

فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره پوست نارنج و تأثیر آن بر اکسیداسیون چربی گوشت خام و پخته ماهی *Hypophthalmichthys molitrix*

زهرا گلی^۱، مصطفی لکزایی^۱، مهدی پور امیر^۲

۱- کارشناس ارشد بیوشیمی، گروه بیوشیمی بیوفیزیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل
۲- نویسنده مسئول: دانشیار گروه بیوشیمی بیوفیزیک، مرکز تحقیقات سلولی-ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی بابل
پست الکترونیکی: Pouramir@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۸۹/۱/۲۹

تاریخ دریافت: ۸۸/۷/۱

چکیده

سابقه و هدف: پوست مرکبات، محصول فرعی صنایع آب‌میوه، یک منبع آنتی‌اکسیدانی طبیعی است. نیاز به آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در صنایع غذایی، آرایشی و دارویی باعث تحقیقات علمی گسترده‌ای در این زمینه در دهه‌های اخیر شده است. هدف از این پژوهش، بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره پوست داخلی (مزوکارپ) نارنج و تعیین پایداری آن با روش FRAP و اثر حفاظتی‌اش بر اکسیداسیون لیپیدی گوشت خام و پخته ماهی با استفاده از آزمایش TBARS بود.

مواد و روش‌ها: پوست داخلی (مزوکارپ) نارنج با حلال اتانول عصاره‌گیری و محلول آبی عصاره در شرایط متفاوت (روشنایی، تاریکی آزمایشگاه، یخچال و فریزر) و به مدت یک ماه ذخیره شد. میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی و دوام این فعالیت در محلول آبی عصاره در شرایط متفاوت ذخیره‌سازی با روش FRAP (Ferric reducing antioxidant power) و اثر حفاظتی آن بر اکسیداسیون چربی با آزمایش TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances) در کوتاه مدت (۹۰ دقیقه) و بلند مدت (۱۴ روز) بررسی شد.

یافته‌ها: مقدار FRAP محلول آبی ۰/۱ درصد عصاره در زمان صفر ۵۷۰ میکرومولار بود که این مقدار در دمای آزمایشگاه و طی یک ماه در حدود ۱۴٪ کاهش یافت ($p=0/007$). مقدار FRAP محلول آبی ۰/۰۵ درصد ویتامین C در زمان صفر ۵۴۱ میکرومولار بود که این مقدار در دمای آزمایشگاه و پس از یک ماه در حدود ۷۷٪ کاهش یافت ($p<0/001$). مقدار TBARS در نمونه ماهی خام فاقد عصاره، در زمان صفر ۱/۳۲ میکرومولار بود که پس از طی ۱۴ روز به ۳/۱۷۳ میکرومولار افزایش یافت؛ در حالی که در نمونه حاوی محلول آبی ۵٪ عصاره این مقدار از ۰/۹۲ میکرومولار در زمان صفر به ۱/۰۹ میکرومولار طی ۱۴ روز رسید ($p<0/005$). مقدار TBARS در نمونه ماهی پخته فاقد عصاره، در زمان صفر ۲/۲۸ میکرومولار بود که پس از طی ۱۴ روز به ۵/۸۵ میکرومولار افزایش یافت ($p<0/001$) در حالی که در نمونه حاوی محلول آبی ۵٪ عصاره این مقدار از ۱/۷۷ میکرومولار در زمان صفر به ۳/۱۱ میکرومولار طی این مدت رسید ($p<0/001$).

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل نشان دهنده وجود فعالیت آنتی‌اکسیدانی با دوام بالا در مدت ذخیره سازی و اثر حفاظتی عصاره مزوکارپ نارنج بر اکسیداسیون چربی بود.

واژگان کلیدی: پوست نارنج، آنتی‌اکسیدان، اکسیداسیون چربی، FRAP، TBARS، گوشت ماهی

• مقدمه

بین مصرف بالای میوه و کاهش نرخ مرگ و میر و شیوع بیماری‌های قلبی عروقی و سرطان پی برده‌اند (۳). از یک سو، در صنعت غذا و مصارف خانگی، مقدار زیادی محصول فرعی تولید می‌شود که خواستار حذف آن هستند. مواد گیاهی که به عنوان مواد زائد در این صنعت تولید می‌شود، میزان بالایی ترکیبات فنلی دارند که برای محیط زیست مضر است (۴)، ولی از سوی دیگر، اثرات مثبت آنها

ROS و RNS به ترتیب گونه‌های فعال اکسیژنی و نیتروژنی هستند که نقش آنها در بسیاری از فرایندهای پاتولوژیک و بیماری‌ها مشخص شده است (۱). میوه‌ها برای سلامتی بدن مفید هستند و در سال‌های اخیر توجه بیشتری به محتوا و فعالیت آنتی‌اکسیدانی میوه‌ها و اثر آنها در کاهش تخریب ملکول‌های بیوشیمیایی شده است (۲). زیرا محققان در مطالعات اپیدمی شناسی به رابطه

شد. سپس توسط دستگاه آسیاب کننده (TEAFALL) پودر و از غربال با مش ۸۰ عبور داده شد.

