DOI: http://dx.doi.org/10.22104/jift.2015.92

بررسی فعالیت ضداکسیدانی اسانس برگ نارنج (*Citrus aurantium* L.) در مقایسه با ضد اکسیدان سنتزی TBHQ در روغن خوراکی

زهرا هاشمی[1]، محمد حجتی[2*] ، محمد طاهانژاد[3]

1. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان

2. استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان

3. مربی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان

(تاریخ دریافت: 93/6/6، تاریخ پذیرش: 93/7/1)

چکیده

در این تحقیق اسانس برگ نارنج منطقه ملاثانی خوزستان به روش تقطیر آبی استخراج و ترکیبات فرار موجود در آن با GC/MS شناسایی و میزان ترکیبات فنلی اسانس با استفاده از روش فولین-سیوکالتو و فعالیت ضدرادیکالی آن با استفاده از روش‌های DPPH و ABTS محاسبه گردید. نتایج نشان داد اسانس برگ نارنج دارای 7/1 میلی‌گرم ترکیبات فنولی در هر گرم ماده خشک است و لینالول (32/41٪)، آلفا ترپینئول (16/51٪)، نرول (16/49٪) و ژرانیل استات (8/31٪) عمده‌ترین ترکیبات موجود در اسانس برگ نارنج هستند. فعالیت ضداکسیدانی اسانس در روغن مخصوص سرخ کردنی در شرایط اکسایش تسریع شده در طی هفت شبانه روز، با اندازه‌گیری اعداد پراکسید، دی‌ان مزدوج، تیوباربیتوریک اسید، P-آنیزیدین و اندیس توتوکس تعیین و با ضداکسیدان سنتزی TBHQ مقایسه شد. نمونه‌های روغن حاوی مقادیر مختلف اسانس برگ نارنج مورد ارزیابی حسی قرار گرفتند. در آزمون DPPH مقدار EC_{50} اسانس 0/961 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود و آزمون ABTS نشان داد که بیش‌ترین فعالیت ضدرادیکالی مربوط به غلظت10 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اسانس برگ نارنج (بازدارندگی 64/13 درصد، معادل غلظت 0/098میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آسکوربیک اسید) است. اسانس برگ نارنج در غلظت 800 پی‌پی‌ام اثر ضداکسیدانی معادل با غلظت 100 پی‌پی‌ام TBHQ دارد. نتایج آزمون ارزیابی حسی نشان داد که این اسانس تا غلظت 800 پی‌پی‌ام تغییر محسوسی در خصوصیات ارگانولپتیکی روغن ایجاد نمی‌کند. نتایج این تحقیق نشان داد که از اسانس برگ نارنج می‌توان به عنوان یک ضد اکسیدان طبیعی در روغن خوراکی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: اسانس، برگ نارنج، روغن، فعالیت ضد اکسیدانی، گازکروماتوگرافی/طیف سنج جرمی.

* نویسنده مسئول: hojjatim@yahoo.com

1- مقدمه

پایداری اکسایشی عاملی بسیار مهم در کیفیت روغن‌ها، به ویژه روغن‌های مخصوص سرخ کردنی به شمار می‌رود. قرار گرفتن طولانی مدت روغن‌های سرخ کردنی در معرض دمای بالا، منجر به اکسایش و تجمع ترکیبات مخرب و کاهش کیفیت تغذیه‌ای و تنزل ایمنی محصول می‌گردد. از این رو برای مقابله با فساد اکسایشی از ضداکسیدان‌ها استفاده می‌گردد [1]. به دلیل اثبات برخی عوارض نامطلوب ناشی از مصرف ضداکسیدان‌های سنتزی، مطالعات بسیاری بر روی خواص ضداکسیدانی گیاهان مختلف صورت گرفته است [2]. تحقیقات نشان داده است که اسانس‌ها و عصاره‌های استخراج شده از گیاهان دارویی، ادویه‌جات، پوست، میوه و برگ برخی از درختان می‌تواند منابع بالقوه‌ای از ضداکسیدان‌های طبیعی باشد [3]. ترکیبات فنولی که جزء متابولیت‌های ثانویه آروماتیک گیاهی می‌باشند، در سراسر گیاه پخش شده و دارای تاثیرات بیولوژیکی متعدد هم‌چون فعالیت ضداکسیدانی و فعالیت ضدباکتریایی هستند. بنابراین گیاهانی که در ترکیبات خود گروه‌های فنولی زیادی دارند، عمدتاً دارای فعالیت ضداکسیدانی می‌باشند [4]. در بین میوه‌ها، مرکبات به عنوان ذخایر مهم فلاونوئید، دارای فعالیت ضداکسیدانی قابل ملاحظه‌ای می‌باشند[5].

نارنج (*Citrus aurantium*) از جمله مرکبات بومی مناطق استوایی آسیا از جمله هند و چین بوده و در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری به خوبی رشد می‌کند. هم‌چنین در نقاطی از ایران از جمله استان‌های گیلان، مازندران و فارس به وفور یافت می‌شود [6]. ترکیبات فعال بیولوژیکی مختلفی از جمله فنل‌ها، فلاونوئیدها و انواع ویتامین‌ها در نارنج وجود داشته که موجب استفاده از آن در طب سنتی شده است [7]. برگ نارنج آرام‌بخش و هضم‌کننده غذا بوده و جوشانده آن بی‌خوابی، میگرن و اختلالات کبدی را معالجه می‌کند [8]. مطالعات مختلف روی ترکیبات شیمیایی اسانس‌های مستخرج از قسمت‌های مختلف نارنج، نشان می‌دهد که از نظر کمی و کیفی تفاوت‌های قابل ملاحظه‌ای در اسانس استخراج شده از قسمت‌های مختلف نارنج وجود دارد. به این ترتیب که در اسانس پوست، بیش‌ترین ترکیب‌ها شامل منوترپن‌های هیدروکربنه مانند لیمونین و مریسین و در اسانس برگ و گل‌های نارنج بیش‌ترین مقادیر مربوط به مونوترپن‌های اکسیژنه شامل لینالول، لینالیل استات، ژرانیل استات و آلفاترپینئول می‌باشد [9-10]. بنابراین به دلیل تفاوت در نوع و مقدار ترکیبات موجود در اسانس قسمت‌های مختلف نارنج، میزان اثربخشی و عملکردهای متفاوتی ایجاد خواهد شد.

تحقیقات متعدد نشان می‌دهد برخی ترکیبات استخراج شده از اسانس پوست و برگ نارنج دارای فعالیت ضداکسیدانی، ضدمیکروبی، ضدقارچی، ضدانگلی و ضدالتهابی می‌باشد [12-11]. برخی مطالعات نشان می‌دهند که ترکیبات معطری مانند گاماترپینن، ترپینولین، ژرانیول، بتاپینن و میریسین حتی در غلظت‌های پایین دارای فعالیت ضداکسیدانی بالایی می‌باشند [13-12].

چوی و همکاران (2000) فعالیت مهار رادیکالی 34 گونه از اسانس‌های مرکبات را بررسی و مشاهده کردند بین 17/7 تا 64 درصد اسانس‌های مورد بررسی، دارای قدرت مهار رادیکال ۲،۲-دی‌فنیل1-پیکریل هیدرازیل (DPPH) می‌باشند و هم‌چنین مشخص گردید حداکثر فعالیت ضدرادیکالی را مرکباتی دارند که اسانس آن‌ها حاوی ژرانیول، ترپینولین و گاماترپینن است [9]. مجنونی و همکاران (2012) توانایی مهار رادیکالی اسانس استخراج شده از برگ نارنج منطقه شیراز را در مقایسه با ضداکسیدان BHA با انجام آزمون DPPH مورد بررسی قرار داده و مشاهده کردند که اسانس برگ نارنج نسبت به ضداکسیدان BHA توانایی کم‌تری در مهار رادیکال DPPH داشته و EC_{50} اسانس معادل 1040±0/9 میکروگرم بر میلی‌لیتر بود [14]. سارو و همکاران (2013) ترکیبات فرار موجود در اسانس پوست، گل و برگ‌های پیر و جوان نارنج‌های یونانی را شناسایی کرده و از نظر فعالیت ضداکسیدانی مورد ارزیابی قرار داده و بالاترین فعالیت ضداکسیدانی را در اسانس استخراج شده از برگ‌های پیر مشاهده کردند [15]. الوز و همکاران (2012) زمان برداشت برگ نارنج در فصول مختلف را عاملی موثر بر ترکیب شیمیایی و ویژگی‌های زیستی اسانس دانسته و فصل تابستان را بهترین زمان برداشت برگ نارنج جهت تهیه اسانس گزارش نمودند [16]. ترابلسی و همکاران (2014) فعالیت ضدباکتریایی و ضداکسایشی اسانس مستخرج از گل، برگ و پوست نارنج شمال تونس را بررسی و نشان

دادند که اسانس حاصل از همه قسمت‌های مورد بررسی دارای فعالیت ضداکسایشی و ضدباکتریایی می‌باشند [17].

