ×100

در این فرمول، Ac: میزان جذب کنترل و As: میزان جذب نمونه است.

ارزیابی قدرت احیاکنندگی (Reducing Power)

برای این منظور، یک میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره و آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT با یک میلی‌لیتر بافر فسفات و یک میلی‌لیتر فروسیانید پتاسیم مخلوط شدند و به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آب ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس، یک میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید ۱۰درصد (وزنی: حجمی) به نمونه‌ها افزوده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۰۰۰ دور سانتریفوژ شدند. سپس به یک میلی‌لیتر از مایع رویی نمونه‌ها، ۰/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر فریک کلراید اضافه نموده و پس از گذشت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، میزان جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۷۰۰ نانومتر قرائت شد (Yildirim *et al*., 2001a).

ارزیابی قدرت مهارکنندگی رادیکال ABTS ((2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid))

این آزمون با استفاده از روش روبرتا و همکاران با اندکی تغییرات انجام شد. ابتدا محلول‌های پایه، شامل ABTS (۷ میلی مولار) و پتاسیم پرسولفات (۲/۴۵ میلی مولار) تهیه شد؛ در ادامه، محلول اصلی ABTS به‌وسیله مخلوط کردن دو محلول پایه به مقدار مساوی با یکدیگر تهیه شد. این مخلوط در دمای اتاق و محیط تاریک به مدت ۱۶ ساعت به‌منظور تکمیل واکنش نگهداری شد.

سپس محلول تهیه‌شده با اتانول تا رسیدن جذب به (۰/۲±) ۰/۷ در طول‌موج ۷۳۴ نانومتر رقیق شد. ۰/۲ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره‌ها و BHT به ۲ میلی‌لیتر از محلول تازه تهیه شده‌ی ABTS اضافه شد و بعد از ۶ دقیقه نگهداری در تاریکی، جذب نمونه‌ها در ۷۳۴ نانومتر اندازه‌گیری شد. درصد بازدارندگی نمونه از طریق رابطه زیر محاسبه و درنهایت به‌صورت ظرفیت آنتی‌اکسیدانی معادل آسکوربیک اسید گزارش گردید (Re *et al.*, 1999)،

$$I = (A_{blank} - A_{sample})/A_{blank} \times 100$$

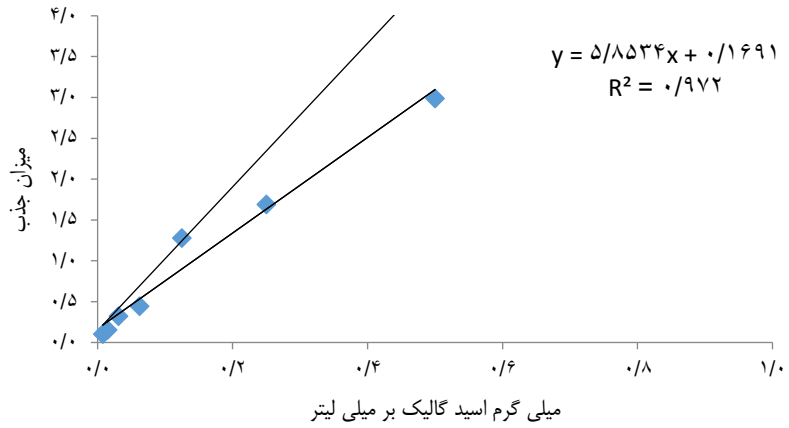
در این فرمول، A_{blank} میزان جذب نوری کنترل منفی و A_{sample} بیانگر جذب نوری غلظت‌های مختلف عصاره است.

تجزیه و تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل داده ها از نرم‌افزار SPSS ورژن ۱۹، برای مقایسه معناداری میانگین‌ها از آنالیز واریانس یکطرفه و تست دانکن، و برای رسم نمودارها نیز از نرم افزار Excel استفاده شد.

نتایج و بحث

جهت تعیین میزان فنل کل، منحنی استاندارد اسید گالیک رسم گردید (شکل شماره ۱). معادله حاصل از منحنی استاندارد اسیدگالیک برای محاسبه محتوای فنل کل، به‌صورت $y=5.7923x + 0.1696$ $(R^2 = 0.9816)$ بود. بر اساس این معادله، محتوای فنل عصاره‌ها اندازه‌گیری شد.