آماده‌سازی عصاره: طبق روش Li و همکاران (۱۴) ۴۰ گرم پودر مزوکارپ نارنج، در ۳۲۰ ml اتانول ۷۲٪ (Merck آلمان) مخلوط شد و به مدت ۳ ساعت در بن ماری ۸۰°C قرار داده شد. سوسپانسیون حاصل در لوله‌های آزمایش ریخته شد و به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. مایع رویی با کاغذ صافی واتمن شماره ۴۲ صاف شد و تفاله باقیمانده تحت شرایط ذکر شده دوباره عصاره‌گیری شد. در مرحله بعد، محلول‌های حاصل از صاف کردن با یکدیگر مخلوط شد و با استفاده از دستگاه تبخیر کننده چرخان (IKA-Werk) تغلیظ شد. ماده تغلیظ شده، در زیر هود و در دمای اتاق خشک شد و سپس تا زمان مصرف در فریزر ۲۰°C- نگهداری شد.

سنجش FRAP: روش شرح داده شده توسط Benzie و Strain (۱۵) مورد استفاده قرار گرفت. معرف FRAP حاوی ۲/۵ ml از محلول ۱۰ mM TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazin) در ۴۰ mM HCl به اضافه ۲/۵ ml از ۲۰ mM FeCl₃ و ۲۵ ml از بافر استات ۰/۳M با pH=۳/۶ تازه تهیه شد و به دمای ۳۷°C رسانده شد.

برای انجام این آزمایش ابتدا محلول آبی ۰/۰۲۵، ۰/۰۵ و ۰/۱ درصد (w/v) عصاره و محلول آبی ۰/۰۰۵ درصد (w/v) اسید آسکوربیک به عنوان کنترل مثبت تهیه شد و از صافی ۰/۲۲ میکرون (شرکت Rosch، آلمان) صاف شد و در ظرف‌های استریل و سر بسته قرار گرفت. ظرف‌ها در ۴ مکان، روشنایی (دمای آزمایشگاه)، در تاریکی (دمای آزمایشگاه) یخچال (۴°C) و فریزر (۲۰°C-) قرار گرفتند.

محلول‌ها در زمان‌های مشخص شده (زمان صفر، روزهای ۳، ۷، ۱۴ و ۳۰) آزمایش شدند. به این صورت که ۱/۵ ml از محلول تازه تهیه شده FRAP (به نسبت ۱۰:۱:۱ از بافر استات، کلرید آهن و معرف TPTZ (شرکت Sigma آمریکا) درون لوله‌های آزمایش ریخته شد و به مدت ۵ دقیقه در بن ماری ۳۷°C قرار داده شد. سپس ۵۰ μl نمونه به لوله مربوطه اضافه شده و به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری ۳۷°C قرار داده شد. جذب در طول موج ۵۹۳nm با دستگاه اسپکتروفوتومتر در مقابل شاهد (۱/۵ ml محلول FRAP و ۵۰ μl آب مقطر) خوانده شد.

بر سلامتی انسان و خاصیت آنتی‌اکسیدانی آنها ثابت شده است (۵) نکته جالب اینکه دانه و پوست برخی میوه‌ها فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به گوشت (Pulp) آنها دارند (۳). نارنج از گونه مرکبات است و طی تحقیقات به عمل آمده، پوست آن را می‌توان یک منبع مناسب آنتی‌اکسیدان دانست (۶) که سطح بالایی فلاوانون دارد (۷). به علاوه، انواع گوناگونی از فلاونوئیدها با غلظت‌های متفاوت در پوست نارنج وجود دارند (۸).

تغییرات اکسیداتیو علاوه بر اثرات نامطلوب در سیستم‌های بیولوژیک، مسئول ایجاد طعم و پایین آمدن کیفیت غذا و فساد مواد غذایی است (۴). در ماهی، هیدرولیز و اکسیداسیون، هر دو باعث فساد و ایجاد طعم و بوی بد و تغییر در رنگ گوشت می‌شود (۹). هیدرولیز به وسیله لیپازها و فسفولیپازها القا می‌شود و اسید چرب آزاد می‌کند که تحت اکسیداسیون، ترکیباتی با وزن ملکولی کم تولید می‌کند (۱۰). این فرایند با حضور رادیکال‌های آزاد همراه است و به تولید آلدئیدهایی مانند مالون دی‌آلدئید منجر می‌شود که مسئول پیشرفت فساد و ایجاد طعم و بوی بد و تغییر در رنگ گوشت می‌شوند (۱۱). اکسیداسیون لیپیدی در ماهی می‌تواند تحت تأثیر عوامل بیرونی و درونی از قبیل ترکیب اسید چرب، غلظت پرواکسیدان‌ها، آهن فرو (Fe²⁺) اندوژن، میوگلوبین، آنزیم‌ها، pH، دما، اکسیژن و نیروی یونی قرار گیرد (۱۲).