با توجه به مطالعات مختلف صورت گرفته در خصوص شناسایی ترکیبات اسانس اندام‌های مختلف نارنج و بررسی ویژگی‌های ضداکسیدانی و ضدباکتریایی آن و عدم گزارشی مبنی بر استفاده از اسانس برگ نارنج به عنوان یک ضداکسیدان طبیعی در مواد غذایی، هدف از انجام این تحقیق استخراج اسانس برگ نارنج منطقه ملاثانی خوزستان، شناسایی ترکیبات آن و ارزیابی فعالیت ضد اکسیدانی اسانس حاصل در سامانه روغن مخصوص سرخ کردنی در مقایسه با ضداکسیدان سنتزی TBHQ بود.

2- مواد و روش‌ها

2-1- مواد شیمیایی

رادیکال DPPH و کلیه حلال‌ها و مواد شیمایی مورد استفاده در این تحقیق با خلوص بالا از شرکت مرک آلمان و معرف فولین سیوکالتو، اسید گالیک، p-آنیزیدین، ۲،۲- آزینو بیس3-اتیل‌بنزوتیازولین6-سولفونیک اسید (ABTS) و پرسولفات پتاسیم از شرکت سیگمای آمریکا تهیه شدند. نمونه روغن مخصوص سرخ کردنی متشکل از 60٪ روغن سویا، 40٪ پالم و 100 ppm اسید سیتریک از شرکت ارجان نوین واقع در شهرستان بهبهان استان خوزستان تهیه و تا روز قبل از آزمون به‌منظور جلوگیری از اکسایش در فریزر نگه‌داری شد.

2-2- استخراج اسانس برگ نارنج

برگ گیاه نارنج از درختان شناسایی شده در پردیس دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان در پائیز 1392 جمع‌آوری گردید و اسانس آن با روش تقطیر با آب به‌وسیله دستگاه کلونجر به مدت 3 ساعت جمع‌آوری و سپس توسط سولفات سدیم بی آب خشک شد و تا زمان استفاده، در یخچال در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردید.

2-3- شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس برگ نارنج

شناسایی ترکیبات اسانس استخراج شده با تزریق 2 میکرولیتر اسانس رقیق شده با سیکلوهگزان به دستگاه گازکروماتوگرافی Shimadzu مدل GC-17A Corporation Kyoto, Japan دارای ستون موئینه TRASCIL Meta X5 به طول 30 متر، قطر داخلی و ضخامت 25 میکرومتر، متصل به طیف نگار جرمی مدل GC-MS QA 5050A، انجام پذیرفت. برنامه دمایی ستون به این طریق تنظیم گردید: دمای شروع جداسازی ستون 80 درجه سانتی‌گراد که با سرعت 5 درجه در دقیقه به دمای 250 درجه سانتی‌گراد رسیده و پس از یک توقف 1 دقیقه‌ای دما با سرعت 25 درجه در دقیقه به 300 درجه سانتی‌گراد افزایش یافت. گاز هلیوم با سرعت جریان 0/9 میلی‌لیتر در دقیقه به عنوان گاز حامل به‌کار گرفته شد و دمای محفظه تزریق نمونه و شناساگر به ترتیب 230 و 300 درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید.

شناسایی طیف‌ها به کمک بانک اطلاعات جرمی نرم افزار کتابخانه‌ای Willey 2.29 ، زمان بازدارندگی[1]، محاسبه اندیس کواتس[2]، مطالعه طیف‌های جرمی هریک از اجزاء اسانس و بررسی الگوهای شکست آن‌ها، مقایسه با طیف‌های استاندارد و استفاده از منابع معتبر NIST 2011 صورت گرفت. درصد نسبی هر یک از اجزای تشکیل‌دهنده اسانس بر اساس سطح زیر منحنی هر یک از پیک‌های کروماتوگرام گاز کروماتوگرافی در مقایسه با سطح کل زیر منحنی، محاسبه گردید. در این تحقیق از ترانس آنتول، ساخت شرکت آووکادو کشور انگلستان، در غلظت 1 ppm به‌عنوان استاندارد داخلی استفاده گردید. تزریق نمونه دوبار به دستگاه انجام گرفت و نتایج به صورت میانگین دو تکرار بیان گردید.

2-4- تعیین محتوی کل فنل

برای اندازه‌گیری میزان فنل کل اسانس برگ نارنج، از روش رنگ‌سنجی فولین سیوکالتو استفاده شد. مطابق این روش 200 میکرولیتر از اسانس که به نسبت 1:10 در متانول تهیه شده به 1 میلی‌لیتر واکنش‌گر فولین سیوکالتو که با نسبت 1:10 با آب مقطر رقیق شده اضافه می‌شود. پس از گذشت 4 دقیقه 800 میکرولیتر کربنات سدیم (75گرم بر لیتر) به آن افزوده و محلول حاصل به مدت 2 ساعت در دمای اتاق قرار می‌گیرد. سپس میزان جذب نمونه در طول موج 765 نانومتر قرائت می‌شود. از گالیک اسید (غلظت 1 تا 100 میکروگرم بر میلی‌لیتر) برای رسم منحنی استاندارد استفاده شده و میزان

1. Retention Time
2. Kovats Index

کل فنل بر مبنای اسید گالیک با استفاده از رابطه 1 محاسبه می‌شود [18]:

$$C = \frac{(C_1 \times V)}{m} \times 100 \quad (1)$$

C : محتوای فنل کل بر مبنای اسید گالیک (میلی‌گرم بر گرم)
C_1: غلظت معادل اسید گالیک بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر
V: حجم اسانس مصرفی (میلی‌لیتر)
m:وزن گیاه مورد نیاز جهت استخراج 200 میکرولیتر اسانس (گرم)

2-5- سنجش قدرت مهارکنندگی رادیکال DPPH

DPPH، رادیکالی چربی‌دوست بوده که دارای جذب بیشینه در طول موج 517 نانومتر می‌باشد. در این آزمون رادیکال‌های DPPH با ضداکسیدان‌ها یا دیگر گونه‌های ضدرادیکالی واکنش می‌دهند و مقدار آن‌ها کاهش می‌یابد و در نتیجه جذب در طول موج 517-515 نانومتر کم می‌شود. میزان کاهش ملکول‌های DPPH تقریبا معادل با تعداد گروه‌های هیدروکسیل در دسترس می‌باشد. گروه‌های هیدروکسیل با دادن هیدروژن به رادیکال‌های DPPH، آن‌ها را از رنگ بنفش تیره به زرد روشن تبدیل می‌کند. در نتیجه جذب در طول موج 517 نانومتر، بیان‌گر مقدار DPPH باقی‌مانده است. در این آزمون مطابق روش Burits و Bucar (2000)، میزان 50 میکرولیتر از اسانس برگ نارنج در غلظت‌های مختلف به 5 میلی‌لیتر محلول 0/004 درصد DPPH در متانول اضافه شده و به مدت 30 دقیقه در دمای اتاق نگه‌داری شد. سپس شدت جذب نمونه‌ها با استفاده از اسپکتروفتومتر مدل Spectronic Genesys 5، ساخت شرکت میلتون روی[1] آمریکا، در طول موج 517 نانومتر قرائت شد [19]. درصد مهار رادیکال DPPH با استفاده از رابطه 2 محاسبه گردید.

$$I\% = \frac{(A_{blank} - A_{sample})}{A_{blank}} \times 100 \quad (2)$$

در این فرمول A_{blank} میزان جذب نوری نمونه شاهد (که تمامی موارد به استثنای اسانس را دارد) و A_{sample} بیانگر جذب نوری غلظت‌های مختلف اسانس برگ نارنج می‌باشد. در این آزمون از ضداکسیدان TBHQ به عنوان ضداکسیدان استاندارد استفاده شده و میزان EC_{50} (غلظتی از هر اسانس که لازم است تا 50 درصد رادیکال‌های آزاد DPPH را مهار کند) اسانس برگ نارنج تعیین شد.

