

Research Paper

Evaluation and Comparison of the Antioxidant Activity of Extractable Polyphenols and Non-extractable Polyphenols of Sour Orange Peel



Amir Siahpoosh^{1,2}, *Zahra Rezaei¹

1. Medicinal Plant Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.
2. Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.



Citation Siahpoosh A, Rezaei Z. Evaluation and Comparison of the Antioxidant Activity of Extractable Polyphenols and Non-extractable Polyphenols of Sour Orange Peel. *Jundishapur Journal of Medical Sciences*. 2022; 20(6):518-527. <https://doi.org/10.32598/JSMJ.20.6.2133>

doi <https://doi.org/10.32598/JSMJ.20.6.2133>



Received: 29 Jul 2021
Accepted: 02 Oct 2021
Available Online: 21 Jan 2022

Keywords:
Sour orange, Extractable polyphenol, Non-extractable polyphenol, ABTS+DPPH

ABSTRACT

Background and Objectives Research on food polyphenols has experienced a huge development during the last century. Most studies on polyphenolic compounds have focused on extractable polyphenols (EPP). However, an important polyphenolic fraction is ignored (Non-Extractable polyphenols (NEPP)) because they are trapped in the corresponding extraction residues. In this study, the antioxidant EPP and NEPP of sour orange peel, extracted by aqueous solvent and acid hydrolysis (with two different solvent systems) respectively, are evaluated and compared.

Methods Antioxidant activity was evaluated by four tests of radical inhibition of 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2, 2-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), ferric reducing antioxidant power (FRAP) and iron chelating. The amount of polyphenolic compounds, flavonoids, oligomeric proanthocyanidins, and flavanones were respectively determined by folin-ciocalteu, Aluminium chloride (AlCl₃) and Ultraviolet-visible spectroscopy (UV-visible). Also, the anti-lipid peroxidation effect in rat liver was measured.

Results The results of antioxidant analysis showed that NEPP with methanol/Sulfuric Acid Solvent had the highest level of antioxidant activity in sour orange peel. It can be due to the high polyphenolic compounds in this extraction compared to the others.

Conclusion All extracts had antioxidant activity and can be suggested as a potential natural source in food and pharmaceutical industries.

*** Corresponding Author:**

Zahra Rezaei, PhD.

Address: Medicinal Plants Research Center, Faculty of Pharmacy, Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

Tel: +98 (936) 7151929

E-Mail: zahra.rze22@gmail.com

مقاله پژوهشی

بررسی و مقایسه میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانتی پلی‌فنل‌های قابل استخراج و غیر قابل استخراج پوست میوه نارنج

امیر سیاهپوش^{۱،*}، زهرا رضایی^۱

۱. مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.
 ۲. گروه فارماکوتوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.

چکیده

تاریخ دریافت: ۰۷ مرداد ۱۴۰۰

تاریخ پذیرش: ۱۰ مهر ۱۴۰۰

تاریخ انتشار: ۰۱ بهمن ۱۴۰۰

زمینه و هدف: در طول قرن گذشته، تحقیقات در مورد پلی‌فنل‌های غذایی تحول عظیمی داشته است. اکثر مطالعات انجام شده بر روی قسمت‌های قابل استخراج متمرکز شده. با این حال یک بخش مهم از آن‌ها به دلیل اینکه در باقی‌مانده استخراج قرار گرفته‌اند (پلی‌فنل‌های غیر قابل استخراج)، نادیده گرفته می‌شوند. در این مطالعه به بررسی و مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانتی پلی‌فنل‌های قابل استخراج و غیر قابل استخراج پوست میوه نارنج که به ترتیب با حلال آبی-آلی و هیدرولیز اسیدی استخراج شده‌اند، پرداخته می‌شود.

روش بررسی: فعالیت آنتی‌اکسیدانتی با چهار آزمون مهار رادیکال FRAP، ABTS، DPPH و شلات‌کنندگی آهن ارزیابی شد. میزان ترکیبات پلی‌فنلی، فلاونوئیدی، پروآنتوسیانیدین‌های الیگومریک و فلاونون‌ها به ترتیب با روش فولین سیکالتو، کلرید آلومینیوم و دستگاه اسپکتروفتومتر UV-visible تعیین مقدار شدند. همچنین میزان اثرات ضد لیپید پراکسیداسیون کبد موش صحرایی اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: نتایج تست‌های آنتی‌اکسیدانتی نشان داد که در پوست نارنج عصاره پلی‌فنلی غیر قابل استخراج که با حلال متانول/سولفوریک اسید استخراج شده است، بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانتی را دارد که می‌تواند به دلیل بالا بودن ترکیبات پلی‌فنلی در این عصاره نسبت به عصاره‌های دیگر باشد.

نتیجه‌گیری: همه عصاره‌ها دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانتی نسبتاً مناسبی هستند و می‌توانند به عنوان یک منبع بالقوه طبیعی در صنایع غذایی و دارویی پیشنهاد شوند.

کلیدواژه‌ها:

نارنج، پلی‌فنل قابل استخراج، پلی‌فنل غیر قابل استخراج، مهارکنندگی رادیکال ABTS+DPPH

مقدمه

آن‌ها پلی‌فنل‌های غیر قابل استخراج^۳ هستند که حتی می‌توانند بخش عمده‌ای از کل محتویات پلی‌فنلی مواد غذایی را تشکیل دهند. به این دلیل که پلی‌فنل‌های غیر قابل استخراج پس از استخراج پلی‌فنل‌های قابل استخراج در باقی‌مانده‌های استخراج مربوطه باقی مانده و با حلال‌های آبی یا آلی قابل استخراج نیست [۳]. مطالعات اخیر نشان داده است که پلی‌فنل‌های غیر قابل استخراج در گیاهانی مانند میوه‌ها، سبزیجات، غلات و آجیل‌ها به‌وفور یافت می‌شود و دارای فعالیت‌های بیولوژیکی قابل توجهی، مانند آنتی‌اکسیدانت، ضدالتهاب و محافظت از دستگاه گوارش است [۳-۵]. کریستل و همکارانش با بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانتی ترکیبات فنلی قابل استخراج و غیر قابل استخراج در عصاره آلو،

پلی‌فنل‌ها^۱ گروه بزرگی از ترکیبات گیاهی هستند که دارای گروه هیدروکسیل و حلقه فنلی بوده و امروزه به دلیل فراوانی در غذا، داروهای گیاهی و پیشگیری بالقوه از بیماری‌های مزمن از جمله سرطان، بیماری‌های قلبی-عروقی، عفونت‌ها، بیماری‌های اعصاب و روان و غیره شناخته شده‌اند [۱]. این عملکرد پلی‌فنل‌ها عمدتاً مبتنی بر مطالعاتی است که از ترکیبات خاص یا عصاره‌های پلی‌فنلیک (پلی‌فنل‌های قابل استخراج^۲) که با حلال آلی یا آبی-آلی از گیاهان مورد نظر استخراج شده‌اند، به دست می‌آید [۲]. با این حال یک بخش مهم از پلی‌فنل‌ها نادیده گرفته می‌شوند که

1. Polyphenols
2. Extractable polyphenols (EPP)

3. Non-Extractable polyphenols (NEPP)

* نویسنده مسئول:

دکتر زهرا رضایی

نشانی: اهواز، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی

تلفن: ۷۱۵۱۹۲۹ (۹۳۶) ۹۸+

رایانامه: zahra.rze22@gmail.com

ادریری و همکاران نیز نشان داد که اسانس پوست نارنج، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به برگ دارد [۲۱].