شکل شماره ۱: منحنی استاندارد اسید گالیک

نتایج تعیین میزان فنل کل عصاره‌ها، به روش فولین سیوکالتو و رابطه آن با قدرت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH در جدول شماره یک نشان داده شده است. نتایج آزمون اندازه‌گیری محتوای فنلی نشان می‌دهد که همبستگی معنا داری میان میزان ترکیبات فنلی کل و خواص آنتی‌اکسیدانی وجود دارد. با توجه به جدول شماره یک عصاره اتانولی با بالاترین میزان

ترکیبات فنلی دارای بالاترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی نسبت به عصاره متانولی است. ترکیبات مشتق شده از گیاهان عمدتاً متابولیت‌های ثانویه هستند که اکثر آن‌ها فنل‌ها یا مشتقات فنل‌ها می‌باشند. این متابولیت‌ها اثرات مختلف ازجمله فعالیت‌های ضدمیکروبی در برابر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و عامل فساد و نیز فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارند (Hayek *et al*., 2013). میوه‌ها و سبزیجات غنی از متابولیت‌های ثانویه، مانند ترکیبات فنلی هستند که امروزه به عنوان عوامل آنتی‌اکسیدانی طبیعی شناخته شده‌اند. علاوه براین، ترکیبات فنلی دارای یک طیف گسترده از فعالیت‌های بیولوژیکی می‌باشند که از آن میان می‌توان به ضد جهش‌زایی، ضد سرطانی، ضدالتهابی، ضد آلرژی و همچنین توانایی تغییر بیان ژن اشاره کرد. ترکیبات فنلی نشان داده‌اند که دارای یک فعالیت آنتی‌اکسیدانی بر اساس انتقال گروه‌های هیدروکسیل به رادیکال‌های آزاد هستند (Marinova *et al*; 2005; Ibrahim *et al*., 2011). همان‌طورکه گزارش شده است، یک رابطه معکوس بین مصرف رژیم غذایی غنی از آنتی‌اکسیدان و بروز تعدادی از بیماری‌ها در انسان وجود دارد (Rajendran *et al*., 2014; Zhang *et al*., 2015). در این بین، وجود حلال‌ها و روش‌های مختلف استخراج عصاره‌ها بر نوع ترکیبات موثره آن‌ها تاثیر گذار می‌باشد. از این رو، جهت استفاده کاربردی از عصاره‌های گیاهی بررسی این متغیر مهم می‌باشد.

از رایج‌ترین روش‌های اندازه‌گیری ترکیبات فنلی روش فولین سیوکالتو می‌باشد. اساس کار به این صورت است که ترکیبات فنلی، معرف فولین را در محیط قلیایی احیاء می‌کند و تشکیل کمپلکس ی آبی‌رنگ می‌دهد که حداکثر جذب آن در طول‌موج ۷۶۰ نانومتر می‌باشد (Naczk & Shahidi, 2004). در این مطالعه، مشخص شد که بین ترکیبات فنلی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی رابطه مستقیم و منطقی وجود دارد؛ طوری‌که، در مطالعات دیگر نیز این رابطه نشان داده شده‌است (Tawaha *et al*., 2007). در تحقیق حاضر، نشان داده می‌شود که میزان ترکیبات فنلی عصاره اتانولی-آبی به طور معنی داری بالاتر از عصاره متانولی می‌باشد. با توجه به اینکه اتانول نسبت به متانول سمیت چندانی ندارد، انتخاب بهتری برای استخراج عصاره‌های گیاهی خواهد بود.

جدول ۱: مقایسه مقادیرفنل کل عصاره‌های متانولی و اتانولی نارنج و میزان همبستگی میان فنول کل و مقادیر فعالیت آنتی‌اکسیدانی.

		سنجش آنتی‌اکسیدانی بروش DPPH	
	میلی‌گرم گالیک اسید / گرم عصاره	مقدار Sig(P)	R
مقدار فنل کل عصاره اتانولی	۵۹/۳۸ ±۰/۸۲ [a*]	۰/۰۳۶ **	۰/۸۴۳
مقدار فنل کل عصاره متانولی	۵۰/۹۶±۰/۵۱ [b]	۰/۰۴۵ **	۰/۸۱۸

*حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح (p<۰/۰۵) است که با آزمون واریانس یکطرفه و تست دانکن بدست آمده اند.