2-6- سنجش قدرت مهارکنندگی رادیکال ABTS

در این آزمون ابتدا یک محلول 7 میلی‌مولار ABTS در آب مقطر تهیه شد. سپس یک محلول 2/45 میلی‌مولار پرسولفات نیز تهیه و هر دو محلول به نسبت 1:1 با یکدیگر مخلوط شدند و مخلوط حاصل، مدت زمان 16 ساعت در دمای اتاق و در تاریکی قرار گرفت. سپس محلول ABTS با متانول به نسبت 1:25 رقیق شد و پس از آن میزان 20 میکرولیتر از غلظت‌های مختلف اسانس به 2 میلی لیتر محلول ABTS رقیق شده افزوده شد سپس در لحظه اول و پس از 15 دقیقه میزان جذب در طول موج 734 نانومتر قرائت شد. سپس درصد بازدارندگی نمونه با استفاده از رابطه 3 محاسبه و در نهایت به صورت ظرفیت ضداکسیدانی معادل آسکوربیک اسید گزارش شد[20].

$$I\% = \frac{(A_{blank} - A_{sample})}{A_{blank}} \times 100 \quad (3)$$

در این فرمول A_{blank} میزان جذب نوری نمونه شاهد و A_{sample} بیانگر جذب نوری غلظت‌های مختلف اسانس برگ نارنج می‌باشد.

2-7- افزودن اسانس برگ نارنج به عنوان ضداکسیدان طبیعی به روغن مخصوص سرخ کردنی

اسانس استخراج شده از برگ نارنج در چهار سطح 200، 400، 600 و 800 ppm و ضداکسیدان سنتزی TBHQ در دو سطح 100 و 200 ppm به روغن مخصوص سرخ کردن فاقد ضداکسیدان اضافه و به‌منظور تسریع روند اکسایش، نمونه‌ها در دمای 90 درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه گذاری شده و طی 7 شبانه روز متوالی میزان پیشرفت اکسایش در آن‌ها با اندازه‌گیری عدد پراکسید طبق روش (AOCS cd 8-53) [21]، دی‌ان مزدوج[22]، تیوباربیتوریک

1. Milton Roy Company

اسید[1] [23]، p- آنیزیدین (IUPAC, 1987) [24] و اندیس توتوکس [25] تعیین شد.

2-8- آزمون ارزیابی حسی

ارزیابی حسی نمونه‌های مختلف روغن، حاوی اسانس برگ نارنج، نمونه شاهد و حاوی ضداکسیدان TBHQ، با استفاده از آزمون هدونیک 11 نقطه‌ای انجام شد. در این آزمون از 10 ارزیاب آموزش ندیده (5 مرد و 5 زن در محدوده سنی 20 تا 30 سال) خواسته شد تا خلال‌های سیب زمینی سرخ شده در نمونه‌های مختلف روغن را که همگی در شرایط یکسان و در دمای 175 درجه سانتی‌گراد به مدت 8 دقیقه سرخ شده بودند [26]، از نظر سه فاکتور رنگ و ظاهر، بو و طعم و مزه مورد بررسی قرار داده و بر اساس میزان رضایتمندی از هر کدام، به آن‌ها امتیاز بین 0 تا 10 بدهند (امتیاز صفر برای حداقل مطلوبیت نمونه و امتیاز ده برای حداکثر مطلوبیت نمونه بود).

2-9- تجزیه و تحلیل آماری

این تحقیق در قالب یک طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SAS نسخه 3.9 انجام و میانگین تیمارها با استفاده از آزمون دانکن مورد مقایسه قرار گرفته و نمودارها با بهره‌گیری از نرم‌افزار Excell ترسیم شدند.

3- نتایج و بحث

3-1- ترکیبات استخراجی اسانس برگ نارنج

در این تحقیق 31 ترکیب شیمیایی در اسانس برگ نارنج توسط کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی، جداسازی و شناسایی شد. ترکیبات شناسایی شده به همراه شاخص بازداری و درصد هر یک در جدول 1 نشان داده شده است. لینالول (32/41٪)، آلفا ترپینئول (16/51٪)، نرول (16/49٪)، ژرانیل استات (8/31٪)، میرسین (5/32٪) و نریل استات (5/30٪) ترکیبات عمده موجود در اسانس حاصل بودند. مصدق و همکاران (1383) ترکیبات موجود در اسانس برگ نارنج منطقه تنکابن را توسط کروماتوگرافی گازی مورد بررسی قرار داده و لینالول (38/72 ٪)، لینالیل استات (36/52 ٪) و آلفا ترپینوئل (8/68 ٪) را عمده ترکیبات موجود در اسانس معرفی نمودند [27] که هم‌چون گزارش ارائه شده توسط الوز و همکاران (2012) در بررسی اسانس برگ نارنج شمال‌شرقی تونس بود [16]. در گزارشی دیگر لینالیل استات (53/76 ٪) و لینالول (22/11 ٪)، عمده مواد فرار موجود در اسانس برگ نارنج منطقه شمال تونس معرفی شدند [17]. هم‌چنین سارو و همکاران (2013) ترکیبات فرار اسانس برگ‌های جوان و پیر نارنج‌های یونانی را توسط کروماتوگرافی گازی شناسایی کرده و نشان دادند عمده‌ترین ترکیبات موجود در اسانس برگ‌های جوان و پیر به ترتیب عبارتند از لینالول (36/03-58/21٪)، آلفاترپینئول (7/11-12/89٪)، ژرانیل استات (4/49-8/70٪)، نریل استات (2/18-4/46٪) و ترانس بتااوسمین (4/08-3/11٪). هم‌چنین آلفاپینن، آلفاهامولین و بتافارنزین تنها در برگ‌های جوان و ترپینیل استات و نرولیدول فقط در برگ‌های پیر مشاهده شده است [15]. در پژوهش حاضر دو ترکیب لینالول و آلفا ترپینئول عمده ترکیبات موجود در اسانس حاصل بوده که از این نظر مشابه نتایج سایرین بود [15و27]. هم‌چنین در این تحقیق مخلوطی از برگ‌های جوان و پیر[1] نارنج از شاخه‌های حاوی برگ‌های پیر و جوان با نسبت‌های نامشخص مورد استفاده قرار گرفته، در نتیجه در جدول 1 ترکیبات موجود در اسانس مخلوط برگ‌های پیر و جوان دیده می‌شود؛ که از این نظر نیز با نتایج سارو و همکاران (2013) مطابقت داشت. در پژوهشی دیگر که توسط مجنونی و همکاران (2012) بر روی ترکیبات فرار اسانس برگ نارنج منطقه شیراز صورت گرفت عمده ترکیب شناسایی شده در اسانس شامل، لیمونن (57/57٪) و لینالول (8/01٪) بوده که با نتایج به‌دست آمده در این تحقیق و سایر پژوهش‌های انجام شده مغایرت داشت که می‌تواند به علت استفاده از یک گونه خاص و یا فصل و مکان برداشت و شرایط اسانس‌گیری متفاوت باشد [14].

3-2- میزان ترکیبات فنلی اسانس برگ نارنج

نتایج نشان داد که هر گرم اسانس برگ نارنج حاوی 7/1 میلی گرم

1. TBA

1. منظور از برگ‌های جوان همان برگ‌های تازه سبز شده و برگ‌های پیر برگ‌های قدیمی‌تر موجود بر شاخه‌های درختان مورد بررسی می باشد.

جدول (1) ترکیبات شیمیایی اسانس استخراجی برگ نارنج(*Citrus aurantium*) توسط گازکروماتوگراف- طیف سنج جرمی

ردیف	نام ترکیب	شاخص بازداری	درصد ترکیب
1	آلفا پینن (alpha pinene)	946	0/30
2	کامفن (camphene)	967	0/02
3	بتاپینن (beta pinene)	986	0/55
4	میرسین (myrcene)	996	5/32
5	دلتا3کارن (delta 3 carene)	1015	0/14
6	آلفاترپینن (alpha terpinene)	1026	0/03
7	لیمونن (limonene)	1042	1/05
8	ترانس‌بتااوسمین (trans beta ocimene)	1047	0/64
9	سیس‌بتااوسمین (cis beta ocimene)	1055	3/27
10	گاماترپینن (gamma terpinene)	1070	0/07
11	لینالول‌اکساید (linalool oxide)	1087	0/09
12	ترپینولین (terpinolene)	1099	1/03
13	لینالول (linalool)	1111	32/41
14	سیترونلال (citronellal)	1161	0/04
15	ترپینئول4 (terpineol-4)	1201	0/40
16	آلفاترپینئول (alpha terpineol)	1202	16/51
17	نرول (nerol)	1235	16/49
18	لینالیل استات (linalyl acetate)	1271	3/05
19	ژرانیول (geraniol)	1278	2/74
20	نریل استات (neryl acetate)	1366	5/30
21	ژرانیل استات (geranyl acetate)	1390	8/31
22	بتاالمین (beta elemene)	1399	0/02
23	ترانس کاریوفلین (trans caryophyllene)	1449	0/88
24	بتافارنزین (beta farnesene)	1458	0/05
25	آلفاهامولین (alpha humulene)	1471	0/13
26	آلفافارنزین (alpha farnesene)	1505	0/05
27	بایسیکلوجرماکارین (bicyclogermacrene)	1507	0/29
28	دلتاکادینه (delta cadinene)	1533	0/08
29	نرولیدل (nerolidol)	1566	0/51
30	کاریوفیلین‌اکساید (caryophyllene oxide)	1605	0/17
31	وریدی‌فلورول (viridiflorol)	1608	0/06