تاکنون مطالعه‌ای جهت بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پلی‌فنل‌های غیر قابل استخراج بر پوست میوه نارنج انجام نشده. بنابراین مطالعه اولیه ما، پروفایل پلی‌فنل‌های غیر قابل استخراج به همراه فعالیت بالقوه آنتی‌اکسیدانی را که تحت روش هیدرولیز اسیدی استخراج شده، نشان می‌دهد. همچنین علاوه بر مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی پلی‌فنل‌های غیر قابل و قابل استخراج با یکدیگر، عملکرد دو سیستم حلالی که برای استخراج پلی‌فنل‌های غیر قابل استخراج به کار گرفته شده، مقایسه می‌شود.

روش بررسی

مواد شیمیایی

کلرید آلومینیوم^{۱۲} ۶ آب و سدیم استات^{۱۳} بی‌آب مورد استفاده در این تحقیق، از شرکت فلوکای سوئیس، سدیم استات ۳ آب، تیوباربیتوریک اسید^{۱۴}، تری کلرواستیک اسید^{۱۵}، تانیک اسید از شرکت مرک آلمان، دی پتاسیم هیدروژن فسفات^{۱۶}، واکنشر فولین سیکالتو^{۱۷}، اسید آسکوربیک^{۱۸} و مونوپتاسیم دی هیدروژن فسفات^{۱۹} آهن (نوع III) کلرید از شرکت سیگمای آمریکا و روتین، سیانیدین کلرید^{۲۰}، اتیلن دی آمین تترا استیک اسید^{۲۱} از شرکت روت آلمان با خلوص بالا تهیه شد.

آماده‌سازی نمونه

در این تحقیق، پوست میوه نارنج، از استان فارس (شیراز) در اواخر پاییز از بازار محلی تهیه و توسط بخش علوم باغبانی دانشگاه اهواز با کد هر بارיום A2125001010FP تأیید و مورد آزمایش قرار گرفت. برای تهیه عصاره‌ها، پوست نارنج در سایه خشک، سپس آسیاب شد و از الک با اندازه مش ۶۰ گذرانده شد و در فریزر (دمای منهای ۴ درجه سانتی‌گراد)، تا زمان شروع آزمایش‌ها نگهداری شد.

پلی‌فنل‌های قابل استخراج

این روش مطابق روش جیمینز و همکارانش در سال ۲۰۰۸ با کمی تغییرات انجام شد [۲۲]. به منظور پلی‌فنل‌های قابل استخراج، به ۳۰ گرم پودر پوست نمونه توزین شده، ۵۰۰ میلی‌لیتر

نشان دادند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنلی غیر قابل استخراج بیشتر است [۶]. پلی‌فنل‌های غیر قابل استخراج را می‌توان به دو بخش تقسیم کرد: پلی‌فنل‌های هیدرولیز شونده یا تانن‌ها که وزن مولکولی کمی دارند و به‌شدت با پلی‌ساکاریدها یا پروتئین‌ها مرتبط هستند و پروآنتوسیانیدین‌های پلیمری با وزن مولکولی بالا [۷]. برخلاف پلی‌فنل‌های قابل استخراج، پلی‌فنل‌های غیر قابل استخراج قبل از اینکه بتواند با یک حلال آلی استخراج شود، باید نوعی هیدرولیز، از جمله هیدرولیز آنزیمی، قلیایی یا اسیدی را تجربه کند [۸]. پنگ، لی و همکارانش نشان دادند که هیدرولیز اسیدی یک روش کارآمدتر از هیدرولیز قلیایی برای آزاد کردن آنتی‌اکسیدان‌ها از پوست دانه سویای سیاه است [۹]. علاوه بر این چنگ و همکاران نشان دادند که عملکرد پلی‌فنل‌های غیر قابل استخراج به‌دست‌آمده با هیدرولیز قلیایی بسیار بیشتر از عملکرد به‌دست‌آمده با هیدرولیز اسیدی است [۱۰].

بنابراین تأثیر روش‌های استخراج بر پلی‌فنل‌های غیر قابل استخراج شده متفاوت بوده و باید به طور جدی هنگام ارزیابی پلی‌فنل‌های غیر قابل استخراج در گیاهان مورد توجه قرار گیرد. مرکبات، از جمله گیاهانی هستند که حاوی درصد بالایی از پلی‌فنل‌های مختلف هستند [۱۱]. علاوه بر این، با توجه به پرمصرف بودن نارنج در کشور، این گیاه برای تحقیق در نظر گرفته شد. میوه نارنج^۴ متعلق به خانواده مرکبات^۵، معمولاً با عنوان نارنج ترش و تلخ شناخته می‌شود. قسمت‌هایی که اکثراً مصرف دارویی دارد شامل پوست، شکوفه و برگ‌های این گیاه است [۱۲]. مهم‌ترین ترکیبات نارنج، فنتیل آمین آلکالوئید، اکتاپامین، سینفرین، تیرامین و غیره است. نارنج سرشار از ویتامین‌های C، A، B1 و فلاونوئیدها^۶ (نارنژین^۷، هسپریدین^۸) و روغن‌های فرار است [۱۳، ۱۴]. در پوست آن فلاونوئیدهایی از جمله فلاونون^{۱۰}، نارنژین، پلی‌متوکسی فلاونون، هسپریدین^{۱۱} و ایزوهسپریدین وجود دارد [۱۳، ۱۵، ۱۶]. در طول روند آبگیری مرکبات، هزاران تن محصول فرعی تولید می‌شود. این محصولات، به دلیل دارا بودن محتوای بالایی از فیبر، می‌توانند یک منبع غنی از فیبر در رژیم غذایی باشند. از طرفی مطالعات حاکی از آن است که نه تنها به خاطر محتوای فیبر، بلکه به دلیل ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بالا که مرتبط با ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی آن‌هاست، می‌توانند قابل توجه باشند [۱۷-۱۹]. مطالعات متعددی در مورد خواص و ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی پوست نارنج انجام شده است. از جمله ترابلسی و همکاران نشان دادند که عصاره متانولی پوست نارنج بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را در مقایسه با اسانس دارد [۲۰].