** همبستگی در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار است.

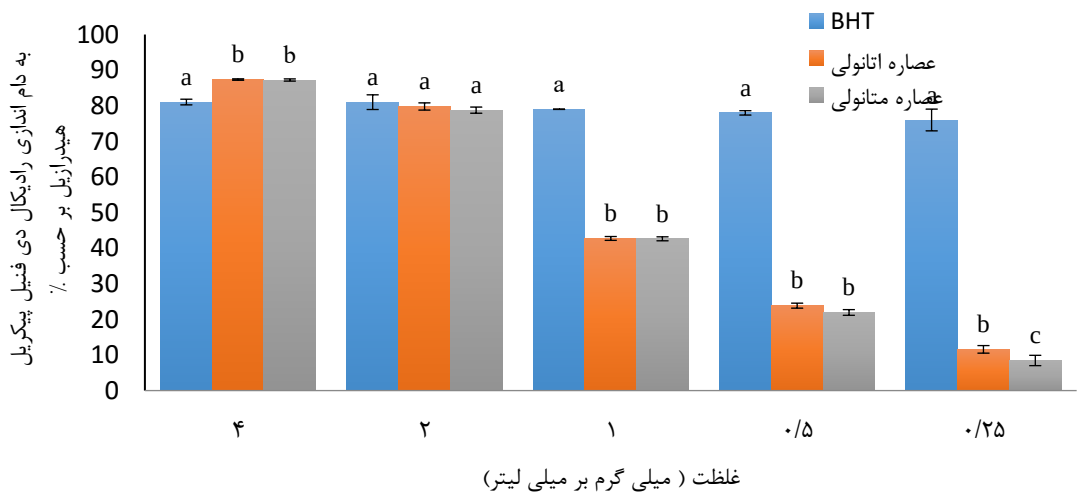
نتایج بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها به روش DPPH در شکل شماره ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که افزایش مهار رادیکال‌های آزاد در عصاره‌ها، وابسته به غلظت است. درحالی‌که این رابطه در نمونه شاهد صدق نمی‌کند و با افزایش

غلظت، میزان توانایی جذب رادیکال‌های آزاد تفاوت چندانی نشان نمی‌دهد. همچنین بین عصاره‌ها به‌جز در غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، در جذب رادیکال‌های آزاد اختلاف معنی‌داری وجود ندارد (p>۰/۰۵). عصاره‌ها بیشترین درصد بازدارندگی را در غلظت ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نشان می‌دهند. در غلظت‌های کمتر، آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT فعالیت ضدرادیکالی بالاتری نسبت به عصاره‌ها دارد، اما فعالیت ضدرادیکالی آن در غلظت‌های ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کمتر از عصاره‌ها است. در آزمون بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره به روش DPPH، توانایی دادن اتم هیدروژن یا الکترون توسط ترکیبات و عصاره‌های مختلف با میزان بی‌رنگ کردن محلول بنفش ۲و-۲ دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل به زرد روشن در متانول با روش اسپکتروفتومتری مورد سنجش قرار می‌گیرد (Burits & Bucar, 2000). تحقیقات مختلف گزارش کرده‌اند که مهار رادیکال‌های آزاد DPPH به‌وسیله عصاره‌ها وابسته به غلظت است و با افزایش غلظت عصاره، اثر مهارکنندگی بیشتر می‌شود (Kil *et al*., 2009; Manach *et al*., 2004; Shukla *et al*., 2009).

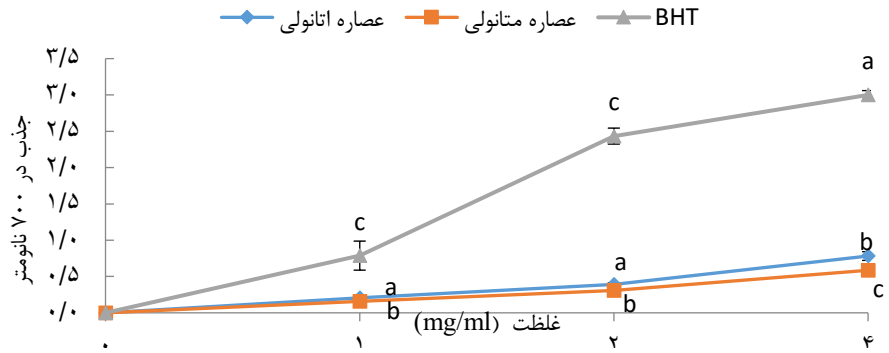
همچنین ارتباط نزدیکی بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و محتوای فنلی عصاره‌ی به دست‌آمده از منابع مختلف طبیعی توسط بسیاری از محققان نشان داده شده است (Liu *et al*., 2007; Verzelloni *et al*., 2007).