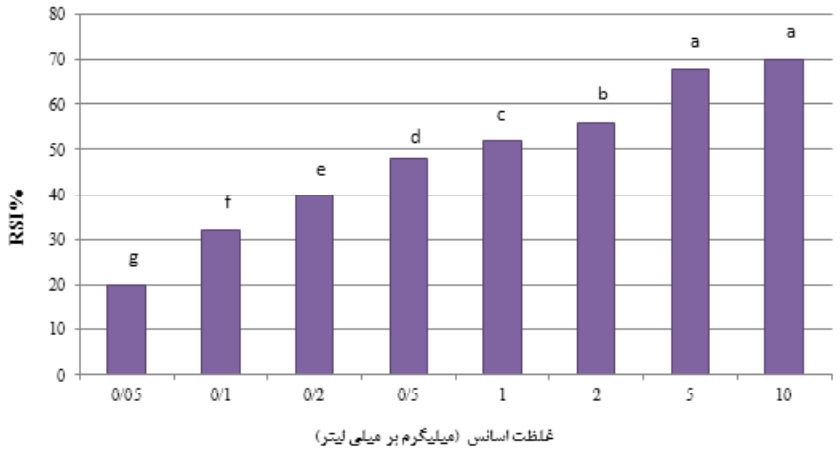
ترکیبات فنولیک بر مبنای اسید گالیک برحسب ماده خشک بوده است. کریمی و همکاران (2012) عصاره‌های مختلف بهار نارنج را از لحاظ محتوی ترکیبات فنولی مورد بررسی قرار داده و مشاهده کردند در هر گرم عصاره بهار نارنج، به‌طور متوسط مقدار 4/43 میلی‌گرم ترکیبات فنولیک بر مبنای اسید گالیک وجود دارد [28]. هم‌چنین میزان کل ترکیبات فنلی موجود در پوست میوه و هسته نارنج به ترتیب 5/1 و 1/53 میلی‌گرم بر مبنای اسید گالیک گزارش شده است [29-30]. نتیجه پژوهش حاضر در مقایسه با سایرین نشان داد که میزان ترکیبات فنولی در اسانس برگ نارنج، بیش‌تر از میزان موجود در بهار نارنج و پوست و هسته نارنج بوده و از آن‌جا که با افزایش میزان ترکیبات فنولی فعالیت ضداکسیدانی نیز افزایش می‌یابد و ترکیبات فنلی موجود در گیاهان خوراکی به عنوان عمده ترکیبات موثر در فعالیت ضداکسیدانی گیاه نقش دارند[28 ,30]، می‌توان انتظار داشت فعالیت ضداکسیدانی برگ نارنج از بهار نارنج، پوست و هسته نارنج بیش‌تر باشد. البته فعالیت ضداکسیدانی یک گیاه، به عوامل مختلفی هم‌چون واریته، شرایط آب و هوایی، روش، حلال و شرایط استخراج اسانس نیز بستگی دارد [30,14].

3-3- آزمون DPPH

قدرت اسانس برگ نارنج در مهار رادیکال‌های آزاد DPPH در شکل 1 نشان داده شده است. همان‌گونه که مشخص است با افزایش غلظت اسانس از 0/05 تا 5 درصد، قدرت آنتی‌اکسیدانی اسانس افزایش معنی‌داری را نشان داده، اما با افزایش غلظت از 5 به 10 درصد، تفاوت معنی‌داری در قدرت آنتی‌اکسیدانی آن مشاهده نشده است. این نتایج می‌تواند ناشی از ماهیت شیمیایی و نوع فعالیت ترکیبات دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی باشد؛ چرا که ترکیبات با خاصیت آنتی‌اکسیدانی، در ابتدا با افزایش غلظت، با شدت و سرعت بیش‌تری قادر به جذب رادیکال‌های آزاد موجود در محیط بوده و از حمله این رادیکال‌ها به سایر اجزاء مستعد اکسیداسیون از جمله چربی‌ها جلوگیری می‌کنند؛ ولی در صورتی‌که غلظت ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در محیط از حدی بیش‌تر باشد، دیگر رابطه مسقیمی را با قدرت مهار رادیکالی بروز نمی‌دهند و حتی در غلظت‌های بالا ممکن است از خود خاصیت پروکسیدانی نشان دهند. شاخص EC_{50} که نسبت معکوس با فعالیت ضداکسیدانی دارد، برای اسانس برگ نارنج 0/961 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد. گستره غلظت‌های مورد استفاده در این آزمون بین 0/05 تا 10 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده و بیش‌ترین درصد مهار رادیکال‌های آزاد در غلظت‌های 5 و 10 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده گردید؛ اگرچه با دو برابر شدن غلظت اسانس، میزان مهار رادیکال‌ها دو برابر نگردید. قدرت مهار رادیکالی اسانس برگ نارنج با ضداکسیدان سنتزی TBHQ به‌عنوان کنترل مثبت مورد مقایسه قرار گرفت. جدول 2 قدرت بازدارندگی TBHQ در مهار رادیکال DPPH را نشان می‌دهد. مقایسه درصد بازدارندگی اسانس برگ نارنج با ضداکسیدان TBHQ نشان داد این اسانس در غلظت 1 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر قدرت بازدارندگی معادل 0/05 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ضداکسیدان TBHQ داشت. مجنونی و همکاران (2012) توانایی مهار رادیکالی اسانس استخراج‌شده از برگ نارنج منطقه شیراز را در مقایسه با ضداکسیدان BHA با انجام آزمون DPPH مورد بررسی قرار داده و مشاهده کردند که اسانس برگ نارنج نسبت به ضداکسیدان BHA، توانایی کم‌تری در مهار رادیکال DPPH داشته و EC_{50} اسانس معادل 1040±0/9 میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد که می‌توان گفت تا حدودی با نتیجه پژوهش حاضر مطابقت داشت [14]. هم‌چنین نتایج نشان داد که قدرت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH برگ‌های مورد بررسی در این تحقیق، کم‌تر از شاخص EC_{50} گزارش شده توسط ترابلسی و همکاران (2014) است که علت آن علاوه‌بر زمان و مکان برداشت محصول، می‌تواند روش استخراج و حلال مورد استفاده در استخراج اسانس باشد [16]. کریمی و همکاران (2012) قدرت ضدرادیکالی سه عصاره آبی، متانولی و اتانولی بهار نارنج را با انجام آزمون DPPH مورد ارزیابی قرار داده و نشان دادند عصاره متانولی قوی‌تر از سایرین بوده و در غلظت 300 میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای 55/3 ٪ درصد قدرت مهار رادیکالی بوده است [28]. بن سونا و همکاران (2013) قدرت ضداکسیدانی اسانس استخراج شده از بهار نارنج را با انجام آزمون‌های مهار رادیکال DPPH و بی‌رنگ شدن بتاکاروتن مورد ارزیابی قرار داده و مشاهده کردند اسانس توانایی

جدول (2) قدرت بازدارندگی TBHQ به عنوان کنترل مثبت در مهار رادیکال DPPH

کنترل مثبت TBHQ	
غلظت (mg/mL)	درصد بازدارندگی (RSI٪)
0/05	50/23
0/10	79/41
0/20	85/29



شکل (1) رابطه میان فعالیت حذف کنندگی رادیکال آزاد DPPH با غلظت اسانس برگ نارنج. نتایج میانگین سه تکرار ± انحراف معیار است. حروف مختلف بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح 95 درصد است (فعالیت حذف کنندگی رادیکال= RSI).

بسیار خوبی در مهار رادیکال DPPH داشته و میزان EC_{50} معادل 1/8 میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد [31]. سارو و همکاران (2013)، ترکیبات فرار موجود در اسانس پوست، گل و برگ نارنج‌های یونانی را از نظر فعالیت ضدرادیکالی با انجام آزمون DPPH مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج آن‌ها نشان داد بالاترین درصد مهار رادیکالی مربوط به اسانس استخراج شده از برگ‌های پیر بوده که در حدود 94/36 ٪ می باشد و پس از آن به‌ترتیب اسانس استخراج شده از گل‌ها (53/98 ٪)، برگ‌های جوان(22/79 ٪) و پوسته نارنج (19/29 ٪) قرار داشتند [15]. مولهی و همکاران (2012) شاخص EC_{50} عصاره هسته نارنج را در آزمونی مشابه به مقدار 0/188 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش کردند که بسیار کم‌تر از مقدار مشاهده شده در تحقیق حاضر می‌باشد[30]. این محققین میزان ضداکسیدانی گیاهان را وابسته به میزان ترکیبات فنولی و نوع ساختار این ترکیبات بیان می‌کنند. نتایج به‌دست آمده و مقایسه EC_{50} اسانس برگ نارنج با نتایج سایرین، نمایانگر آن است که برگ نارنج مورد استفاده فعالیت ضد رادیکالی متوسطی داشته که با توجه به تفاوت در نوع برگ، فصل برداشت و رویشگاه متفاوت قابل توجیه می‌باشد.