12. Aluminum chloride (AlCl₃)
13. Sodium acetate
14. Thiobarbituric acid
15. Trichloro acetic acid (TCA)
16. Dipotassium hydrogen phosphate
17. Folin-Ciocalteu reagent
18. Ascorbic acid
19. Monopotassium dihydrogen phosphate
20. Cyanidin chloride
21. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)

4. Citrus aurantium L.
5. Rutaceae
6. sour orange, bitter orange
7. Flavonoids
8. Naringin
9. Hesperidin
10. Flavanon
11. Hesperidin

حجمی-حجمی) شست‌وشو داده شد. برای محلول سانتیفریوژ تکرار شد و محلول فوقانی به محلول قبلی اضافه شد. عصاره استخراج پلی‌فنل‌های غیر قابل استخراج با حلال n-بوتانول/هیدروکلریک اسید به‌دست‌آمده، با سود ۶ مولار به $\text{pH}=5/5$ رسانده شد. بعد از خشک شدن به منظور انجام تست‌های آنتی‌اکسیدانتی، در فریزر قرار داده شد [۲۲].

اندازه‌گیری کل محتویات پلی‌فنلی

محتویات پلی‌فنلی عصاره‌ها به روش فولین-سیکالتو اندازه‌گیری شد. ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره با ۲/۵ میلی‌لیتر واکنشگر فولین سیکالتو (رقیق شده با آب به نسبت ۱ به ۱۰) مخلوط شد. پس از ۵ دقیقه، ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷/۵ درصد افزوده شد. محلول حاصل، ۲ ساعت در شرایط تاریکی و دمای اتاق نگهداری، سپس جذب در طول موج ۷۶۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده و نتایج بر اساس میلی‌گرم اسید تانیک در گرم عصاره بیان شد [۲۳].

اندازه‌گیری مقدار فلاونوئیدها

مقادیر ترکیبات فلاونوئید عصاره‌ها به روش آلومینیم کلرید اندازه‌گیری شد. ۲ میلی‌لیتر عصاره، با ۲ میلی‌لیتر محلول آلومینیوم کلراید ۶ آبه ۲ درصد مخلوط شد. پس از ۱۵ دقیقه نگهداری در دمای اتاق، جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۳۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر^{۲۴} خوانده شد [۲۴]. مقادیر فلاونوئیدها بر اساس میلی‌گرم روتین در گرم عصاره محاسبه و گزارش شد.

اندازه‌گیری مقدار پروآنتوسیانیدین‌های الیگومریک

۰/۵ میلی‌لیتر عصاره، با ۶ میلی‌لیتر محلول اسید کلریک $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (۹۵:۵) و ۲۰۰ میکرولیتر از محلول ۰/۲ درصد در محلول اسید کلریک مولار مخلوط و پس از هم زدن، در مخلوط کاملاً محکم بسته شد و به مدت ۴۰ دقیقه در دمای 2 ± 95 درجه سانتی‌گراد در بن ماری حرارت داده شد. پس از سرد شدن، جذب در طول موج ۵۵۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد [۲۵]. مقادیر پروآنتوسیانیدین‌های الیگومریک هر عصاره بر اساس میلی‌گرم سیانیدین کلراید در گرم عصاره بیان شد.

اندازه‌گیری مقدار فلاوانون‌ها

در این روش از \pm نارتزین به عنوان استاندارد استفاده شد. ۱ میلی‌لیتر عصاره، با ۲ میلی‌لیتر از محلول ۲ و ۴ دی‌نیتروفنیل هیدرازین ۱ درصد و ۲ میلی‌لیتر متانول مخلوط شد و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ دقیقه حرارت داده شد، پس از خنک شدن محلول در دمای اتاق، آن را با ۱ میلی‌لیتر از محلول

حلال متانول / آب، (۵۰:۵۰ حجمی-حجمی) که با اسید کلریک استوک ۱۲/۶ مولار به $\text{pH}=2$ رسیده بود، اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق هم زده شد. سپس ۵ دقیقه با ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتیفریوژ و محلول فوقانی جدا شد. به باقی‌مانده ۵۰۰ میلی‌لیتر حلال استون / آب، (۳۰:۷۰ حجمی-حجمی) افزوده شد و مجدداً هم زدن و سانتیفریوژ تکرار و محلول فوقانی جدا شد. عصاره متانولی / آبی و استونی / آبی با یکدیگر مخلوط، سپس تغلیظ و خشک شده و تا زمان اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی در فریزر نگهداری شد.

پلی‌فنل‌های غیر قابل استخراج

باقی‌مانده استخراج (پودرهای جامد باقی‌مانده از مراحل پلی‌فنل‌های قابل استخراج) به دو قسمت تقسیم شد و با روش هیدرولیز اسیدی با دو سیستم حلال مختلف به منظور استخراج پلی‌فنل‌های غیر قابل استخراج مورد استفاده قرار گرفت [۲۲].

پلی‌فنل‌های غیر قابل استخراج با حلال متانول / سولفوریک اسید غلیظ

نصف پودر باقی‌مانده از مرحله پلی‌فنل‌های قابل استخراج با ۲۵۰ میلی‌لیتر متانول و ۲۵ میلی‌لیتر پلی‌فنل‌های غیر قابل استخراج با حلال متانول / سولفوریک اسید غلیظ (۱:۱۰ حجمی-حجمی) در بالن ترکیب شد و به مدت ۳ روز و هر روز ۶ ساعت در بن ماری با دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد همراه با هم زدن قرار داده شد. سپس ۵ دقیقه با دور ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتیفریوژ شد. محلول فوقانی جدا و پودرهای باقی‌مانده ۲ بار با آب مقطر شست‌وشو داده شدند. سانتیفریوژ تکرار شد و محلول فوقانی جمع‌آوری و با محلول قبلی ترکیب شد. عصاره پلی‌فنل‌های غیر قابل استخراج با حلال n-بوتانول^{۲۲} / هیدروکلریک اسید به‌دست‌آمده با سود ۶ مولار به $\text{pH}=5/5$ رسانده شد و بعد از خشک شدن به منظور انجام تست‌های آنتی‌اکسیدانتی، در فریزر قرار داده شد [۲۲].