در تحقیق حاضر نیز این مورد به اثبات رسید و بین میزان ترکیبات فنولی و قدرت آنتی اکسیدانی همبستگی معنی داری وجود داشت. این امر، نشان دهنده تاثیر مستقیم ترکیبات فنولی در بروز قدرت آنتی‌اکسیدانی است. قدرت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولی را می‌توان به دلیل نقش مهم آن‌ها در جذب سطحی و خنثی نمودن رادیکال‌های آزاد و خارج کردن اکسیژن یگانه از واکنش نسبت داد (Shahidi & Ambigaipalan, 2015). همچنین گزارش شده است که حلّال مورد استفاده در استخراج عصاره ممکن است در فعالیت آنتی‌اکسیدانی وابسته به محتوای فنلی دخیل باشد (Liu *et al*., 2007).

شکل ۲: میزان به دام اندازی رادیکال DPPH غلظت‌های مختلف عصاره‌های نارنج در مقایسه با BHT. حروف غیرمشابه در هر غلظت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است (p≤۰/۰۵).



نتایج تعیین قدرت احیاکنندگی عصاره‌های نارنج در مقایسه با BHT در شکل شماره سه نشان داده شده است. نتایج قدرت احیاکنندگی نشان میدهد که قدرت احیاکنندگی عصاره‌ها و آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT با افزایش غلظت، افزایش می‌یابد. در تمامی غلظت‌ها، قدرت احیاکنندگی آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT بیشتر از عصاره‌ها است و قدرت احیاکنندگی عصاره اتانولی بیشتر از عصاره متانولی است. در آزمون قدرت احیاکنندگی، توانایی عصاره‌ها برای احیاء Fe^{3+} یا فری سیانید و تبدیل آن به Fe^{2+} یا فروس سنجیده می‌شود؛ به این صورت که، عوامل احیاکننده‌ی عصاره‌ها منجر به احیاء کمپلکس‌های فری سیانید و تبدیل آن‌ها به فرم فروس می‌گردند. بسته به ظرفیت احیاکنندگی عصاره‌ها، محلول زرد آزمایش به درجات مختلفی از رنگ سبز و آبی تبدیل می‌شود (Soares *et al*., 2009). در مطالعه حاضر، ارتباط مستقیمی بین قدرت احیاکنندگی عصاره‌ها و مقدار توتال فنل آن‌ها وجود دارد؛ بنابراین، عصاره اتانولی با بیشترین میزان ترکیبات فنلی قدرت احیاکنندگی بیشتری نسبت به عصاره متانولی نشان می‌دهد. گزارش گا و کاویاراسانا نیز نتایج این تحقیق را تایید می‌کند (Ga & Kaviyarasana, 2011).



شکل ۳: میزان قدرت احیاکنندگی عصاره‌های نارنج در مقایسه با BHT. حروف غیرمشابه در هر غلظت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است.($p\leq$۰/۰۵)

نتایج ارزیابی قدرت مهارکنندگی رادیکال ABTS، برحسب درصد بازدارندگی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی معادل آسکوربیک اسید، در جدول شماره ۲ آمده است. نتایج نشان می‌دهد که در تمامی غلظت‌ها درصد بازدارندگی آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT از دو عصاره‌ی دیگر بیشتر است و بین آنها از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($p\leq$۰/۰۵). همچنین در تمامی غلظت‌ها به‌جز غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر درصد بازدارندگی عصاره متانولی از عصاره اتانولی-آبی بیشتر است. همچنین درصد بازدارندگی رادیکال ABTS عصاره اتانولی به‌جز در غلظت ۰/۲۵، با افزایش غلظت افزایش می‌یابد ولی در عصاره متانولی از غلظت ۰/۲۵ تا ۴ با افزایش غلظت، درصد بازدارندگی افزایش می‌یابد درحالی‌که در آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT تفاوت معنی‌داری در افزایش درصد بازدارندگی با افزایش غلظت مشاهده نمی‌شود. ارزیابی قدرت مهارکنندگی رادیکال ABTS، یکی از روش‌های مشهور تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به آنتی‌اکسیدان‌های محلول در آب، محلول در چربی یا مواد ناخالص و عصاره‌های گیاهی است (Gliszczyńska-Świgło, 2006).