4-3- آزمون ABTS

جدول 3 قدرت اسانس برگ نارنج در مهار رادیکال ABTS را نشان می‌دهد. همان‌گونه که مشخص است رابطه مستقیمی بین غلظت اسانس و قدرت مهارکنندگی آن وجود داشت و از این نظر در سطح احتمال 1 درصد اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف اسانس وجود داشت. بر اساس نتایج به‌دست آمده بیش‌ترین فعالیت ضدرادیکالی مربوط به غلظت 10 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اسانس برگ نارنج بوده که دارای بازدارندگی 64/13٪، معادل غلظت 0/098 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آسکوربیک اسید می‌باشد. طاهانژاد و همکاران (1391)، فعالیت ضدرادیکالی عصاره پنیرک در سامانه روغن سویا را مورد بررسی قرار داده و نتایج حاصل از آزمون ABTS

جدول (3) درصد بازدارندگی و ظرفیت ضداکسیدانی معادل آسکوربیک اسید غلظت‌های مختلف اسانس برگ نارنج

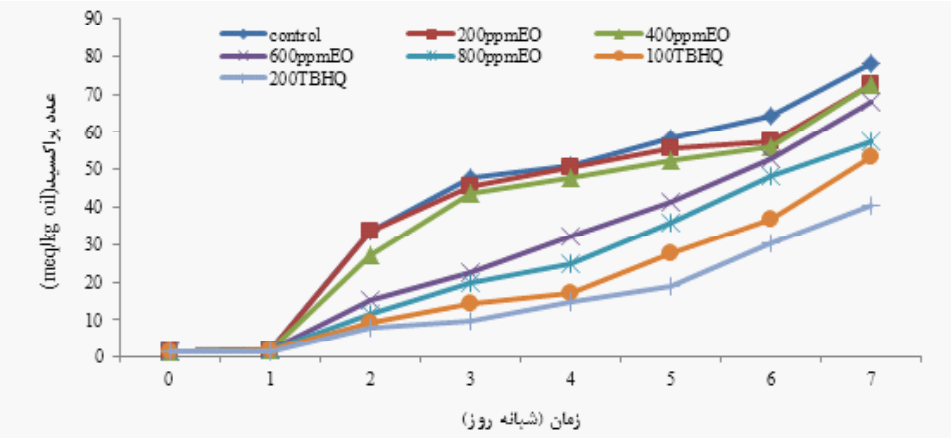
غلظت (mg/mL)	درصد بازدارندگی	ظرفیت ضداکسیدانی معادل آسکوربیک اسید (mg/mL)
0/2	21/04±0/601 e	0/032±0/011 e
0/5	32/21±4/567 d	0/050±0/007 d
1	45/79±1/499 c	0/071±0/002 c
2	51/52±0/360 bc	0/080±0/021 bc
5	55/43±2/404 b	0/086±0/003 b
10	64/13±2/701 a	0/098±0/002 a

داده‌ها میانگین سه تکرار ± انحراف معیار است. حروف مختلف در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح 1 درصد است.

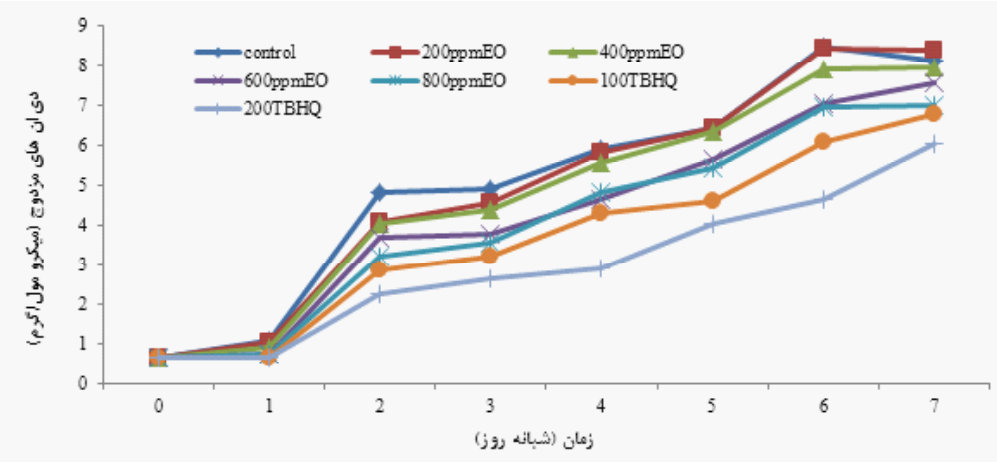
نشان داد، بیش‌ترین فعالیت ضدرادیکالی مربوط به غلظت 5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پنیرک بوده که دارای بازدارندگی 70 ٪ معادل آسکوربیک اسید با غلظت 0/14 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به عنوان یک ضداکسنده بود [32]. سیاهپوش و امرایی (2011) ظرفیت ضدرادیکالی عصاره‌های مختلف گیاه گونه ایگون را با انجام آزمون‌های DPPH و ABTS مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد میزان مهار رادیکال ABTS بر مبنای ترولکس برای عصاره تام، کلروفرمی، پلی‌فنلی و آبی به ترتیب معادل 29/38، 14/55، 21/29 و 24/22 بود [33]. در این آزمون نتایج نشان داد اسانس برگ نارنج در مقایسه با سایر منابع ضدرادیکالی طبیعی ذکر شده، دارای قدرت به‌نسبت خوبی در مهار رادیکال‌های ABTS و DPPH می‌باشد، که مطابق با گزارش ترابلسی و همکاران (2014) بود [16]؛ ولی با گزارش الوز و همکاران (2014) منطبق نبود [17]. اگرچه روش DPPH به منظور ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس گیاهان مختلف به کار می‌رود، ولی استفاده از آزمون ABTS به دلیل نزدیک‌تر بودن شرایط محیطی آزمون به شرایط فیزیولوژیکی و هم‌چنین چون اساس آن بر پایه انتقال الکترون و با سرعت بیش‌تری بوده، اغلب از این آزمون در کنار روش DPPH استفاده می‌گردد و هر دو آزمون فوق مبین فعالیت ضداکسایشی متوسط تا خوب اسانس برگ نارنج می‌باشند. وجود ترکیباتی نظیر گالیک اسید، نارینجین، کامفرول نئوهسپریدین در اندام‌های مختلف نارنج می‌توانند به‌عنوان عوامل اصلی فعالیت ضداکسیدانی برگ نارنج بیان شوند زیرا این ترکیبات با اتصال به ترکیبات اکسیدکننده، مانع از فعالیت اکسایشی آن‌ها می‌گردند [29-30].

5-3- اثر ضداکسیدانی اسانس برگ نارنج در روغن سرخ کردنی

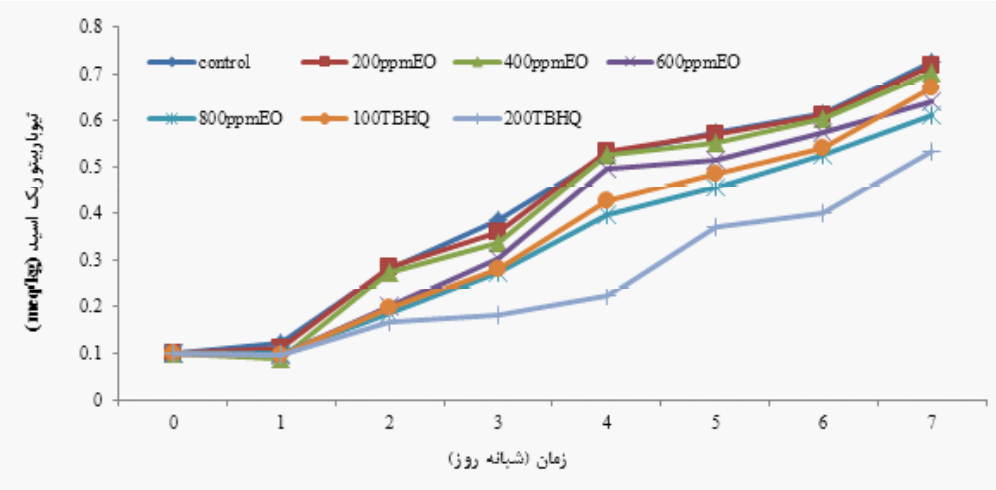
فعالیت ضداکسیدانی اسانس برگ نارنج در روغن سرخ کردنی در مدت زمان 7 شبانه روز در دمای 90 درجه سانتی‌گراد، برحسب اعداد پراکسید، دی‌ان مزدوج، تیوباربیتوریک اسید و p- آنیزیدین به ترتیب در شکل‌های 2، 3، 4 و 5 نشان داده شده است. همان‌گونه که در شکل 2 مشاهده می‌شود، روند افزایشی عدد پراکسید از روز دوم آزمون آغاز شده و وابسته به غلظت تیمارها بوده و با افزایش غلظت تیمارها عدد پراکسید افزایش کم‌تری نشان داده است. از این رو بین غلظت‌های مختلف اسانس و ضداکسیدان TBHQ در سطح احتمال 1 درصد ($P<0/01$) اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید. هم‌چنین مشاهده شد که تیمارهای 200 و 400 ppm اسانس، تاثیر چندانی بر کاهش عدد پراکسید نداشته اما در غلظت‌های بالاتر اسانس، نمونه روغن نسبت به بالا رفتن عدد پراکسید مقاومت نشان می‌دهد که این امر به دلیل افزایش ترکیبات فنولی در غلظت‌های بالاتر اسانس می‌باشد. بنابراین روند کاهش عدد پراکسید در غلظت‌های 600 و 800 ppm اسانس به‌طور کامل مشهود است. اما در مقایسه با هر دو سطح 100 و 200 ppm TBHQ دارای اثر کم‌تری می‌باشد. یساری