استخراج پلی‌فنل‌های غیر قابل استخراج با حلال n-بوتانول / هیدروکلریک اسید

نصف دیگر پودر باقی‌مانده از پلی‌فنل‌های قابل استخراج با ۲۸۵ میلی‌لیتر بوتانول، ۱۵ میلی‌لیتر اسید کلریک استوک ۳۷ درصد (۱۲/۶ مولار) و ۲/۱ گرم آهن ۳ کلراید^{۲۳} (گرم ۰/۷:۰/۵) در بالن ترکیب شد و در حمام آب گرم دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت قرار داده شد. پس از خنک شدن، از صافی عبور داده شد و محلول به مدت ۵ دقیقه با ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتیفریوژ و محلول فوقانی جدا شد و پودر به جا مانده ۲ بار با حلال بوتانول / اسید کلریک (۹۵:۵)

24. Spectrophotometry
25. Chloric acid (HClO_3)

22. n-Butanol
23. FeCl_3

$$2. \text{scavenging effect (\%)} = \left[1 - \frac{A_{\text{sample}} - A_{\text{sample blank}}}{A_{\text{control}}} \right] \times 100$$

مقادیر IC_{50} بر حسب استاندارد ترولوکس محاسبه و دقیقه ۶ گزارش شد [۳۱].

اندازه‌گیری میزان شلات‌کنندگی آهن

یک میلی‌لیتر از عصاره با $3/7$ میلی‌لیتر متانول و 100 میکرولیتر $FeCl_3$ ، 2 میلی‌مولار، مخلوط شد و 5 دقیقه در دمای 37 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس 200 میکرولیتر فروزین 5 میلی‌مولار به آن افزوده شد و به مدت 20 دقیقه در دمای اتاق نگه داشته شد. جذب مخلوط حاصل در طول موج 562 نانومتر خوانده شد. فعالیت شلات‌کنندگی Fe^{2+} با استفاده از فرمول شماره ۳ محاسبه شد.

$$3. \text{Chelation activity (\%)} = \left[1 - \frac{(A_0 - A_s)}{A_0} \right] \times 100$$

که A_0 جذب کنترل و A_s جذب عصاره است. مقادیر IC_{50} بر حسب استاندارد اتیلن دی‌آمین تترااستیک اسید گزارش شد [۳۲].

اندازه‌گیری اثر ضدلیپید پراکسیداسیون^{۲۸}

یک گرم بافت تازه (کبد) موش صحرایی را در 5 میلی‌لیتر بافر فسفات $0/05$ مولار هموزنایز و توسط گاز استریل صاف شد. $0/3$ میلی‌لیتر از محلول صاف شده بافت را برداشته و به آن $1/9$ میلی‌لیتر بافر فسفات، 1 میلی‌لیتر محلول ویتامین سی $0/2$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، 1 سی‌سی سولفات آهن بدون آب $0/2$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و $0/3$ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره اضافه شد و در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 1 ساعت انکوبه شد. پس از انکوباسیون 5 سی‌سی تری کلرواستیک اسید 30 درصد اضافه شد و رسوب پروتئین به وسیله سانتریفیوژ با دور 4500 rpm به مدت 10 دقیقه جدا شد. به 1 سی‌سی از محلول فوقانی، 1 سی‌سی تیوباریتوریک اسید 1 درصد اضافه شد و در حمام آب جوش به مدت 40 دقیقه جوشانده شد. سپس جذب در 532 نانومتر خوانده شد. برای مقایسه عصاره‌ها از نظر قدرت آنتی‌اکسیدانتی از IC_{50} استفاده شد [۳۳].

تجزیه و تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS ورژن ۲۶، برای مقایسه معناداری میانگین‌ها از آنالیز واریانس یک‌طرفه و تست دانکن و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

27. Half maximal inhibitory concentration (IC_{50})

28. Anti-lipid peroxidation (LP)

پتاسیم هیدروکساید در متانول 70 درصد ($1 v/w$ درصد) مخلوط و به مدت 5 دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. سپس 1 میلی‌لیتر از محلول با 5 میلی‌لیتر متانول مخلوط شد و به مدت 10 دقیقه با 1000 دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از آن محلول فوقانی جمع‌آوری و با متانول به حجم 25 میلی‌لیتر رسانده و جذب آن در طول موج 495 نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد [۲۶]. مقادیر فلاوانون هر عصاره بر اساس میلی‌گرم نارنژین در یک گرم عصاره گزارش شد.

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانت به وسیله مهار رادیکال DPPH

به منظور اندازه‌گیری میزان مهار رادیکال DPPH، $0/1$ میلی‌لیتر از عصاره با $3/9$ میلی‌لیتر محلول DPPH استوک 25 میلی‌گرم بر لیتر مخلوط شد و به مدت 30 دقیقه در تاریکی و دمای محیط نگهداری شد. جذب در دقیقه 0 و 30 ، در طول موج 515 نانومتر خوانده شد [۲۷-۲۹]. توانایی مهار رادیکال DPPH با استفاده از فرمول شماره ۱ محاسبه شد.

$$1. \text{scavenging effect (\%)} = \left[1 - \frac{A_{\text{sample}} - A_{\text{sample blank}}}{A_{\text{control}}} \right] \times 100$$

که A_{control} جذب نمونه کنترل (محلول DPPH بدون نمونه)، A_{sample} جذب نمونه (محلول DPPH به همراه نمونه) و $A_{\text{sample blank}}$ جذب نمونه به تنهایی (نمونه بدون محلول DPPH) بود. سپس مقادیر IC_{50} بر حسب استاندارد روتین محاسبه و گزارش شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی احیای آهن (FRAP^{۳۴})

100 میکرولیتر عصاره با 3 میلی‌لیتر معرف واکنشگر FRAP (مخلوط TPTZ 10 مولار در استخراج پلی‌فنل‌های غیر قابل استخراج با حلال n-بوتانول/هیدروکلریک اسید 40 میلی‌مولار، $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 20 مولار و بافر استات $0/3$ مولار به نسبت $10:1:1$ ، $pH=3/6$) و 300 میکرولیتر آب مقطر مخلوط شد. جذب پس از 30 دقیقه در طول موج 593 نانومتر خوانده شد. به منظور ارائه نتایج از پارامتر EC_1 (غلظتی از آنتی‌اکسیدان است که اثرات کاهشی برابر 1 میلی‌مول بر لیتر $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ را دارد) استفاده شد. برای محاسبه این پارامتر از منحنی استاندارد و معادله خط به دست آمده از $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ استفاده شد [۲۸-۳۰].

ارزیابی میزان 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. 30 میکرولیتر عصاره به 3 میلی‌لیتر محلول رادیکال $ABTS^+$ اضافه شد و پس از انتقال به کوت، جذب آن در زمان‌های صفر تا 6 دقیقه، هر 2 دقیقه خوانده شد. توانایی مهار رادیکال $ABTS$ با استفاده از فرمول شماره ۲ محاسبه شد.