این روش، بر اساس جذب رادیکال نسبتاً پایدار سبز آبی ABTS و تبدیل آن به یک محصول بی‌رنگ می‌باشد. شدت کاهش رنگ، نشان‌دهنده‌ی مقدار رادیکال ABTS است که به‌وسیله آنتی‌اکسیدان مهار شده است و میزان آن با دستگاه طیف‌سنج نوری اندازه‌گیری می‌شود (Schaich *et al*., 2015). این آزمون، برخلاف آزمون DPPH، نشان می‌دهد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی بیشتر از اتانولی-آبی است. تفاوت بین دو نتیجه را می‌توان با مکانیسم واکنش‌های درگیر توضیح داد؛ به این صورت که، واکنش رادیکال‌های ABTS شامل انتقال الکترون است و بسیار سریع‌تر از واکنش رادیکال DPPH انجام می‌شود که میزان بی‌رنگ شدن آن به توانایی دادن الکترون ترکیبات آزمون نسبت داده می‌شود (Naik *et al*., 2006). از طرف دیگر قدرت کمتر اتانول در مقایسه با متانول را می‌توان به وجود رادیکالهای اتیل در اتانول نسبت داد که طولانی تر از رادیکالهای متیل در متانول بوده و باعث کاهش حلالیت مولکولهای آنتی اکسیدان می‌شود(Boeing *et al*., 2014).

نتایج تحقیقات بنداود و همکاران (Bendaoud *et al*., 2009)، همچنین ارکان و همکاران (Erkan *et al*., 2008) با نتایج مطالعه حاضر منطبق است. مطالعات اخیر نشان داده است که محصولات جانبی صنایع آبگیری مرکبات، منبعی از ترکیبات زیست فعال هستند زیرا پوست مرکبات منبعی غنی از متابولیت‌های ثانویه مانند اسانس و ترکیبات فنلی است (Khan *et al*., 2010; He *et al*., 2011).

جدول ۲: درصد بازدارندگی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی معادل آسکوربیک اسید در غلظت‌های مختلف عصاره‌های نارنج و BHT

غلظت (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)		ظرفیت آنتی‌اکسیدانی معادل آسکوربیک اسید (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	درصد بازدارندگی
۰/۲۵	اتانولی	aA ۰/۰۲±۰/۰۱	aA ۱۹/۲۸±۹/۱۱
	متانولی	aA ۰/۰۲±۰/۰۱	aA ۱۸/۸۷±۰/۲۱
	BHT	bA ۰/۱۹±۰/۰۲	bA ۹۳/۵۳±۲/۴۷
۰/۵	اتانولی	aA ۰/۰۳±۰/۰۱	aA ۲۵/۴۸±۰/۹۶
	متانولی	bB ۰/۰۷±۰/۰۱	bB ۴۱/۴۰±۱/۰۱
	BHT	cA ۰/۱۹±۰/۰۱	cA ۹۴/۶۶±۶/۳۹
۲	اتانولی	aB ۰/۰۷±۰/۰۱	aB ۴۲/۰۸±۰/۱۱
	متانولی	bC ۰/۱۱±۰/۰۱	bC ۵۸/۵۹±۶/۸۵
	BHT	cA ۰/۱۹±۰/۰۲	cA ۹۵/۷۳±۵/۴۵
	اتانولی	aC ۰/۱۱±۰/۰۱	aC ۵۸/۶۷±۶/۱۳
	متانولی	bD ۰/۱۷±۰/۰۳	bD ۸۴/۴۷±۴/۲۱
	BHT	cA ۰/۲۰±۰/۰۲	cA ۹۸/۹۳±۲/۳۲
۴	اتانولی	aD ۰/۱۹±۰/۰۲	aD ۹۵/۴۳±۰/۲۱
	متانولی	aE ۰/۲۰±۰/۰۳	aE ۹۸/۰۲±۲/۱
	BHT	aA ۰/۲۰±۰/۰۴	aA ۱۰۰/۰±۰/۱

در هرستون حروف کوچک غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح$p\leq0.05$ برای عصاره‌های مختلف در غلظت یکسان می‌باشد. حروف بزرگ غیرمشابه نیز نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین غلظت‌های مختلف یک عصاره در سطح $p\leq0.05$ می‌باشد.

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، به نظر می‌رسد فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های پوست نارنج به دلیل حضور پلی فنل هایی باشد که ممکن است با روشی شبیه ترکیبات احیاکننده عمل نماید؛ به این صورت که، با دادن الکترون و واکنش با الکترون‌های آزاد، آن‌ها را به ترکیباتی باثبات‌تر تبدیل نماید که خاتمه دهنده واکنش زنجیره‌ای رادیکال‌های آزاد باشد (Singh *et al*., 2002). ترکیبات آنتی‌اکسیدانی که مسئول فعالیت آنتی‌اکسیدانی هستند، می‌توانند جدا شوند و به عنوان مکمل‌های غذایی برای به تأخیر انداختن فساد مواد غذایی ناشی از اکسیداسیون استفاده شوند. به همین دلیل، تحقیق در مورد گیاهان مختلف غنی از آنتی‌اکسیدان از جنبه‌های مختلف، مهم است (Yildirim *et al*., 2001b).