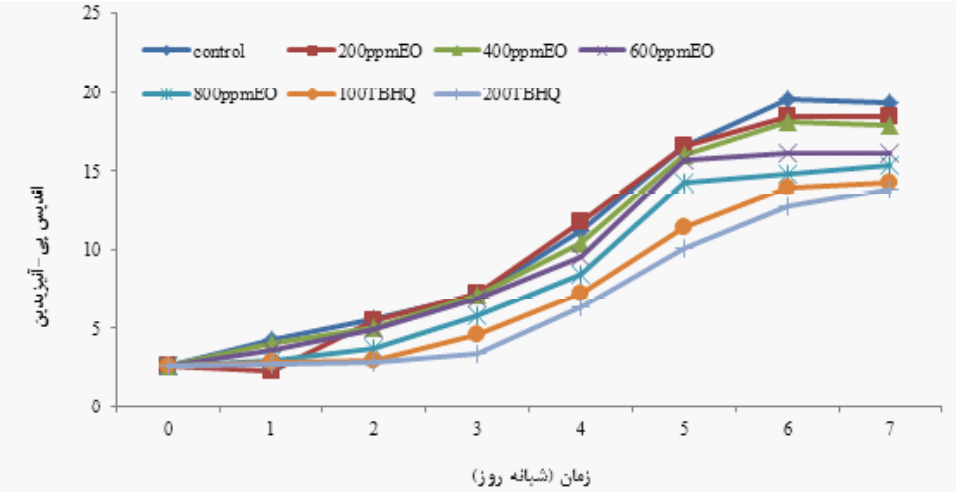
شکل(2) فعالیت ضداکسیدانی اسانس برگ نارنج بر حسب عدد پراکسید



شکل (3) فعالیت ضداکسیدانی اسانس برگ نارنج بر حسب دی‌ان مزدوج



شکل (4) فعالیت ضداکسیدانی اسانس برگ نارنج بر حسب تیوباربیتوریک اسید



شکل (5) فعالیت ضداکسیدانی اسانس برگ نارنج برحسب p- آنیزیدین

و همکاران (2013) تاثیر اسانس پوست پرتقال تامسون در پایداری روغن کانولا را مورد بررسی قرار داده نتایج نشان داد، اسانس در غلظت‌های 1000، 2000 و 3000 ppm قادر به جلوگیری از افزایش عدد پراکسید می‌باشد، اما در هر سه غلظت دارای تاثیر ضعیف‌تری نسبت به ضداکسیدان سنتزی TBHQ در سطح غلظتی 100 ppm می‌باشد [34].

از دیگر روش‌هایی که جهت بررسی مراحل اولیه اکسایش می‌توان از آن استفاده کرد، تعیین میزان دی‌ان‌های مزدوج تولید شده است که افزایش در میزان تولید این محصولات، شاخصی از پیشرفت مراحل اولیه اکسایش می‌باشد. وجود این آزمون در کنار آزمون عدد پراکسید می‌تواند نقش مکمل را داشته باشد. لذا در این تحقیق از این آزمون نیز استفاده شد. در شکل 3 روند تغییرات دی‌ان‌های مزدوج و تاثیر تیمارهای مختلف در مدت زمان 7 شبانه‌روز نشان داده شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود افزایش دی‌ان‌های مزدوج به آرامی از روز اول آزمون آغاز شده و وابسته به غلظت تیمارها بوده و بین غلظت‌های مختلف اسانس و ضداکسیدان TBHQ تفاوت معنی‌داری در سطح 1 درصد (P<0/01) مشاهده شد. در این آزمون هم مانند آزمون عدد پراکسید اسانس در غلظت‌های بالاتر خود (600 و 800 ppm) به مراتب تاثیر بیش‌تری بر جلوگیری از افزایش دی‌ان‌های مزدوج داشته، ولی باز هم تاثیر ضعیف‌تری نسبت به TBHQ از خود نشان داده است. با بررسی‌های صورت گرفته مشخص گردید که ترتیب فعالیت ضداکسیدانی سطوح مختلف مورد سنجش اسانس برگ نارنج در این آزمون با نتایج به‌دست آمده از آزمون عدد پراکسید به‌طور کامل مطابقت داشت.

آزمون‌هایی هم‌چون تعیین عدد پراکسید و دی‌ان مزدوج به تنهایی مشخص‌کننده اکسایش روغن نمی‌باشند. زیرا تنها شاخص وجود محصولات اولیه اکسایش بوده و چنان‌چه اکسایش در سطح پیشرفته‌تری رخ داده باشد، ترکیبات ثانویه‌ای تولید می‌شود که این آزمون‌ها قادر به شناسایی این ترکیبات و تعیین پیشرفت اکسایش نیستند. بنابراین وجود آزمون‌هایی هم‌چون تیوباربیتوریک اسید (TBA) و P-آنیزیدین به‌عنوان شاخصی از میزان پیشرفت اکسایش و تولید محصولات ثانویه ضروری به نظر می‌رسد. شکل 5 روند تغییرات عدد TBA و شکل 5 روند تغییرات P-آنیزیدین در مدت زمان آزمون را نشان می‌دهد. با توجه به نتایج شکل 4، اختلاف معنی‌داری میان غلظت‌های مختلف اسانس، ضداکسیدان و نمونه شاهد (P<0/01) مشاهده شد.همان‌گونه که ملاحظه می‌شود بیش‌ترین فعالیت ضداکسایشی بعد از غلظت 200 ppm از TBHQ، مربوط به غلظت 800 ppm اسانس می‌باشد که دارای اثر ضداکسیدانی بالاتری نسبت به غلظت 100 ppm از TBHQ است. هم‌چنین در روزهای اول و دوم آزمون، اختلاف معنی‌داری بین غلظت 600 ppm اسانس و 100 ppm از TBHQ (P< 0/01) مشاهده نشد. اما در روز هفتم آزمون غلظت 600 ppm اسانس اثر ضداکسایشی بالاتری نسبت به غلظت 100 ppm از TBHQ، از خود نشان

داد. در مقابل غلظت‌های 200 و 400 ppm اسانس، فعالیت ضداکسایشی چندانی نداشته و حتی در بعضی روزها اختلاف معنی داری با نمونه شاهد (P< 0/01) نشان ندادند. با توجه به نتایج شکل 6، اختلاف معنی‌داری بین غلظت 800 ppm اسانس و غلظت‌های 100 و 200 ppm از TBHQ در روز نخست آزمون (P < 0/01) وجود نداشت، اما از روز دوم به بعد اختلاف معنی‌دار شده و غلظت 800 ppm اسانس اثر کم‌تری در جلوگیری از افزایش P-آنزیدین نسبت به هر دو غلظت TBHQ داشته است. در این‌جا باز هم غلظت‌های 200 و 400 ppm اسانس اثر چندانی در کاهش P-آنیزیدین نداشته و تا حدودی می‌توان گفت که غلظت 600 ppm در جلوگیری از افزایش P-آنیزیدین نسبت به نمونه شاهد موثر بوده است.