برای مهار این تغییرات از آنتی‌اکسیدان‌ها استفاده می‌شود. بیشتر آنتی‌اکسیدان‌هایی که در صنعت به کار می‌روند، مانند: BHA (بوتیلید هیدروکسی آنیزول) و BHT (بوتیلید هیدروکسی تولوئن) مصنوعی هستند. در مطالعات انجام شده، اثرات سمی و سرطان‌زایی برخی آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی نشان داده شده است (۱۳)

هدف از انجام این مطالعه، بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره پوست داخلی (مزوکارپ) نارنج و بررسی پایداری آن با روش FRAP و اثر حفاظتی‌اش بر اکسیداسیون لیپیدی گوشت خام و پخته ماهی با استفاده از آزمایش TBARS بود.

• مواد و روش‌ها

آماده‌سازی نمونه: نارنج (*Citrus aurantium, L*) از باغ‌های منطقه واجارگاه (رودسر) تهیه شد. پوست داخلی (مزوکارپ) نارنج محلی جدا و در دمای حدود ۳۰°C خشک

دقیقه در ۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ و جذب مایع رویی در طول موج ۵۳۲ nm با دستگاه اسپکتروفتومتر در مقابل شاهد خوانده شد. اندازه‌گیری با سه بار تکرار انجام شد.

آنالیز داده‌ها: نتایج به صورت Mean±SD گزارش شد و با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) از نظر آماری بررسی و $p < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

• یافته‌ها

در عصاره‌گیری از ۴۰g پودر، ۱۰/۲ g عصاره حاصل شد که راندمانی برابر با ۲۶/۲۵٪ داشت.

سنجش FRAP: مقادیر FRAP حاصل از آزمایش روی محلول آبی ۰/۰۲۵، ۰/۰۵ و ۰/۱ درصد عصاره مزوکارپ نارنج نشان دهنده افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدانی با افزایش غلظت عصاره است ($p < 0.001$) (شکل ۱).

مقدار FRAP محلول آبی ۰/۱ درصد عصاره در زمان صفر برابر $570 \mu\text{M}$ بود. مقایسه مقادیر FRAP در طول زمان در هر سری از نمونه‌های مربوط به روشنایی، تاریکی، یخچال و فریزر نشان داد که در هر چهار شرایط با افزایش زمان، مقادیر FRAP با کمی نوسان کاهش یافت؛ ولی این کاهش فقط در شرایط تاریکی آزمایشگاه معنی‌دار بود ($p < 0.05$). حداکثر این کاهش در روز ۱۴ و در حدود ۱۴٪ بود ($p = 0.007$)، (شکل ۲).

ویتامین C: مقدار FRAP محلول آبی ۰/۰۰۵ درصد ویتامین C در زمان صفر برابر $541 \mu\text{M}$ بود. مقادیر FRAP حاصل از آزمایش بر روی نمونه‌ها (غیر از شرایط فریزر) طی یک ماه نشان دهنده کاهش در طول زمان بود. به طوری که نمونه‌های روشنایی، تاریکی و یخچال پس از یک ماه به ترتیب ۷۴٪ ($p = 0.00$)، ۷۷٪ ($p = 0.00$) و ۷۲٪ درصد ($p < 0.001$) کاهش یافتند. اما در مورد نمونه‌های فریزر، پس از یک ماه افزایش ۱۵ درصدی مشاهده شد ($p = 0.002$)، (شکل ۳).

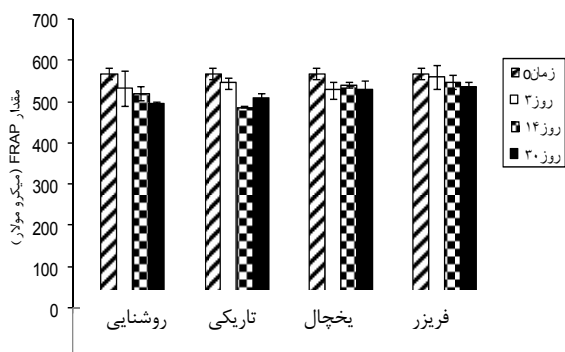
TBARS کوتاه مدت: غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۵ عصاره، TBARS را در زمان‌های ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه نسبت به کنترل کاهش داد ($p < 0.05$). بیشترین کاهش مربوط به غلظت ۰/۵ عصاره بود که تغییرات TBARS آن در طول زمان معنی‌دار نبود. (شکل ۴)

غلظت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های آزمایش با استفاده از نمونه‌های استاندارد (FeSO₄) در غلظت‌های ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار) و رسم منحنی استاندارد محاسبه شد.

