www.journals.rifst.ac.ir
نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی
سال ۱۳۹۵، جلد ۵، شماره ۴، صفحات ۳۴۶-۳۳۷
Doi: 10.22101/JRIFST.2017.02.26.002

JRIFST

بررسی بهترین حلال و دما در استخراج عصارهٔ کاروتنوئیدی پوست کدوحلوایی بر پایهٔ لوتئین

نگار خوشنویس[۱]، وحید حکیم‌زاده[۲*]، محمدرضا عابدی[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان
۲- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان
* نویسندهٔ مسئول (Vahid_Hakimzadeh@yahoo.co.nz)
۳- استادیار، گروه شیمی کاربردی، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۲/۲۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۵/۱۳

واژه‌های کلیدی
آنتی‌اکسیدان
کاروتنوئید
کدوحلوایی
لوتئین
متانول

چکیده

کاروتنوئیدها دستهٔ بزرگی از رنگدانه‌های طبیعی هستند که دارای ویژگی‌هایی نظیر فعالیت پیش‌ویتامینی، آنتی‌اکسیدانی و بهبود سلامتی انسان می‌باشند. در بیشتر ضایعات حاصل از فراوری مواد خوراکی ترکیبات سودمندی که دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی و تغذیه‌ای هستند، وجود دارد. پوست کدوحلوایی به‌عنوان یکی از ضایعات مواد خوراکی دارای کاروتنوئیدهای مفیدی ازجمله لوتئین است که فواید سلامت‌بخشی آن کاملاً شناخته شده است. هدف از این پژوهش استخراج عصارهٔ کاروتنوئیدی پوست کدوحلوایی بر پایهٔ لوتئین بود که با ۳ حلال اتانول، متانول و اتیل‌استات در دو دمای ۲۵ و ۴۰ درجهٔ سانتی‌گراد انجام شد. در این تحقیق از روش‌های HPLC و UV-Vis، برای تعیین میزان لوتئین و از آزمون‌های FRAP و DPPH برای تعیین قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها استفاده گردید. نتایج نشان داد باتوجه‌به زمان بازداری لوتئین خالص در HPLC که حدود ۲/۲۴۳ دقیقه به طول انجامید، میزان لوتئین در عصارهٔ به‌دست‌آمده با حلال متانول در دمای ۴۰ درجهٔ سانتی‌گراد نسبت به سایر عصاره‌ها بیشتر بود، به‌طوری‌که سطح زیر پیک آن در حدود ۹۵۶۱ به‌دست آمد. همچنین روش رنگ‌سنجی UV-VIS براساس مقدار جذب نور لوتئین خالص نیز نشان داد عصارهٔ استخراجی با متانول در دمای ۴۰ درجهٔ سانتی‌گراد نسبت به سایر عصاره‌ها بیشترین مقدار جذب نور را دارد. عصارهٔ استخراجی با حلال متانول در دمای ۴۰ درجهٔسانتی‌گراد بیشترین قدرت آنتی‌اکسیدانی را براساس میزان احیاکنندگی آهن FRAP و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی با رادیکال DPPH نیز دارا بود که به‌ترتیب Fe(II)/lit ۱/۰۴۴ و ۱۹۷۳ براساس EC_{50} به‌دست آمد.

مقدمه

کاروتنوئیدها گروهی از ترکیبات زیست‌فعال هستند که مسئول تشکیل رنگدانه‌های زرد تا قرمز در بسیاری از اندام‌های گیاهی و مواد خوراکی گیاهی خام و فراوری‌شده می‌باشند. کاروتنوئیدهای گیاهی تحت تأثیر ایزوپرونوئید[۱]های چهل کربنه با زنجیره‌های پلی‌اِن و حاوی تعداد زیادی از پیوندهای دوگانه کونژوگه می‌باشند که می‌توانند خود به گروه‌های کاروتن‌ها (بدون مولکول‌های اکسیژن) و گزانتوفیل‌ها (با یک یا چند مولکول اکسیژن) دسته‌بندی شوند