نتیجه گیری کلی

فرآوری محصولات کشاورزی منجر به تولید محصولات جانبی می‌شود که در برخی موارد حاوی ترکیبات فعال زیستی مانند پلی فنل‌ها هستند و دارای پتانسیل آنتی اکسیدانی بالایی می‌باشند. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه، عصاره‌های پوست نارنج دارای سطوح مختلفی از فعالیت آنتی اکسیدانی بوده است. در همه‌ی آزمون‌ها به جزء ABTS عصاره اتانولی با اختلاف کمی از عصاره متانولی فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری دارد. از طرفی، با انتخاب صحیح روش و حلّال مناسب جهت جداسازی ترکیبات موثره گیاهی، می‌توان به نحو مطلوب تری جهت استفاده در کاربردهای گوناگون از محصولات جانبی گیاهان و میوه‌ها بهره جست. این مطالعه، اولین گام در شناسایی و مقایسه اثرات آنتی اکسیدانی عصاره های اتانولی و متانولی پوست نارنج بوده است و می‌تواند با تحقیقات بیشتر، بر روی شناسایی ترکیبات و مولکول‌های موثر آن، کامل تر شده، به بررسی و تایید این اثرات در محیط *in vivo* منجر شود. همچنین لازم است تحقیقات بیشتر با استفاده از حلّالهای دیگر مانند اتیل استات، کلروفرم و ترکیب نسبتهای مختلف با همدیگر و با کمک روش‌های جدیدتر عصاره‌گیری مانند مایکروویو، اولتراسوند و سیّال فوق بحرانی صورت گیرد. در نتیجه با تحقیقات بیشتر، این عصاره‌ها می‌توانند به‌عنوان یک منبع غنی، در دسترس و بالقوه، از ترکیبات زیست فعّال با خاصیت آنتی اکسیدانی در صنایع غذایی و داروئی بکار روند.

سپاسگزاری

نویسندگان بر خود وظیفه می دانند که از معاونت پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه که با حمایت مادی و معنوی خود در اجرای این تحقیق همکاری صمیمانه داشتند، کمال تشکر و قدردانی را داشته باشند.

منابع

Akoh, C.C. (2017. Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology. 3rd edn. CRC Press. 322 Pp. London.

Akowuah, G.A., Ismail, Z., Norhayati, I. and Sadikun, A. (2005) The effects of different extraction solvents of varying polarities on polyphenols of Orthosiphon stamineus and evaluation of the free radical-scavenging activity. Food Chemistry, 93: 311-317.

Bendaoud, H., Bouajila, J., Rhouma, A., Savagnac, A. and Romdhane, M. (2009) GC/MS analysis and antimicrobial and antioxidant activities of essential oil of Eucalyptus radiata. Journal of the Science of Food and Agriculture, 89: 1292-1297.

Boeing, J.S., Barizão, É.O., E Silva, B.C., Montanher, P.F., de Cinque Almeida, V. and Visentainer, J.V. (2014) Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis. Chemistry Central Journal, 8: 1-9.

Burits, M. and Bucar, F. (2000) Antioxidant activity of Nigella sativa essential oil. Phytotherapy Research, 14: 323-328.

Chatterjee, M., Saluja, R., Kanneganti, S., Chinta, S. and Dikshit, M. (2006) Biochemical and molecular evaluation of neutrophil NOS in spontaneously hypertensive rats. Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-Grand, France), 53: 84-93.

Erkan, N., Ayranci, G. and Ayranci, E. (2008) Antioxidant activities of rosemary (Rosmarinus Officinalis L.) extract, blackseed (Nigella sativa L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. Food Chemistry, 110: 76-82.

Ga, J. and Kaviyarasana, V. (2011) Antimicrobial and antioxidant properties of Trametes gibbosa (Pers.) Fr. Journal of Pharmacy Research, 4: 3939-3942.

Gliszczyńska-Świgło, A. (2006) Antioxidant activity of water soluble vitamins in the TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) and the FRAP (ferric reducing antioxidant power) assays. Food Chemistry, 96: 131-136.

Hayek, S.A., Gyawali, R. and Ibrahim, S.A. (2013) Antimicrobial natural products. Microbial pathogens and strategies for combating them: Science, technology and education. 2: 91.

He, D., Shan, Y., Wu, Y., Liu, G., Chen, B. and Yao, S. (2011) Simultaneous determination of flavanones, hydroxycinnamic acids and alkaloids in citrus fruits by HPLC-DAD–ESI/MS. Food chemistry, 127: 880-885.