26. Ferric reducing ability of plasma (FRAP)

یافته‌ها

مختلف به کار گرفته شد [۹]. پلی‌فنل‌های غیر قابل استخراج با حلال متانول/سولفوریک اسید غلیظ بازده ۶/۳۶ درصد و استخراج پلی‌فنل‌های غیر قابل استخراج با حلال n-بوتانول/هیدروکلریک اسید با حلال بوتانول/هیدروکلریک اسید بازده ۱۵/۲ درصد داشت.

با توجه به نتایج به دست آمده از تعیین مقدار ترکیبات فنلی (جدول شماره ۱)، به طور کلی بیشترین مقدار ترکیبات فنلی مربوط به عصاره پلی‌فنل‌های غیر قابل استخراج با حلال متانول/سولفوریک اسید غلیظ بود (۱۴۸±۷۹/۵۳ میلی‌گرم تانیک اسید بر گرم عصاره خشک). سایر ترکیبات در عصاره پلی‌فنل‌های قابل استخراج بیشترین مقدار را داشت. مقایسه محتویات فنلی عصاره‌های پلی‌فنل‌های غیر قابل استخراج با حلال متانول/سولفوریک اسید غلیظ، استخراج پلی‌فنل‌های غیر قابل استخراج با حلال n-بوتانول/هیدروکلریک اسید در پوست نارنج نشان داد که سیستم حلال متانول/سولفوریک اسید در جداسازی محتویات فنلی بهتر از حلال n-بوتانول/هیدروکلریک اسید عمل کرده است (P<۰/۰۱). فراوانی نسبی ترکیبات پلی‌فنل‌های غیر قابل استخراج با حلال متانول/سولفوریک اسید غلیظ در مقابل هیدروکلریک اسید در پوست نارنج با یافته‌های مطالعات قبلی در میوه‌های دیگر از جمله مطالعه‌ای که روی ضایعات سیب و پوست گلابی انجام شد سازگار بود [۳۵، ۳۶].

در سیستم‌های پیچیده، مانند غذا و فرآورده‌های آن، مکانیسم‌های مختلفی به فرایند اکسیداسیون کمک می‌کنند. بنابراین برای توصیف یک عصاره لازم است انواع روش‌های آنالیز فعالیت آنتی‌اکسیدانتی به کار گرفته شود. با توجه به نتایج به دست آمده حاصل از اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی در جدول شماره ۱ هر ۳ عصاره مشخص شد که فعالیت آنتی‌اکسیدانتی عصاره پلی‌فنل‌های غیر قابل استخراج با حلال متانول/سولفوریک اسید غلیظ به روش DPPH، ABTS و شلات‌کنندگی آن‌ها از دیگر عصاره‌ها بیشتر است. اما این نتایج فقط در آنالیز DPPH و ABTS معنادار بود (P<۰/۰۱). نتایج سنجش مهار رادیکال ABTS در مطالعه‌ای

از ۳۰ گرم پودر پوست نارنج، ۶/۲۶ گرم عصاره پلی‌فنل‌های قابل استخراج و از تقسیم پودر باقی‌مانده حاصل از پلی‌فنل‌های قابل استخراج، ۲/۰۹ گرم عصاره پلی‌فنل‌های غیر قابل استخراج با حلال n-بوتانول/۲۹/۲۹ استخراج پلی‌فنل‌های غیر قابل استخراج با حلال n-بوتانول/هیدروکلریک اسید و ۴/۵۶ گرم عصاره استخراج پلی‌فنل‌های غیر قابل استخراج با حلال n-بوتانول/هیدروکلریک اسید شد. نتایج حاصل از تعیین مقدار ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی، پروآنتوسیانیدین‌های الیگومریک و فلاوانون‌ها در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. در این تحقیق، ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی هر ۳ عصاره با روش DPPH، ABTS، FRAP و شلات‌کنندگی آهن اندازه‌گیری شد. نتایج در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. میزان اثر ضدپراکسیداسیون لیپید عصاره پلی‌فنل‌های غیر قابل استخراج با حلال متانول/سولفوریک اسید غلیظ، استخراج پلی‌فنل‌های غیر قابل استخراج با حلال n-بوتانول/هیدروکلریک اسید و پلی‌فنل‌های قابل استخراج به صورت IC₅₀ به ترتیب ۳۶/۱۷، ۱۰/۴۹ و ۲۴/۸۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش شد.

بحث

برای پلی‌فنل‌های قابل استخراج در مطالعات مختلف از سیستم‌های حلالی مختلفی مانند اتانول / آب، متانول / آب، استون / آب و اتانول ۵۰ درصد استفاده شده است که میزان عصاره به دست آمده متفاوت است [۲۲، ۳۴، ۳۵]. بر اساس مطالعات، به منظور افزایش بازده استخراج پلی‌فنل‌ها، از حلال متانول / آب و استون / آب استفاده شد (بازده پلی‌فنل‌های قابل استخراج، ۲۰/۸۶ درصد بود) [۸]. برای جداسازی پلی‌فنل‌های غیر قابل استخراج، روش‌های مختلفی از جمله هیدرولیز اسیدی، بازی و آنزیمی وجود دارد که در این مطالعه روش هیدرولیز اسیدی با دو سیستم حلال

29. n-Butanol

جدول ۱. نتایج تعیین مقدار ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی، پروآنتوسیانیدین‌های الیگومریک و فلاوانون‌های عصاره‌ها

| میانگین ± انحراف معیار | | نوع عصاره | |
|------------------------|----------------------------------|---------------|----------------------|
| فلاوانون‌ها**** | پروآنتوسیانیدین‌های الیگومریک*** | ترکیبات فنلی* | ترکیبات فلاونوئیدی** |
| ۳/۰۱±۰/۰۵ | ۳/۴۶±۰/۰۶ | ۱۰۴/۲۳±۰/۰۶ | ۱۲/۴۶±۰/۲۳ |
| ۲۷/۰±۰/۱۳ | ۳۷/۲۹±۰/۰۷ | ۱۴۸/۷۹±۰/۵۳ | ۹/۰۲±۰/۰۲ |
| ۳۷/۸۰±۰/۱ | ۳۳/۱۶±۰/۰۴ | ۱۳۸/۲۸±۰/۲۵ | ۶/۱۸±۰/۱۶ |

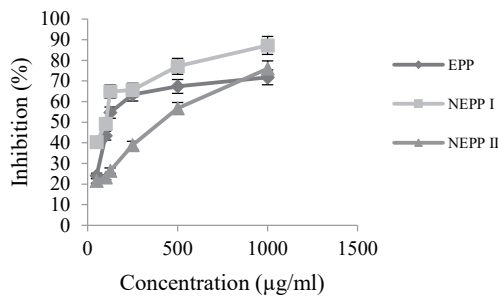
* بر حسب میلی‌گرم معادل تانیک اسید در گرم عصاره خشک (P<۰/۰۱)