[1] Isoprenoids

Meléndez-Martínez *et al*., 2007; Strauh, 1987; Durante *et al*., 2014). در بین ۷۰۰ کاروتنوئید طبیعی که تاکنون شناسایی شده‌اند، حدود ۵۰ مورد از آنها می‌توانند در بافت‌ها جذب شوند، انتقال یابند یا متابولیزه شوند و درنهایت توسط بدن انسان مورد استفاده قرار گیرند. از این تعداد آنهایی که به‌طور مؤثری در پلاسمای خون و بافت‌های بدن شناسایی شدند و دارای فواید سلامت‌بخش هستند عبارتند از: آلفاکاروتن[1]، بتاکاروتن[2]، لیکوپن[3]، لوتئین[4]، زئاگزانتین[5] و بتاکریپتوگزانتین[6]. کاروتنوئیدها به‌دلیل برخورداری از فعالیت پیش‌ویتامینی A، توان آنتی‌اکسیدانی و تقویت پاسخ ایمنی، در بهبود ثبات و پایداری مواد خوراکی و بهبود سلامتی نقش مهمی دارند (Maiani, *et al*., 2009; Gamboa-Pinto *et al*., 1998). امروزه بسیاری از متخصصین تغذیه برای تأمین آنتی‌اکسیدان‌های مورد نیاز بدن، مصرف گیاهان، میوه‌ها و سبزی‌هایی را که غنی از ترکیبات آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی هستند، توصیه می‌نمایند (Kumaran & Karunakaran, 2006; Frankel, 1991). کاروتنوئیدها به‌عنوان رنگ‌دهنده‌های طبیعی در مواد خوراکی و لوازم آرایشی نیز کاربرد زیادی دارند که می‌توان به بتاکاروتن، لوتئین، زئاگزانتین و لیکوپن اشاره کرد (Socaciu, 2008).

کدوحلوایی به جنس *کوکوربیتا*[7] از خانوادهٔ *کوکوربیتاسه*[8] تعلق دارد (Whang *et al*., 1999). کدوحلوایی در طب سنتی برای درمان بیماری‌هایی همچون دیابت و به‌عنوان یک ترکیب تنظیم‌کنندهٔ سیستم ایمنی، ضدباکتریایی، ضدالتهاب، تسکین دهندهٔ درد توصیه می‌شده است (Fu *et al*., 2006). کدوحلوایی به‌عنوان منبع عالی کاروتنوئیدها برای مصرف انسان علاوه بر کاروتنوئیدهای لیکوپن، بتاکاروتن و سپس آلفاکاروتن[9] دارای لوتئین می‌باشد که در پوست این میوه به وفور یافت می‌گردد (Seo *et al*., 2005).

لوتئین همچون دیگر کاروتنوئیدها، به‌عنوان یکی از رنگدانه‌های اصلی موجود در سبزی‌ها و گیاهان سبز برگ می‌باشد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل ملاحظه‌ای را نشان می‌دهد. لوتئین ازطریق جلوگیری از آسیب اکسایشی در شبکیه چشم، به‌عنوان یک مادهٔ مغذی اصلی برای محافظت از عملکرد چشم، پیشگیری از آب‌مروارید، سکتهٔ مغزی و محافظت پوست در برابر نور فرابنفش و پیشگیری از آلزایمر شناخته می‌شود که در سبزی‌های تیره و زرد، میوه‌ها و زردهٔ تخم‌مرغ یافت می‌شود (Roy *et al*., 2005; Lutein & zaeaxanthin, 2005).