جدول 4 مقایسه میانگین اعداد پراکسید، دی‌ان مزدوج، PTBA-آنیزیدین و اندیس توتوکس (مجموع ترکیبات اولیه و ثانویه اکسایش) در روز هفتم آزمون را نشان می‌دهد. همان‌گونه که مشخص است در روز هفتم بین غلظت 800 ppm اسانس و 100 ppm از TBHQ در آزمون‌های عدد پراکسید، دی‌ان‌های مزدوج و اندیس توتوکس تفاوت معنی‌داری در سطح 1 درصد (P<0/01) وجود ندارد. از طرفی در آزمون تیوباربیتوریک اسید در روز هفتم هر دو سطح غلظت‌های 600 و 800 ppm اسانس بهتر از غلظت 100 ppm از TBHQ عمل کرده و موجب کاهش بیش‌تر اکسایش شده است و از این نظر دارای تفاوت معنی‌دار با غلظت 100 ppm از TBHQ (P<0/01) می‌باشد. در بررسی اندیس توتوکس مشخص گردید غلظت 800 ppm اسانس دارای بیش‌ترین فعالیت ضداکسیدانی بوده، در حالی‌که غلظت‌های 200 و 400 ppm تاثیر چندانی در کاهش روند اکسایش نداشته و حتی در روز هفتم فاقد اختلاف معنی‌دار با نمونه شاهد (P<0/01) بوده است.

همان‌طور که جدول 4 نشان می‌دهد با افزایش غلظت اسانس مورد مطالعه از 200 تا 800 ppm، بر قدرت آنتی اکسیدانی آن افزوده شده است. به‌طوری‌که در کاربرد غلظت‌های 200 و 400 ppm اسانس (به‌جز در عدد p-آنیزیدین) تفاوت معنی‌داری در جلوگیری از پیشرفت اکسیداسیون روغن، در مقایسه با نمونه شاهد، مشاهده نشد. حتی در آزمون عدد آنیزیدین هم، هرچند میزان پیشرفت اکسیداسیون روغن حاوی این دو سطح اسانس در مقایسه با نمونه شاهد کم‌تر بود، ولی باز هم میزان اکسیداسیون روغن حاوی این سطوح اسانس در مقایسه با روغن حاوی هر دو سطح 100 و 200 ppm آنتی‌اکسیدان سنتزی، به شکل معنی‌داری بیش‌تر بود؛ که این نشانگر ضعف فعالیت آنتی‌اکسیدانی این اسانس در غلظت‌های کم (ppm 400 یا کم‌تر از آن) می‌باشد. این پدیده می‌تواند ناشی از کمبود مواد موثره دارای خواص آنتی‌رادیکالی نظیر ترکیبات فنولیک در غلظت‌های کم اسانس باشد. اما همان‌طور که مشخص است با افزایش غلظت اسانس، قدرت آنتی‌اکسیدانی آن به شکل معنی‌داری افزایش پیدا کرده به‌طوری‌که تمام آزمون‌های مورد استفاده، افزایش ثبات اکسیداتیو روغن حاوی 800 ppm اسانس در مقایسه با روغن حاوی 600 ppm و یا مقادیر کم‌تر اسانس را تایید کردند. هم‌چنین این آزمون‌ها ثبات بالاتر اکسیداتیو روغن‌های حاوی 600 و 800 ppm اسانس در مقایسه با نمونه شاهد را به اثبات رساندند. نتایج به‌دست آمده از آزمون‌های به‌کار رفته در این بررسی نشان داد فعالیت آنتی‌اکسیدانی غلظت 800 ppm اسانس در مقایسه با غلظت 100 ppm آنتی‌اکسیدان سنتزی TBHQ، تفاوت معنی‌داری نداشته و آزمون‌های عدد TBA و p-آنیزیدین قدرت بالاتر آنتی‌اکسیدانی غلظت 800 ppm اسانس در مقایسه با غلظت 100 ppm آنتی‌اکسیدان TBHQ را به اثبات رساندند. هرچند نتایج به‌دست آمده از اکثر آزمون‌ها نشانگر ضعیف‌تر بودن فعالیت آنتی‌اکسیدانی غلظت 800 ppm اسانس در مقایسه با غلظت 200 ppm آنتی‌اکسیدان سنتزی بود، اما با توجه به این واقعیت که امروزه در صنعت روغن، در روغن‌های خوراکی معمولی (روغن سالاد و روغن مخصوص پخت و پز) و روغن‌های مخصوص سرخ‌کردنی به‌ترتیب از غلظت‌های 100 و 120 ppm از TBHQ استفاده می‌شود، و نیز با توجه به اثبات عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین قدرت آنتی‌اکسیدانی غلظت 800 ppm اسانس و 100 ppm آنتی‌اکسیدان TBHQ، داشتن پتانسیل جایگزینی این اسانس به‌عنوان یک ترکیب طبیعی دارای خواص ضداکسیدانی با آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی، به اثبات رسید.

3-6- آزمون ارزیابی حسی

جدول 5 نتایج مقایسه میانگین آزمون ارزیابی حسی نمونه‌های

روغن را نشان می‌دهد. بر اساس نتایج به‌دست آمده نمونه‌های روغن حاوی اسانس برگ نارنج از لحاظ ظاهر و رنگ، طعم و مزه و بو با نمونه‌های روغن شاهد و حاوی ضداکسیدان TBHQ تفاوت معنی داری (P<0/01) نداشتند. در واقع این نتایج نشان می‌دهد که اسانس برگ نارنج تا سطح غلظتی 800 ppm، تغییر نامطلوب و محسوسی در خصوصیات ارگانولپتیکی روغن ایجاد نکرده و از دید مصرف کننده، تفاوتی بین نمونه‌های روغن حاوی اسانس برگ نارنج و نمونه‌های فاقد آن، از لحاظ رنگ و ظاهر، طعم و مزه و بو وجود نداشت.

4-نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد اسانس برگ نارنج حاوی مقادیر قابل توجه از ترکیبات فنولیک بوده و آزمون‌های مختلف، خاصیت ضد اکسایشی آن را تصدیق می‌کند. هم‌چنین ارزیابی حسی نشان داد که این اسانس تا غلظت 800 ppm تغییر محسوس و نامطلوبی در خصوصیات ارگانولپتیکی روغن ایجاد نمی‌کند. بنابراین اسانس برگ نارنج به عنوان یک ضداکسیدان طبیعی توانایی واکنش با رادیکال‌های آزاد ناشی از اکسایش را داشته و در صورت خالص‌سازی می‌توان انتظار داشت حتی در غلظت‌های پایین‌تر بتواند به نحو موثری از پیشرفت اکسایش جلوگیری کرده و روند اکسایش را کند نماید. از این رو امکان استفاده از آن در آینده، پس از انجام آزمون‌های تکمیلی به‌عنوان یک ضداکسیدان طبیعی در روغن‌های خوراکی وجود خواهد داشت.

جدول (4) مقایسه میانگین اعداد پراکسید (میلی‌اکی‌والان/ کیلوگرم)، دی‌ان مزدوج (میکرومول/گرم)، TBA (میلی‌اکی‌والان/کیلوگرم)، P-آنیزیدین و اندیس توتوکس

تیمارها	عدد پراکسید	دی‌ان مزدوج	عددTBA	P- آنیزیدین	اندیس توتوکس
شاهد	78/2±1/414 a	8/15±0/035 a	0/72±0/007 a	19/31±0/141 a	168/71±2/969 a
اسانس 200 ppm	72/6±1/979 a	8/39±0/049 a	0/72±0/001 a	18/4±0/183 b	163/60±4/143 a
اسانس 400 ppm	72/6±0/848 a	7/94±0/ 268 ab	0/70±0/007 ab	17/86±0/091 b	163/06±1/788 a
اسانس 600 ppm	68±4/525 a	7/57±0/403 b	0/64±0/001 cd	16/13±0/148 c	152/13±8/902 a
اسانس 800 ppm	57/6±0/565 b	7/01±0/240 c	0/610±0/014 d	15/30±0/572 d	130/50±1/704 b
TBHQ 100 ppm	53/2±1/131 b	6/805±0/049 c	0/670±0/014 bc	14/21±0/254 e	120/61±2/517 b
TBHQ 200 ppm	40/2±3/111 c	6/05±0/113 c	0/535±0/035 e	13/84±0/615 e	76/24±9/848 c

*حروف مشابه در هر ستون نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار (P<0/01) می‌باشد. نتایج میانگین سه تکرار ± انحراف معیار می‌باشد.