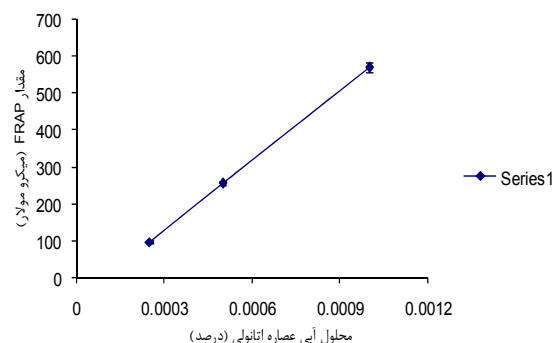
TBARS کوتاه مدت: روش Ahn و همکاران (۱۶) با کمی تغییرات (جایگزینی BHT ۰/۰۱ درصد با BHA ۷/۲ درصد) مورد استفاده قرار گرفت. برای تهیه محلول TBARS، محلول TBA/TCA (۲۰mM تیوباربیتوریک اسید در تری کلرواستیک اسید ۱۵٪) و محلول BHT ۰/۰۱ درصد اتانولی تهیه شد.

برای سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی در سیستم گوشتی، روش Moller و همکاران (۱۷) به کار رفت. ماهی Hypophthalmichthys molitrix از بازار محلی بابل خریداری شد. گوشت همگن ماهی (۱۰٪ w/v در آب مقطر) و محلول آبی ۰/۱، ۱ و ۵٪ عصاره (w/v) آماده شد. ابتدا ۴ml از گوشت همگن به همه لوله‌های آزمایش اضافه شد. به لوله‌های آزمایش ۵۰۰ μl از عصاره و به لوله کنترل منفی ۵۰۰ μl آب مقطر افزوده شد. لوله‌ها به مدت صفر، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه در بن ماری ۳۷°C قرار داده شدند. سپس ۴ml محلول TBA(Merck)/TCA و ۵۰ μl محلول BHT ۰/۰۱ درصد اتانولی به همه لوله‌ها اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری جوش قرار داده شد. لوله‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ و جذب مایع رویی در طول موج ۵۳۲nm با دستگاه اسپکتروفتومتر در مقابل شاهد خوانده شد. اندازه‌گیری با سه بار تکرار انجام شد.

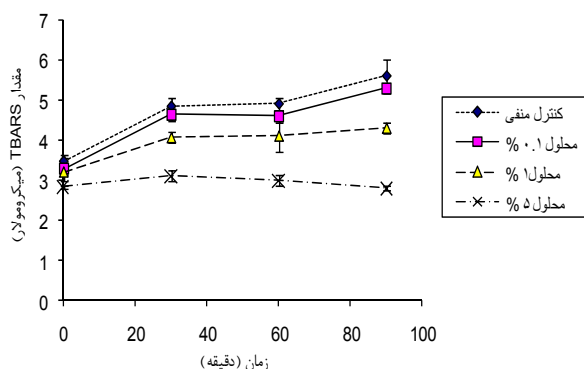
TBARS بلند مدت: ابتدا ۴ml از گوشت همگن به همه لوله‌های آزمایش اضافه شد. نیمی از لوله‌های آزمایش ۱۵ دقیقه در بن ماری جوش قرار داده شد. سپس به لوله‌های آزمایش ۵۰۰ μl از عصاره و به لوله کنترل منفی ۵۰۰ μl آب مقطر و به لوله کنترل مثبت ۵۰۰ μl محلول BHT ۰/۰۱ درصد اتانولی اضافه شد. همه لوله‌ها تا زمان معین در شرایط تاریکی در یخچال (۴°C) قرار داده شدند. لوله‌ها در ۴ نقطه زمانی (صفر، روزهای ۳، ۷ و ۱۴) آزمایش شدند. به طوری که پس از خروج از یخچال و رسیدن دمای لوله‌ها به دمای آزمایشگاه ۴ml محلول TBA/TCA و ۵۰ μl محلول BHT ۰/۰۱ درصد اتانولی به همه لوله‌ها اضافه شد. لوله‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری جوش قرار داده شد. بعد به مدت ۱۵



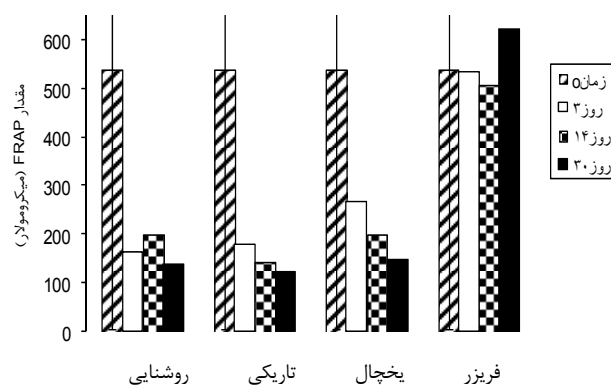
شکل ۲- مقادیر FRAP محلول آبی ۰/۱ درصد عصاره اتانولی مزوکارپ نارنج در طول زمان و در شرایط متفاوت نگهداری