** بر حسب میلی‌گرم معادل روتین در گرم عصاره خشک (P<۰/۰۱)

*** بر حسب میلی‌گرم معادل سیانیدین کلراید در گرم عصاره خشک (P<۰/۰۱، P>۰/۰۵)

**** بر حسب میلی‌گرم معادل نارنژین در گرم عصاره خشک (P<۰/۰۵، P>۰/۰۵)

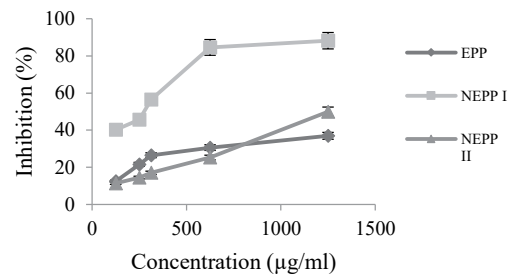
a تفاوت معناداری بین سولفوریک اسید غلیظ و هیدروکلریک اسید در مقدار ترکیبات پروآنتوسیانیدین الیگومریک وجود نداشت.



A) ABTS

| Group 1 | Group2 | Meandiff | Sig (p-value)* |
|---------|---------|----------|----------------|
| EPP | NEPP I | 15.013 | 0.001 |
| EPP | NEPP II | 3.623 | 0.0028 |
| NEPP I | NEPP II | -11.39 | 0.001 |

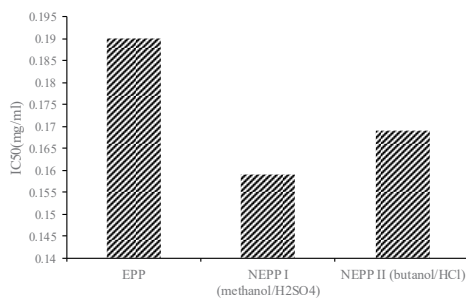
* p<0.05 تفاوت معنا دار است



B) DPPH

| Group 1 | Group2 | Meandiff | Sig (p-value)* |
|---------|---------|----------|----------------|
| EPP | NEPP I | 17.6733 | 0.001 |
| EPP | NEPP II | 6.4233 | 0.001 |
| NEPP I | NEPP II | -11.25 | 0.001 |

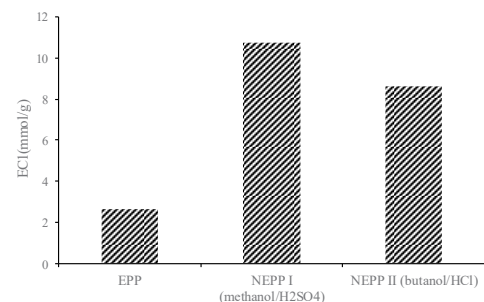
* p<0.05 تفاوت معنا دار است



C) Iron Chelation activity

| Group 1 | Group2 | Meandiff | Sig (p-value)* |
|---------|---------|----------|----------------|
| EPP | NEPP I | 5.01 | 0.177 |
| EPP | NEPP II | 1.536 | 0.794 |
| NEPP I | NEPP II | -3.473 | 0.385 |

* p<0.05 تفاوت معنا دار است



D) FRAP

| Group 1 | Group2 | Meandiff | Sig (p-value)* |
|---------|---------|----------|----------------|
| EPP | NEPP I | -8.09 | 0.001 |
| EPP | NEPP II | -5.54 | 0.001 |
| NEPP I | NEPP II | 2.14 | 0.001 |

* p<0.05 تفاوت معنا دار است

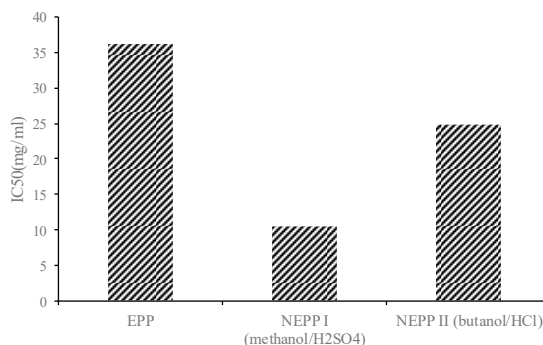
جندی شاپور

تصویر ۱. نمودار سنجش آنتی‌اکسیدانتی DPPH، ABTS، Iron chelation activity و FRAP به همراه میزان همبستگی فعالیت آنتی‌اکسیدانتی عصاره‌ها

مکانیسم انتقال اتم هیدروژن عمل می‌کند کاربردی ندارد [۳۷]. در این تست، اکسیدان $Fe(TPTZ)_2Cl_3$ بوده که با گرفتن الکترون به آهن ۲ ظرفیتی تبدیل می‌شود. ترکیبات موجود در گیاهان که بتوانند آهن ۳ ظرفیتی را جذب کنند، می‌توانند باعث اثراتی مشابه با ترکیبات آنتی‌اکسیدانتی ایجاد کنند [۲۸]. میزان EC_1 عصاره پلی‌فنل‌های قابل استخراج کمتر $EC_1 = 2.63 mmol$ (Fe^{2+}/g plant extract) از عصاره‌های دیگر بود که نشان‌دهنده تأثیر بهتر این عصاره است.

در پی مقایسه دو سیستم حلال مورد استفاده در روش هیدرولیز اسیدی، نتایج مشابه با مطالعات دیگر به دست آمد و مشخص شد

مشابه که توسط جانجا و همکارانش روی آلو صورت گرفت، با نتایج این مطالعه سازگاری داشت [۶]. در آنالیز شلات‌دهندگی آهن طبق تصویر شماره ۱، کمترین مقدار IC_{50} مربوط به عصاره پلی‌فنل‌های غیر قابل استخراج با حلال متانول/سولفوریک اسید غلیظ بود ($IC_{50} = 0.1159$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) که نشان‌دهنده ی بهتر عمل کردن آن نسبت به عصاره‌های دیگر است، اما این تفاوت معنادار نبود ($P > 0.05$). طی سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی انجام‌شده به روش FRAP همه عصاره‌ها ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی قابل توجهی نشان دادند. تست FRAP بر پایه انتقال الکترون بوده و برای ترکیبات آنتی‌اکسیدانتی، مانند تیول‌ها و پروتئین‌ها که با



| Group 1 | Group2 | Meandiff | Sig (p-value)* |
|---------|---------|----------|----------------|
| EPP | NEPP I | 30.34 | 0.001 |
| EPP | NEPP II | 13.17 | 0.001 |
| NEPP I | NEPP II | -17.16 | 0.001 |

* p<0.05 تفاوت معنا دار است

جندی شاپور

تصویر ۲. مقادیر IC₅₀ عصاره‌های مختلف پوست میوه نارنج در تست لیپید در کبد موش صحرایی

غیر قابل استخراج می‌تواند منجر به جداسازی ترکیبات مختلف شود که تأثیر مستقیم بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی دارد. در تست FRAP عصاره پلی‌فنل‌های قابل استخراج تأثیر بهتری داشته است که به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت با توجه به اثر مورد نظر می‌توان روش استخراج مناسبی را انتخاب کرد.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

مقاله ملاحظات اخلاقی ندارد. این مقاله از پایان‌نامه دکتر زهرا رضایی گرفته شده که در دانشگاه علوم پزشکی اهواز با کد MPRC-9710 تصویب شده است.