Ibrahim, M.H., Jaafar, H.Z., Rahmat, A. and Rahman, Z.A. (2011) Effects of nitrogen fertilization on synthesis of primary and secondary metabolites in three varieties of kacip Fatimah (Labisia pumila Blume). International Journal of Molecular Sciences, 12: 5238-5254.

Kang, H., Chawla, S., JO, C., Kwon, J. and Byun, M. (2006) Studies on the development of functional powder from citrus peel. Bioresource Technology, 97: 614-620.

Khan, M.K., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A.-S., Dangles, O. and Chemat, F. (2010) Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (Citrus sinensis L.) peel. Food Chemistry, 119: 851-858.

Kil, H.Y., Seong, E.S., Ghimire, B.K., Chung, I.-M ,.Kwon, S.S., Goh, E.J., Heo, K., Kim, M.J., Lim, J.D. and Lee, D. (2009) Antioxidant and antimicrobial activities of crude sorghum extract. Food Chemistry, 115: 1234-1239.

Kulshreshtha, M., Goswami, M., Rao, C., Ashwlayan, V. and Yadav, S. (2011) Estimation of antioxidant potential of aqueous extract of Ficus bengalensis leaf on gastric ulcer. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, 9: 122-6.

Lagha-Benamrouche, S. and Madani. K. (2013) Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (Citrus sinensis L. and Citrus aurantium L.) cultivated in Algeria: Peels and leaves. Industrial Crops and Products, 50: 723-730.

Lario, Y., Sendra, E., Garcí, J., Fuentes, C., Sayas-Barberá, E., Fernández-López, J. and Pérez-Alvarez, J. (2004) Preparation of high dietary fiber powder from lemon juice by-products. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 5: 113-117.

Liu, X., Dong, M., Chen, X., Jiang, M., LV, X. and Yan, G. (2007) Antioxidant activity and phenolics of an endophytic Xylaria sp. from Ginkgo biloba. Food chemistry, 105: 548-554.

Manach, C., scalbert, A., morand, C., rémésy, C. and jiménez, L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. The American Journal of Clinical Nutrition. 79: 727-747.

Mandalari, G., Bennett, R.N., Bisignano, G., Saija, A., Dugo, G., Lo Curto, R.B., Faulds, C.B. and Waldron, K.W. (2006) Characterization of flavonoids and pectins from bergamot (Citrus bergamia Risso) peel, a major byproduct of essential oil extraction. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54: 197-203.

Marinova, D., Ribarova, F. and Atanassova, M. (2005) Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy. 40: 255-260.

Moraes, T.M., Kushima, H., Moleiro, F.C., Santos, R.C., Rocha, L.R.M., Marques, M.O., Vilegas, W. and Hiruma-Lima, C.A. (2009) Effects of limonene and essential oil from Citrus aurantium on gastric mucosa: role of prostaglandins and gastric mucus secretion. Chemico-Biological Interactions, 180: 499-505.

Naczk, M. and Shahidi, F. (2004) Extraction and analysis of phenolics in food. Journal of Chromatography A, 1054: 95-111.

Naik, G., Priyadarsini, K. and Mohan, H. (2006) Free radical scavenging reactions and phytochemical analysis of triphala, an ayurvedic formulation. Current Science, 90: 1100-5.

Ordoñez, A.A.L., Gomez, J.D., Vattuone, M.A. and Lsla, M.I. (2006) Antioxidant activities of Sechium edule (Jacq.) Swartz extracts. Food Chemistry, 97: 452-458.

Ouedrhiri, W., Bouhdid, S., Balouiri, M., Lalami, A., Moja, S., Chahdi, F. and Greche, H. (2015) Chemical composition of Citrus aurantium L. leaves and zest essential oils, their antioxidant, antibacterial single and combined effects. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 7: 78-84.

Pacher, P., Beckman, J.S. and Liaudet, L. (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. Physiological Reviews, 87: 315-424.

Raikos, V. (2017) Natural antioxidants for food applications: challenges and recent developments. EC Nutrition, 8: 33-34.

Rajendran, P., Nandakumar, N., Rengarajan, T., Palaniswami, R., Gnanadhas, E.N., Lakshminarasaiah, U. and Nishigaki, I. (2014) Antioxidants and human diseases. Clinica Chimica Acta. 436: 332-347.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology & Medicine, 26: 1231-7.

Rouseff, R. and Perez-Cacho, P.R. (2007) Citrus flavour. Flavours and Fragrances. 1st edn. Springer, Berlin, Heidelberg. Pp. 117-134.