شکل ۱- مقادیر FRAP (میکرو مولار) غلظت‌های محلول آبی عصاره اتانولی مزوکارپ نارنج



شکل ۴- مقادیر TBARS (میکرو مولار) کوتاه مدت گوشت ماهی آزاد در دوره صفر تا ۹۰ دقیقه در نمونه‌های کنترل منفی و نمونه‌های دارای عصاره اتانولی مزوکارپ نارنج

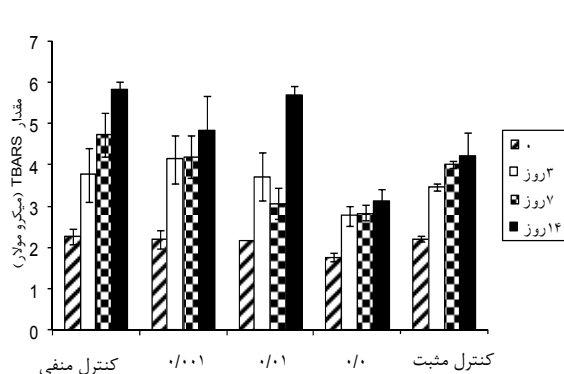


شکل ۳- مقادیر FRAP محلول آبی ۰/۰۰۵ درصد ویتامین C در طول زمان و در شرایط متفاوت نگهداری

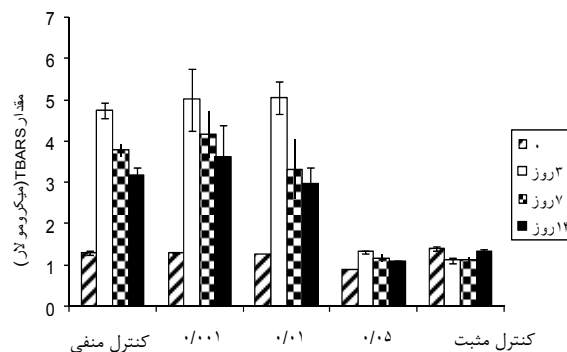
در نمونه‌های مربوط به ماهی خام، اختلاف مقدار TBARS عصاره ۰/۵٪ و BHT اتانولی ۰/۰۱ درصد (۳ تا ۱۴ روز) معنی‌دار نبود. در کنترل منفی و نمونه حاوی عصاره‌های ۰/۱ و ۱٪، یک پیک در مقادیر TBARS روز سوم مشاهده شد که در روز هفتم و سپس چهاردهم مقادیر کاهش یافت (شکل ۵).

مقدار TBARS در نمونه‌های ماهی پخته دارای عصاره ۰/۱٪، ۰/۵٪ و کنترل مثبت در زمان‌های ۳ تا ۱۴ روز نسبت به زمان شروع آزمایش افزایش یافت ($p < 0/05$) ولی تفاوت بین روزهای ۳، ۷ و ۱۴ معنی‌دار نبود. در مورد عصاره ۱٪ بیشترین مقدار TBARS در روز ۱۴ مشاهده شد ($p < 0/05$) (شکل ۶).

TBARS بلند مدت: با افزایش غلظت عصاره، میزان جلوگیری از اکسیداسیون لیپیدی گوشت ماهی خام افزایش یافت ($p < 0/05$) و محلول آبی عصاره با غلظت ۰/۵٪ کمترین مقادیر TBARS در ماهی خام و پخته را نشان داد. مقدار TBARS در نمونه ماهی خام فاقد عصاره، در زمان صفر $1/32 \mu\text{M}$ بود که پس از ۱۴ روز به $3/173 \mu\text{M}$ افزایش یافت؛ در حالی که در نمونه حاوی محلول آبی ۰/۵٪ عصاره، این مقدار از $0/92 \mu\text{M}$ در زمان صفر به $1/09 \mu\text{M}$ طی ۱۴ روز رسید. مقدار TBARS در نمونه ماهی پخته فاقد عصاره، در زمان صفر $2/28 \mu\text{M}$ بود که پس از طی ۱۴ روز به $5/85 \mu\text{M}$ افزایش یافت ($p < 0/05$). در حالی که در نمونه حاوی محلول آبی ۰/۵٪ عصاره این مقدار از $1/77 \mu\text{M}$ در زمان صفر به $3/11 \mu\text{M}$ طی این مدت رسید ($p < 0/05$).