حامی مالی

این مقاله با حمایت مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز انجام شده است.

مشارکت نویسندگان

هر دو نویسنده به یک اندازه در نگارش مقاله مشارکت داشته‌اند.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان این مقاله تعارض منافع ندارد.

که عصاره متانول / سولفوریک اسید بهتر از عصاره n-بوتانول / هیدروکلریک اسید عمل کرده است. این مطالعه همچنین نشان داد که بین ترکیبات فنلی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی رابطه منطقی و مستقیمی وجود دارد. به طوری که در مطالعات دیگر نیز این رابطه نشان داده شده است [۳۷]. با توجه به نتایج اثرات ضدلیپید پراکسیداسیون در لیپیدهای کبد موش صحرایی مشخص شد که عصاره پلی‌فنل‌های غیر قابل استخراج با حلال متانول / سولفوریک اسید غلیظ قوی‌ترین اثر در برون تنی^{۳۰} را داراست (P<۰/۰۱) (تصویر شماره ۲). در مقایسه با مطالعه برون تنی که اثرات ضدلیپید پراکسیداسیون عصاره متانولی درخت خرما^{۳۱} در لیپیدهای کبد موش صحرایی انجام شد، عصاره پلی‌فنل‌های غیر قابل استخراج با حلال متانول / سولفوریک اسید غلیظ پوست نارنج، اثرات به‌مراتب قوی‌تری داشت [۳۳].

نتیجه‌گیری

در این مطالعه روش‌های مختلف جداسازی پلی‌فنل‌ها و ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی آن‌ها در پوست نارنج برای اولین بار مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج نشان داد که میزان بازده استخراج عصاره پلی‌فنل‌های قابل استخراج پوست نارنج از پلی‌فنل‌های غیر قابل استخراج بیشتر است. اما نتایج تعیین مقدار ترکیبات فنلی و تست‌های آنتی‌اکسیدانتی نشان داد که عصاره پلی‌فنل‌های غیر قابل استخراج با حلال متانول / سولفوریک اسید غلیظ هر چند بازده استخراج کمی داشته، اما شامل ترکیبات بالقوه است که منجر به نتایج بهتر در تست‌های ABTS، DPPH، شلات‌کنندگی آهن و پراکسیداسیون لیپید شده است. همچنین روش‌های مختلف جداسازی پلی‌فنل‌های

30. In vitro

31. Phoenix dactylifera L. (P. dactylifera L.)

References

- [1] Calderón-Oliver M, Ponce-Alquicira E. Fruits: A source of polyphenols and health benefits. In: Mihai Grumezescu A, Maria Holban A. Natural and artificial flavoring agents and food dyes. Amsterdam: Elsevier; 2018. p. 189-228. [DOI:10.1016/B978-0-12-811518-3.00007-7]
- [2] Luthria DL. Significance of sample preparation in developing analytical methodologies for accurate estimation of bioactive compounds in functional foods. *J Sci Food Agric*. 2006; 86(14):2266-72. [DOI:10.1002/jsfa.2666]
- [3] Pérez-Jiménez J, Díaz-Rubio ME, Saura-Calixto F. Non-extractable polyphenols, a major dietary antioxidant: Occurrence, metabolic fate and health effects. *Nutr Res Rev*. 2013; 26(2):118-29. [DOI:10.1017/S0954422413000097] [PMID]
- [4] Cheng A, Han C, Fang X, Sun J, Chen X, Wan F. Extractable and non-extractable polyphenols from blueberries modulate LPS-induced expression of iNOS and COX-2 in RAW264. 7 macrophages via the NF- κ B signalling pathway. *J Sci Food Agric*. 2016; 96(10):3393-400. [DOI:10.1002/jsfa.7519] [PMID]
- [5] Esparza-Martínez FJ, Miranda-López R, Mata-Sánchez SM, Guzmán-Maldonado SH. Extractable and non-extractable phenolics and antioxidant capacity of mandarin waste dried at different temperatures. *Plant Foods Hum Nutr*. 2016; 71(3):294-300. [DOI:10.1007/s11130-016-0559-0] [PMID]
- [6] Kristl J, Slekovec M, Tojnkó S, Unuk T. Extractable antioxidants and non-extractable phenolics in the total antioxidant activity of selected plum cultivars (*Prunus domestica* L.): Evolution during on-tree ripening. *Food Chem*. 2011; 125(1):29-34. [DOI:10.1016/j.foodchem.2010.08.027]
- [7] Pérez-Jiménez J, Saura-Calixto F. Macromolecular antioxidants or non-extractable polyphenols in fruit and vegetables: Intake in four European countries. *Food Res Int*. 2015; 74:315-23. [DOI:10.1016/j.foodres.2015.05.007] [PMID]
- [8] Saura-Calixto F, Serrano J, Goñi I. Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chem*. 2007; 101(2):492-501. [DOI:10.1016/j.foodchem.2006.02.006]
- [9] Peng H, Li W, Li H, Deng Z, Zhang B. Extractable and non-extractable bound phenolic compositions and their antioxidant properties in seed coat and cotyledon of black soybean (*Glycinemax* (L.) merr). *J Funct Foods*. 2017; 32:296-312. [DOI:10.1016/j.jff.2017.03.003]
- [10] Chen PX, Tang Y, Zhang B, Liu R, Marcone MF, Li X, et al. 5-Hydroxymethyl-2-furfural and derivatives formed during acid hydrolysis of conjugated and bound phenolics in plant foods and the effects on phenolic content and antioxidant capacity. *J Agric Food Chem*. 2014; 62(20):4754-61. [DOI:10.1021/jf500518r] [PMID]
- [11] Kefford JF. The chemical constituents of citrus fruits. *Adv Food Res*. 1960; 9:285-372. [DOI:10.1016/S0065-2628(08)60278-5]
- [12] Moraes TM, Kushima H, Moleiro FC, Santos RC, Rocha LR, Marques MO, et al. Effects of limonene and essential oil from *Citrus aurantium* on gastric mucosa: Role of prostaglandins and gastric mucus secretion. *Chem Biol Interact*. 2009; 180(3):499-505. [DOI:10.1016/j.cbi.2009.04.006] [PMID]
- [13] Pellati F, Benvenuti S. Chromatographic and electrophoretic methods for the analysis of phenethylamine [corrected] alkaloids in *Citrus aurantium*. *J Chromatogr A*. 2007; 1161(1-2):71-88. [PMID]
- [14] Kim GS, Park HJ, Woo JH, Kim MK, Koh PO, Min W, et al. *Citrus aurantium* flavonoids inhibit adipogenesis through the Akt signaling pathway in 3T3-L1 cells. *BMC Complement Altern Med*. 2012; 12:31. [DOI:10.1186/1472-6882-12-31] [PMID] [PMCID]
- [15] Putzbach K, Rimmer CA, Sharpless KE, Sander LC. Determination of Bitter Orange alkaloids in dietary supplements standard reference materials by liquid chromatography with ultraviolet absorbance and fluorescence detection. *J Chromatogr A*. 2007; 1156(1-2):304-11. [PMID]
- [16] Arcas M, Botía JM, Ortuño AM, Del Río JA. UV irradiation alters the levels of flavonoids involved in the defence mechanism of *Citrus aurantium* fruits against *Penicillium digitatum*. *Eur J Plant Pathol*. 2000; 106(7):617-22. [DOI:10.1023/A:1008704102446]
- [17] Kang HJ, Chawla SP, Jo C, Kwon JH, Byun MW. Studies on the development of functional powder from citrus peel. *Bioresour Technol*. 2006; 97(4):614-20. [DOI:10.1016/j.biortech.2005.03.037] [PMID]
- [18] Lario Y, Sendra E, Garcia-Pérez J, Fuentes C, Sayas-Barberá E, Fernández-López J, et al. Preparation of high dietary fiber powder from lemon juice by-products. *Innov Food Sci Emerg Technol*. 2004; 5(1):113-7. [DOI:10.1016/j.ifset.2003.08.001]
- [19] Mandalari G, Bennett RN, Bisignano G, Saija A, Dugo G, Lo Curto RB, et al. Characterization of flavonoids and pectins from bergamot (*Citrus bergamia* Risso) peel, a major byproduct of essential oil extraction. *J Agric Food Chem*. 2006; 54(1):197-203. [PMID]
- [20] Trabelsi D, Ammar AH, Bouabdallah F. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oils and Methanolic Extracts of Tunisian *Citrus Aurantium* L. *J Environ Sci Toxicol Food Technol*. 2014; 8(5):18-27. <https://www.sid.ir/en/Journal/ViewPaper.aspx?ID=516176>
- [21] Moosavy M, Hassanzadeh P, Mohammadzadeh E, Mahmoudi R, Khatibi S, Mardani K. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of Lemon (*Citrus limon*) peel in vitro and in a food model. *J Food Qual Hazards Control*. 2017; 4(2):42-8. <http://jfqhc.ssu.ac.ir/article-1-335-en.html>
- [22] Pérez-Jiménez J, Arranz S, Tabernero M, Díaz-Rubio ME, Serrano J, Goñi I, et al. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Res Int*. 2008; 41(3):274-85. [DOI:10.1016/j.foodres.2007.12.004]
- [23] Basile A, Ferrara L, Del Pezzo M, Mele G, Sorbo S, Bassi P, et al. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. *J Ethnopharmacol*. 2005; 102(1):32-6. [DOI:10.1016/j.jep.2005.05.038] [PMID]
- [24] Santos-Gomes PC, Seabra RM, Andrade PB, Fernandes-Ferreira M. Phenolic antioxidant compounds produced by in vitro shoots of sage (*Salvia officinalis* L.). *Plant Sci*. 2002; 162(6):981-7. [DOI:10.1016/S0168-9452(02)00052-3]