روزانه مقادیر زیادی از پوست میوه‌ها و دیگر بخش‌های خوراکی آنها طی فراوری و یا مصرف مستقیم‌شان به ضایعات تبدیل شده و دور ریخته می‌شوند. امروزه ضایعات صنایع غذایی خوراکی دارای اهمیت و جایگاه ارزشمندی می‌باشند به‌طوری‌که علاوه بر استفاده به‌عنوان خوراک دام و یا کود می‌توان با استخراج و استحصال ترکیبات باارزش و فراسودمند از این مواد در ظاهر بدون مصرف همچون آنتی‌اکسیدان‌ها، آنزیم‌ها، ترکیبات ضدمیکروبی و مغذی و غیره اقدام کرد.

به‌دلیل اهمیت مدیریت ضایعات در صنایع غذایی، توجه به استفادهٔ مجدد از ضایعات صنایع تبدیلی و افزایش ارزش افزودهٔ آنها و استحصال ترکیبات اولیه برای سایر بخش‌های صنایع غذایی روبه‌افزایش است (رنجبر و همکاران، ۱۳۹۱).

در بسیاری از ضایعات میوه خاصیت آنتی‌اکسیدانی به‌واسطهٔ حضور کاروتنوئیدها وجود دارد. به‌عنوان مثال، تفالهٔ انگور، پوست میوهٔ مرکبات، مواد زائد انار و پوست موز به‌عنوان منابع ارزان قیمتی از آنتی‌اکسیدان‌ها ارزش‌گذاری شده است (Shui & Leong, 2006; Lafka *et al*., 2007; Xu *et al*., 2008; Singh *et al*., 2002; Gonzalez-Montelongo *et al*., 2010b).

در سال ۲۰۱۳، در پژوهشی روش‌های استخراج کاروتنوئیدها از ۶ نمونهٔ خمیر کدوحلوایی، شیرهٔ کدوحلوایی، میوه‌های سنجد تلخ دریایی، عصارهٔ سنجد

---

[1] α-caroten
[2] β-caroten
[3] Lycopene
[4] Lutein
[5] Zea xanthine
[6] β-cryptoxanthin
[7] *Cucurbita*
[8] *Cucurbitacea*
[9] Cis α-carotene

تلخ و دو ذرت پیوندی، با حلال‌های متانول /اتیل‌استات/اتر نفت خام مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج نشان داد شناسایی کاروتنوئیدها به‌روش طیف نورسنجی[1] برای نمونه‌های خمیر کدو حلوایی و شیرهٔ کدوحلوایی مؤثرتر بود (Stancuta *et al.*, 2013).

این تحقیق باهدف بهینه کردن روش استخراج عصارهٔ کاروتنوئیدی پوست کدوحلوایی بر پایهٔ لوتئین به‌منظور استفاده از خصوصیات کاربردی آن با ۳ حلال اتانول، اتیل‌استات، متانول و دو دمای ۲۵ و ۴۰ درجهٔ سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی پوست کدوحلوایی

کدوحلوایی واریتهٔ *کوکوربیتا مسقطه*[2] که دارای رنگ نارنجی‌تری نسبت به سایر واریته‌ها بودند از بازار محلی تهیه شد و پس از شست‌وشوی کامل، پوست آنها جدا شد و درون آون تحت‌خلأ[3] (مدل وی او ۴۰۰) در دمای ۴۰ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۴ ساعت قرار گرفت تا خشک شوند. درنهایت پوست کدوحلوایی خشک‌شده توسط آسیاب[4] (مدل پلوریست ۱۴، آلمان) پودر شد و در جای خشک و بدون رطوبت قرار گرفت.