شکل ۶ - مقادیر TBARS بلند مدت گوشت پخته ماهی، در کنترل منفی، کنترل مثبت و نمونه‌های دارای عصاره اتانولی مزوکارپ نارنج



شکل ۵ - مقادیر TBARS بلند مدت گوشت خام ماهی، در کنترل منفی، کنترل مثبت و نمونه‌های دارای عصاره اتانولی مزوکارپ نارنج

• بحث

می‌توان به پایداری بیشتر فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره و وجود آنتی‌اکسیدان‌های دیگر (علاوه بر ویتامین C) در آنها پی برد.

Goristein و همکاران اعلام کردند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان داده شده به وسیله عصاره میوه مرکبات ممکن است به دلیل حضور فلاونوئیدها، کاروتنوئیدها و آسکوربیک اسید باشد (۲۱). محققان دیگر در اجزای غیر فرار عصاره متانولی پوست مرکبات، ترکیبات آنتی‌اکسیدانی فلاونوئیدی و فنلی را شناسایی کرده‌اند (۲۲).

ترکیبات فلاونوئیدی بافت‌های نارنج از جمله پوست آن با روش HPLC مورد مطالعه قرار گرفت و مشخص شد که پوست نارنج دارای مقادیر بسیار بالایی NER (Neorierocitrin) (۲۲۰ mg) در ۱۰۰ گرم وزن میوه تازه) و NRG (Naringin) (۱۴۷۰ mg) در ۱۰۰ گرم وزن میوه تازه) است و مقادیر NHP (Neohesperidin) PON، و RFN (Rhoifolin) و NDM (Neodiosmin) نیز در آن بالاست در حالی که فاقد HPM (Heptamethoxyflavone)، HSP (Hesperidin) و SNT (Sinensetin) است (۸).

با اینکه عدم تطابق در یافته‌های مطالعات گوناگون را می‌توان به تفاوت در روش سنجش مورد استفاده نسبت داد، درباره سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی، و با فرض استفاده از یک روش، فعالیت آنتی‌اکسیدانی میوه‌ها می‌تواند تحت تأثیر منشاء جغرافیایی، خاک‌های زراعی، شرایط کاشت و برداشت

نتایج آزمایش FRAP نشانگر وجود فعالیت آنتی‌اکسیدانی در عصاره و پایداری آن طی یک ماه در شرایط متفاوت نگهداری است. به طوری که حداکثر ۱۴٪ کاهش در محیط آزمایشگاه (تاریکی) مشاهده شد. این نتایج با یافته‌های مطالعات پیشین منطبق است. گزارشاتی مبنی بر کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی در طول زمان و با افزایش دما منتشر شده است که با روند نزولی مشاهده شده در این تحقیق انطباق دارد (۱۹، ۱۸). *Klimczak* و همکاران نشان دادند که با گذشت زمان به دلیل کاهش پلی‌فنل‌ها و ویتامین C ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نیز کم می‌شود (۱۸) در خلال فرایند، ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی غذاها می‌توانند بدون تغییر باقی بمانند یا دچار افزایش یا کاهش شوند. این تغییر به شکل‌گیری ترکیبات جدیدی نسبت داده می‌شود که توانایی آنتی‌اکسیدانی یا پرواکسیدانی بیشتری دارند (۲۰).

نتایج حاصل از آزمایش روی ویتامین C که یک آنتی‌اکسیدان مهم محلول در آب است، کاهش معنی‌دار و چشمگیری در مقادیر FRAP از آزمایش روز سوم تا آزمایش یک ماه در محیط آزمایشگاه و یخچال نشان داد. کاهش مشاهده شده با یافته‌های مطالعات گذشته منطبق است. تحقیقاتی هم نشان داده‌اند که مقدار ویتامین C طی زمان و با افزایش دما کاهش می‌یابد (۱۸). با مقایسه نتایج حاصل از نمونه‌های عصاره با ویتامین C به عنوان کنترل مثبت

زمان ذخیره‌سازی، هیدرولیز و اکسیداسیون لیپیدهای ماهی نیز بیشتر شده، هیدروپراکسیدها و دی‌ان‌های مزدوج تولید می‌شود و زمان برای تولید محصولات واکنش ثانویه اکسیداسیون لیپیدی که با ماده واکنشگر TBA واکنش می‌دهد، افزایش می‌یابد (۲۶).

در مطالعه‌ای روی گوشت گاو و خوک مشخص شد که مقادیر TBARS گوشت پخته از روند صعودی منظمی پیروی می‌کند، در حالی که گوشت خام روال منظمی در افزایش مقادیر خود نسبت به زمان صفر ندارد (۲۵). Widayaka و همکاران گزارش کردند که میزان اکسیداسیون لیپیدی در گوشت پخته بیشتر از گوشت خام است (۲۷).