Sarrou, E., Chatzopoulou, P., Dimassi-Theriou, K. and Therios, I. (2013) Volatile constituents and antioxidant activity of peel, flowers and leaf oils of Citrus aurantium L. growing in Greece. Molecules, 18: 10639-10647.

Schaich, K.M., Tian, X. and Xie, J. (2015) Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: a critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. Journal of Functional Foods, 14: 111-125.

Shahidi, F. and Ambigaipalan, P. (2015) Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects–A review. Journal of Functional Foods, 18: 820-897.

Shukla, S., Mehta, A., Bajpai, V.K. and Shukla, S. (2009) In vitro antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of Stevia rebaudiana Bert. Food and Chemical Toxicology, 47: 2338-2343.

Singh, R., Chidambara Murthy, K. and Jayaprakasha, G. (2002) Studies on the antioxidant activity of pomegranate (Punica granatum) peel and seed extracts using in vitro models. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50: 81-86.

Soares, A.A., De Souza, C.G.M., Daniel, F.M., Ferrari, G.P., Da Costa, S.M.G. and Peralta, R.M. (2009) Antioxidant activity and total phenolic content of Agaricus brasiliensis (Agaricus blazei Murril) in two stages of maturity. Food chemistry, 112: 775-781.

Tawaha, K., Alali, F.Q., Gharaibeh, M., Mohammad, M. and El-Elimat, T. (2007) Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. Food Chemistry, 104: 1372-1378.

Trabelsi, D., Ammar, A., Bouabdallah, F. and Zagrouba, F. (2014) Antioxidant and antimicrobial activities of essential oils and. methanolic extracts of Tunisian Citrus aurantium L. Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology, 8: 18-27.

Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M. and Mazur, M. (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chemico-Biological Interactions. 160: 1-40.

Verzelloni, E., Tagliazucchi, D. and Conte, A. (2007) Relationship between the antioxidant properties and the phenolic and flavonoid content in traditional balsamic vinegar. Food Chemistry, 105: 564-571.

Weidinger, A. and Kozlov, A.V. (2015) Biological activities of reactive oxygen and nitrogen species: oxidative stress versus signal transduction. Biomolecules, 5: 472-484.

Yildirim, A., Mavi, A. and Kara, A.A. (2001a) Determination of antioxidant and antimicrobial activities of Rumex crispus L. extracts. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49: 4083-4089.

Yildirim, A., Mavi, A. and Kara, A.A. (2001b) Determination of antioxidant and antimicrobial activities of Rumex crispus L. extracts. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49:4083-4089.

Zhang, Y.J., Gan, R.Y., Li, S., Zhou, Y., Li, A.N., Xu, D.P. and Li, H.B. (2015) Antioxidant phytochemicals for the prevention and treatment of chronic diseases. Molecules, 20: 21138-21156.

Zia-ur-Rehman (2006) Citrus peel extract-A natural source of antioxidant. Food Chemistry, 99: 450-454.

and antioxidant activity of sour orange (*Citrus aurantium*) hydroethanolic and methanolic peel extract

M. Mayeli[1], H. Tajik[2], T. Mehdizadeh[3]*, F. Esmaeli[1]

Received:2017.5.2
Accepted:2018.4.29

Abstract

Oxidation reactions endanger human health due to the production of free radicals. Additionally, by creating some compounds, reduce sensory and nutritional quality of food. Recently, more and more efforts are been made to find natural and effective herbal antioxidants. In this study, total phenolic and antioxidant activity of sour orange (*Citrus aurantium*) hydroethanolic and methanolic peel extract in compare with Butylated hydroxytoluene (BHT) as a standard antioxidant examined. Total phenolic content of hydro-ethanolic and methanolic peel extract was59.38±0.82 and 50.96±0.51 mg Gallic acid/g extract, respectively. In testing percent of inhibition of free radicals (DPPH and ABTS), the extracts showed a significant inhibitory effect but there is a significant difference, between hydro-ethanolic and methanolic extract in ABTS test. Both extract also showed reducing effect. Our findings showed that orange peel extract had relatively good antioxidant activity in compare to standard antioxidant (BHT), so it has proposed as a potential source of natural antioxidants in food and pharmaceutical industries.

Keyword: Fruit peel, Natural extract, Oxidation, Total phenol

1- MSc in Food hygiene and Quality control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmai, Iran

2-Professor, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia, Iran

3-Assistant Professor, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia, Iran

*(Corresponding Author: t.mehdizadeh@urmia.ac.ir)