- [25] Quettier-Deleu C, Gressier B, Vasseur J, Dine T, Brunet C, Luyckx M, et al. Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *J Ethnopharmacol.* 2000; 72(1-2):35-42. [DOI:10.1016/S0378-8741(00)00196-3]
- [26] Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal.* 2002; 10(3). [DOI:10.38212/2224-6614.2748]
- [27] Duan XJ, Zhang WW, Li XM, Wang BG. Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*. *Food Chem.* 2006; 95(1):37-43. [DOI:10.1016/j.foodchem.2004.12.015]
- [28] Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem.* 2005; 53(6):1841-56. [PMID]
- [29] Chrissyavgi G, Vassiliki P, Athanasios M, Kibouris T, Komaitis M. Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food Chem.* 2008; 107(3):1120-30. [DOI:10.1016/j.foodchem.2007.09.036]
- [30] Benzie IF. Lipid peroxidation: A review of causes, consequences, measurement and dietary influences. *Int J Food Sci Nutr.* 1996; 47(3):233-61. [PMID]
- [31] Ridnour LA, Isenberg JS, Espey MG, Thomas DD, Roberts DD, Wink DA. Nitric oxide regulates angiogenesis through a functional switch involving thrombospondin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102(37):13147-52. [PMID]
- [32] Kanatt SR, Chander R, Sharma A. Antioxidant potential of mint (*Mentha spicata* L.) in radiation-processed lamb meat. *Food Chem.* 2007; 100(2):451-8. [DOI:10.1016/j.foodchem.2005.09.066]
- [33] Siahpoosh A, Soleimani I. In vitro evaluation of inhibitory effect of *Phoenix dactylifera* bark extract on rat lipid peroxidation and blood hemolysis. *Trop J Pharm Res.* 2016; 15(8):1707-13. [DOI:10.4314/tjprv15i8.16]
- [34] Cheng A, Chen X, Wang W, Gong Z, Liu L. Contents of extractable and non-extractable polyphenols in the leaves of blueberry. *Czech J Food Sci.* 2013; 31:275-82. [DOI:10.17221/272/2012-CJFS]
- [35] Tow WW, Premier R, Jing H, Ajlouni S. Antioxidant and anti-proliferation effects of extractable and nonextractable polyphenols isolated from apple waste using different extraction methods. *J Food Sci.* 2011; 76(7):T163-72. [PMID]
- [36] Amaya-Cruz DM, Pérez-Ramírez IF, Delgado-García J, Mondragón-Jacobo C, Dector-Espinoza A, Reynoso-Camacho R. An integral profile of bioactive compounds and functional properties of prickly pear (*Opuntia ficus indica* L.) peel with different tonalities. *Food Chem.* 2019; 278:568-78. [DOI:10.1016/j.foodchem.2018.11.031] [PMID]
- [37] Tawaha K, Alali FQ, Gharaibeh M, Mohammad M, El-Elimat T. Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chem.* 2007; 104(4):1372-8. [DOI:10.1016/j.foodchem.2007.01.064]
- [38] Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem.* 2005; 53(10):4290-302. [PMID]