قابل ذکر است که روش پختن نیز می‌تواند در مقدار TBARS مؤثر باشد. آب‌پز کردن و تنوری کردن (Baking) مقادیر TBARS را افزایش می‌دهد و کباب کردن و سرخ کردن تغییری در مقادیر آن ایجاد نمی‌کند (۲۸). فرایند پختن، ترکیبات آنتی‌اکسیدانی را دچار تغییر کرده، به ساختار سلول آسیب وارد می‌کند و غشای لیپیدی را در معرض محیط قرار می‌دهد. گوشت خام دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی است، مگر آنکه حرارت بیند یا دناتوره شود یا پرواکسیدان‌ها به آن اضافه شوند (۲۹). افزایش مقادیر TBARS در گوشت پخته می‌تواند به وسیله تولید میوگلوبین اکسید شده که آمادگی بیشتری برای اکسیداسیون دارد، توجیه شود (۲۶). اسیدهای چرب با چند پیوند دوگانه از قبیل (Eicosapentaenoic) EPA و (Decosahexaenoic) DHA برای اکسیداسیون در طول حرارت دادن، مهم و مستعد هستند (۳۰).

استفاده از عصاره مزوکارپ نارنج به عنوان یک منبع طبیعی آنتی‌اکسیدانی به جای آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی برای کاهش اثرات مضر آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی بر سلامتی به بررسی و تحقیقات گسترده‌تر و شناسایی مواد مؤثر در عصاره پوست نارنج نیاز دارد.

و زمان ذخیره‌سازی قرار بگیرد (۲۳). Garau و همکاران گزارش کردند که دمای هوای خشک کننده نیز بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی محصولات فرعی نارنج اثر دارد (۶).

اثر آنتی‌اکسیدان‌ها یا مکانیسم آنتی‌اکسیدانی به عوامل واقعی یا مدل از قبیل قطبیت محیط، دما، نوع سوپسترا، شرایط اکسیداسیون و وضعیت فیزیکی محیط اکسیداسیون (امولسیون، مایع، جامد) وابسته است و این موضوع ممکن است عامل اختلاف در قدرت آنتی‌اکسیدانی برای یک ملکول در آزمایش‌های متفاوت باشد (۲۴).

نتایج حاصل از آزمایشات TBARS در کوتاه مدت نشان داد که اثر عصاره به غلظت وابسته است و عصاره ۰.۵٪ اثر قوی حفاظتی بر اکسیداسیون چربی دارد که مقدار TBARS آن مستقل از زمان (در ۹۰ دقیقه) است. این یافته با یافته‌های مطالعات پیشین منطبق است. Kang و همکاران گزارش کردند که نمونه‌های دارای محلول آبی پودر پوست مرکبات به طور معنی‌داری، محافظت از اکسیداسیون لیپیدی را نشان می‌دهد (۴).

بررسی نتایج حاصل از آزمایشات TBARS در بلند مدت نشان داد که با افزایش غلظت عصاره، میزان جلوگیری از اکسیداسیون لیپیدی افزایش می‌یابد و مشخص شده که عصاره ۰.۵٪ توانایی زیادی برای حفاظت از اکسیداسیون لیپیدی ماهی خام و پخته دارد.

سنجش میزان اکسیداسیون چربی در ماهی مشخص کرد که با افزایش زمان، اکسیداسیون چربی افزایش می‌یابد. در مطالعه حاضر، مقادیر TBARS در نمونه‌های ماهی پخته، در طول زمان، روندی صعودی داشت. این یافته‌ها با نتایج مطالعه Fasseas مطابقت دارد (۲۵).

در تحقیق Ahn و همکاران که مقادیر TBARS در طول زمان (تا ۸ روز) افزایش یافت (۱۶). افزایش اکسیداسیون لیپیدی در طول زمان می‌تواند به علت رهایی بیشتر آهن آزاد و پرواکسیدان‌های دیگر در اثر تجزیه بیشتر در طول ذخیره‌سازی از ماهیچه باشد (۲۶) در هر صورت با افزایش