جدول (5) مقایسه میانگین صفات مورد بررسی (رنگ و ظاهر، طعم و مزه و بو) در آزمون ارزیابی حسی تیمارهای مختلف

تیمار	صفات مورد بررسی		
	رنگ و ظاهر	طعم و مزه	بو
شاهد	9/5±0/707 a	8/3±0/919 a	8±1/414 a
اسانس 200 ppm	8/3±0/494 a	8/5±0/707 a	7/9±1/272 a
اسانس 400 ppm	8/8±0/282 a	8/6±1/979 a	8/5±1/484 a
اسانس 600 ppm	8/9±0/141 a	9±1/414 a	8/7±0/989 a
اسانس 800 ppm	8/5±0/707 a	7/9±0/777 a	7/25±1/767 a
TBHQ 100 ppm	8/3±0/494 a	8/3±0/989 a	7/4±1/979 a
TBHQ 200 ppm	9/4±0/848 a	8/5±0/707 a	8/1±1/555 a

*حروف مشابه در هر ستون نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار (P<0/01) می‌باشد. نتایج میانگین سه تکرار ± انحراف معیار می‌باشد.

منابع

[1] Marinova, E.M., Seizova, K.A., Totseva, I.R., Panayotova, S., Marekov, N., Momchilova, M. (2012). Oxidative changes in some vegetable oils during heating at frying temperature. *Bulgarian Chemical Communications*., 44(1), 6- 57.

[2] Prior, R. L. (2004). Absorption and metabolism of anthocyanins: Potential health effects, in: Meskin, M., Bidlack, W.R., Davies, A.J., Lewis, D.S., Randolph, R.K. (Eds.), *Phytochemicals*: *Mechanisms of Action.*, Boca Raton., FL: CRC Press, pp 1–19.

[3] Mahdavi, D.L., Deshpande, S.S., Salunkhe, D.K. (1995). *Food Antioxidant*, 1st ed., New York, Marcel Dekker, Inc U.S.A, pp 54-102.

[4] Lee, S.J., Umano, K., Shibamoto, T., Lee, K.G. (2005). Identification of volatitle components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *J. Food Chem.*, 91, 131-7.

[5] Mokbel, M.S., Watanabe, Y., Hashinaga, F., Suganuma, T. (2006). Purification of antioxidant and antimicrobial substance of Ethyl acetate from Buntan (*Citrus grandisosbeck*) Fruit peel. *Pakistan J. Bio. Sci*., 9 (1), 1445-50.

[6] عدولی، ب.؛ راهب، س.؛ گلعین، ب. (1384) ارقام و پایه‌های مرکبات. نشریه *ترویجی سازمان جهاد کشاورزی استان مازندران*، ص 28-14.

[7] Moraes, T.M., Kushima, H., Moleiro, F.C., Santos, R.C., Machado Rocha, L.R., Marques, M.O., Vilegas, W., Hiruma-Lima, C.A. (2009). Effects of limonene and essential oil from (*Citrus aurantium*) on gastric mucosa: Role of prostaglandins and gastric mucus secretion. *J. Chem. Bio. Int.*, 180, 499–505.

[8] امامی، ا.؛ آهی، ع. (1387) *گیاه شناسی دارویی*. دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ص 82- 25.

[9] Choi, H.S., Song, H.S., Ukeda, H., Sawamura, M. (2000). Radical-scavenging activities of citrus essential oils and their components: Detection using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *J. Agr. Food Chem.*, 48, 4156–4161.

[10] Kirbaşlar, F.G., Tavman, A., Dülger, B., Türker, G. (2009). Antimicrobial activity of Turkish Citrus peel oils. *Pakistan J. Bot*., 41, 3207–3212.

[11] Wei, A., Shibamoto, T. (2010). Antioxidant/lipoxygenase inhibitory activities and chemical compositions of selected essential oils. *J. Agr. Food Chem*., 58, 7218–7225.

[12] Sonbol, F., Ibrahim, S.M., Mohamed, B.M. (1992). Antimicrobial activity of oil of bitter orange. *Alexandria J. Phar. Sci*., 9, 107–109.

[13] Song, H.S., Ukeda, H., Sawamura, M. (2001). Antioxidative activities of Citrus peel essential oils and their components against linoleic acid oxidation. *Food Sci. Technol. Res*., 7, 50–56.

[14] Majnooni, M.B., Mansouri, K., Gholivand, M.B., Mostafaie, A., Mohammadi-Motlagh, H.R., Afnanzade, N.S., Abolghasemi, M.M., Piriyaei, M.(2012). Chemical composition, cytotoxicity and antioxidant activities of the essential oil from the leaves of *Citrus aurantium* L. *Afr. J. Bio*., 11(2), 498-503.

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

[16] Trabelsi, D., Ammar, A.H., Bouabdallah, F., Zagrouba, F. (2014). Antioxidant and antimicrobial activities of essential oils and. methanolic extracts of Tunisian *Citrus aurantium* L. *J. Environ. Sci., Toxicology, Food Tech*., 8(5), 18-27.

[17] Ellouze, I., Abderrabba, M., Sabaou, N., Mathieu,

الگوریتم ژنتیک. *پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران*، جلد 10، شماره 1، ص26-15.

[27] مصدق، م.؛ کمالی‌نژاد، م.؛ شریف آبادی، آ.؛ اصفهانی، ب. (1383) بررسی و مقایسه روغن فرار حاصل از برگ سه گیاه نارنج، لیمو ترش و نارنگی. فصلنامه *گیاهان دارویی*، شماره 11، ص 30-25.

[28] Karimi, E., Oskoueian, E., Hendra, R., Oskoueian, A., Hawa, Z.E. (2012). Phenolic compounds characterization and biological activities of *Citrus aurantium* Bloom. *Molecules.*, 17, 1203-1218.

[29] Garau, M.C., Simal, S., Rossello, C., Femenia, A. (2007). Effect of air-drying temperature on physico-chemical properties of dietary fibre and antioxidant capacity of orange (*Citrus aurantium* v. Canoneta) by-products. *Food Chem.*, 104, 1014-1024.

[30] Moulehi, I., Bourgou , S., Ourghemmi, I., Tounsi, M.S. (2012). Variety and ripening impact on phenolic composition and antioxidant activity of mandarin (*Citrus reticulate* Blanco) and bitter orange (*Citrus aurantium* L.) seeds extracts. *Ind. Crop. Prod.*, 39, 74-80.

[31] Ben Hsouna, A., Hamdi, N., Ben Halima, N., Abdelkafi, S. (2013). Characterization of essential oil from *Citrus aurantium* L. flowers: antimicrobial and antioxidant activities. *J. Oleo Sci.*, 10, 763-72.

[32] طاها نژاد، م.؛ برزگر، م.؛ سحری، م. ع.؛ نقدی بادی، ح. (1391) ارزیابی فعالیت ضدرادیکالی عصاره پنیرک و کاربرد آن در سامانه روغن. فصلنامه *گیاهان دارویی*، سال یازدهم، دوره 2، شماره 42، ص86-97.

[33] Siahpoosh, A., Amraee, F. (2011). Antioxidant capacity of various extracts of *Asteragalus Morinus* boiss aerial parts. *J. Shahid Sadoughi University of Medical Sciences.*, 19, 437-444.

[34] Yassari, S., Yasari, E. (2013). Effects of extracts of Thompson orange peels on the stability of canola oil. *Int. J. Agr. Crop Sci.*, 5(5), 410-420.

[17] Ellouze, I., Abderrabba, M., Sabaou, N., Mathieu, F., Lebrihi, A., Bouajila, J. (2012). Season's variation impact on *Citrus aurantium* leaves essential oil: chemical composition and biological activities. *J. Food Sci.*, 77(9), 173-180.

[18] Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticult.*, 16, 144–153.

[19] Burits, M., Bucar, F. (2000). Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *J. Phyto. Res.*, 14, 323–328.

[20] Halliwell, B., Guteridge, J.M.C. (1989). *Free Radicals in Biology and Medicine*, 2nd ed., Clarendon Press, Oxford, UK, pp 78-120.

[21] AOCS. (1998). *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemist's Society*, 5th Ed., pp. 8–53.

[22] Roozen, J., Frankel, E., Kinsella, J. (1994). Enzymic and auto-xidation of lipids in low fat foods: model of linoleic acid in emulsion hexadecane. *J. Food Chem.*, 50, 33-38.

[23] McDonald, R.E., Hultin, H.O. (1987). Some characteristics of the enzymic lipid peroxidation system in the microsomal fraction of flounder skeletal muscle. *J. Food Sci.*, 52, 15-21, 27.

[24] IUPAC standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives. (1987). *Determination of the p-Anisidine Value*, Oxford: Alden Press. Method 2.504, 7th ed., pp 210–211.

[25] Wanasundara, U.N., Shahidi, F. (1995). Storage stability of microencapsulated seal blubber oil. *J. Food Lipids.*, 2, 73–86.

[26] هاشمی شهرکی، م.، ضیایی فر، الف. م.، کاشانی نژاد، م. و قربانی، م. (1393) بهینه سازی اعمال نیروی گریز از مرکز جهت کاهش جذب روغن با استفاده از روش سطح پاسخ و