• References

- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39(1): 44-84.
- Therond P, Bonnefont – Rousselot D, Davit-Spraul A, Conti M, Legrand A. Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. *Curr opin Clin Nutr Metab Care* 2000; 3 (5): 373-84.
- Guo C, Yang J, Wei J, Li Y, Xu J, Jing Y. Antioxidant activities of peel, pulp, and seed fraction of common fruits as determined by FRAP assay. *Nutr Res* 2003; 23:1719-26
- Kang HJ, Chawla SP, Jo C, Kwon JH, Byun MW. Studies on the development of functional powder from citrus peel. *Bioresour Technol* 2006; 97: 614-20
- Maeda-Yamamoto M, Kawahara H, Tahara N, Tsuji K, Hara Y, Isemura M. Effect of tea polyphenols on the invasion and matrix metalloproteinases activities of human fibrosarcoma HT 1080 cells. *J Agric Food Chem*. 1999; 47: 2350 –54.
- Garau MC, Simal S, Rosselló C, Femenia A. 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* 2007; 104(3):1014-24.
- Peterson JJ, Dwyer JT, Beecher GR, Bhagwat SA, Gebhardt SE, Haytowitz DB, et al. Flavanones in orange, tangerines(mandarins), tangors, and tangelos: a compilation and review of the data from the analytical literature. *J Food Compost Anal* 2006; 19: S66-S73.
- Nogata Y, Sakamoto K, Shiratsuchi H, Ishii T, Yano M, Ohata H. Flavonoid composition of fruit tissues of citrus species. *Biosci Biotechnol Biochem* 2006. 70(1):178-192.
- Pacheco-Aguilar R, Lugo-Sanchez M.E, Robles-Burgueno MR. Postmortem biochemical characteristic of Monterey sardine muscle stored at 0°C . *J Food Sci* 2000 ,65:40-47.
- Toyomizu M, Hanaoka k, Yamaguchi K. Effect of release of free fatty acids by enzymatic hydrolysis of phospholipids on lipid oxidation of fish muscle during storage at -05°C. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 1981. 47:605-610
- Guillen MD, Cabo N. Infrared spectroscopy in the study of edible oils and fats. *J Sci Food Agric* 1997; 75:1-11.
- Renner M, Labas R. Biochemical factors influencing metmyoglobin formation in beef muscle . *Meat Sci* 1987; 19: 151-165.
- Ito N, Fukushima S, Hasegawa A, Shibata M, Ogiso T. Carcinogenicity of butylated hydroxy anizole in F₃₄₄ rats. *J Nat Cancer Inst* 1983; 70: 343 – 44.
- Li BB, Smith B, Hossain MdM. Extraction of phenolics from citrus peels: I. Solvent extraction method . *Separ Purif Tech* 2006; 48: 182-88.
- Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma as a measure of " antioxidant power " : the FRAP assay. *Anal Biochem* 1996; 239: 70-76
- Ahn DU, Olson DG, Jo C, Love J, Jin SK. Volatiles production and lipid oxidation on irradiated cooked sausage as related to packaging and storage. *J Food Sci* 1999; 64: 226-29.
- Moller JKS, Madsen HL, Aaltonen T, Skibsted LH. Dittany (*Origanum dictamnus*) as source of water extractable antioxidant. *Food Chem* 1999; 64: 215-19.
- Klimczak I, Malecka M, Szlachta M, Gliszczynska-Swiglo A. Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. *J Food Compost Anal* 2007; 20(3-4): 313-22.
- Anese M, Manzocco L, Nicoli MC, Lericri CR. Antioxidant properties of tomato juice as affected by heating. *J Sci Food Agric* 1999; 79: 750-54.
- Nicole MC, Anese M, Parpinal M. Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. *Trends Food Sci Technol* 1999; 10: 94-100.
- Gorinstein S, Milena C, Machackova I, Haruenkit R, Park YS, Jung ST, et al. Characterization of antioxidant compounds in Jaffa sweeties and white grapefruits. *Food Chem* . 2004; 84: 503-10.
- Guo CJ, Cao GH, Sofic E, Prior RL. High-performance liquid chromatography coupled with coulometric array detection of electroactive components in fruits and vegetables: relationship to oxygen radical absorbance capacity. *J Agric Food Chem* 1997; 45: 1787- 96.
- Van der Sluis AA, Dekker M, de Jager A, Jongen WMF. Activity and concentration of polyphenolic antioxidant in apple : effect of cultivar, harvest year and storage conditions. *J Agric Food Chem* 2001; 49: 3606-13.
- Laguette M, lecomte J, Villeneuve P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges . *Prog Lipid Res* 2007; 46(5): 244-82.
- Fasseas MK, Mountzouris KC, Tarantilis PA, Polissiou M, Zervas G. Antioxidant activity in meat treated with oregano and sage essential oils. *Food Chem* 2007; 106: 1188-94.

26. Chaijan M, Benjakul S, Visessanguan W, Faustman C. Changes of lipids in sardine (*Sardinella gibbosa*) muscle during iced storage. Food Chem 2006; 99: 83-91.
27. Widayaka K, Setyawardani T, Sumarmono J. The effect of storage and cooking on lipid oxidation of raw and cooked beef and goat meat. Asia Pac J Clin Nutr 2001; 10(suppl): S48
28. Weber J, Bochi VC, Ribeiro CP, Victorio AM, Emanuelli T. Effect of different cooking methods on the oxidation, proximate and fatty acid composition of silver catfish (*Rhamdia quelen*) fillets. Food Chem 2008; 106: 140-46.
29. Ahn DU, Ajuyah A, Wolfe FH, Sim JS. Oxygen availability effects in prooxidant-catalyzed lipid oxidation of cooked turkey patties. J Food Sci 1993; 58: 278-82.
30. Sant ANA LS, Mancini-Fi ho J. Influence of the addition of antioxidants in vivo on the fatty acid composition of fish fillet. Food Chem 2000; 68: 175-78.