عصاره‌گیری با حلال

در یک ارلن ۱۵ گرم از پودر پوست کدوحلوایی با ۱۵۰ میلی‌لیتر از هر حلال (اتانول، اتیل‌استات، متانول) به‌طور جداگانه مخلوط شد و درون انکوباتور شیکردار (مدل فن آوران سهند آذر، ایران) در دو دمای ۲۵ و ۴۰ درجهٔ سانتی‌گراد برای هر حلال و با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه به مدت ۱۲ ساعت قرار گرفت، پس از سپری شدن این مدت، مخلوط حلال و عصاره توسط کاغذ صافی واتمن شمارهٔ ۲ صاف شد. در انتها در دستگاه روتاری تحت‌خلأ (مدل لابروتا ۴۰۰۲/۴۰۰۳ -کنترل، آلمان)[5]، در دمای ۴۰ درجهٔ سانتی‌گراد، با میزان چرخش ۷۰ دور در دقیقه و در خلأ مناسب قرار داده شد تا باقی‌ماندهٔ حلال حذف گردد و درنهایت بالن ژوژه ۱۰۰ میلی‌لیتری منتقل گردید. بالن‌ها در دمای ۵ درجهٔ سانتی‌گراد درون یخچال توسط ورق آلومینیوم پوشانده شد تا از نفوذ نور محفوظ باشد (naghavi *et al*., 2015).

شناسایی لوتئین با HPLC

کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC)، توان و سرعت بسیار بالایی در تفکیک‌پذیری و جداسازی ترکیبات کاروتنوئیدی دارد (Meléndez-Martínez *et al*., 2007). تعیین لوتئین با استفاده از دستگاه HPLC (مدل آلیجنت سری ۱۲۰۰[6]، آمریکا) انجام شد که متشکل از یک پمپ چهارتایی با نمونه‌برداری خودکار، گاززداهای تحت‌خلأ، محفظهٔ ستون، ترموستات و آشکارساز UV-Vis، ستون C18 با طول ۲۵ سانتی‌متر و قطر ذرات پرکننده ۵ میکرومتر بود.

برای شناسایی لوتئین، ابتدا لوتئین خالص در حلالی شامل متانول (۸۰ درصد)، آب‌مقطر (۵ درصد)، متیل‌ترت‌بوتیل‌الکل (۱۵ درصد) حل شد و سپس در مخازن مخصوص فاز متحرک دستگاه HPLC ریخته شد تا دستگاه به حالت پایه برسد (Rodriguez *et al*., 1998). سپس ۱۰ میکرولیتر از عصارهٔ خالص آماده‌سازی‌شده لوتئین در طول موج ۲۴۵ نانومتر با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر در هر دقیقه به دستگاه HPLC تزریق شد، که با حذف پیک مربوط به حلال آن پس‌ازمدت زمان ۲/۲۴۳ دقیقه اولین و بلندترین پیک به‌عنوان کروماتوگرام استاندارد برای لوتئین مدنظر قرار گرفت (Skoog *et al*., 2014).

شناسایی لوتئین با UV-Vis

تعیین کاروتنوئیدها ازطریق اسپکتروفتومتری (طیف‌سنجی) هنوز هم استفاده می‌شود، زیرا روشی ساده و کم‌هزینه است (Meléndez-Martínez *et al*., 2007). برای شناسایی و بررسی دقیق‌تر، رنگ‌سنجی عصاره‌ها به روش UV-Vis نیز انجام شد. ابتدا طول موج ماکزیمم جذب محلولی از لوتئین خالص در متانول با دستگاه اسپکتوفتومتر UV-Vis (مدل آلیجنت آمریکا) که در حدود ۲۴۵ نانومتر بود به‌دست

[1] UV-Vis
[2] Cucurbitamoschata
[3] VO400
[4] Puluerisette 14
[5] LABOROTA 4002/4003-control
[6] Aligent series 1200

آمد و براساس آن جذب ماکزیمم عصاره‌ها در این طول موج مورد ارزیابی قرار گرفت (Skoog *et al.*, 2014).

اندازه گیری قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها به روش DPPH[1]

اساس این روش بر مبنای احیاء رادیکال آزاد DPPH به‌وسیلهٔ آنتی‌اکسیدان‌ها در غیاب سایر رادیکال‌های آزاد در محیط می‌باشد که طی این واکنش شدت رنگ ایجادشده با دستگاه طیف‌سنجی قابل اندازه‌گیری است (Prevec *et al.*, 2013). به‌دلیل سهولت و سرعت این آزمون معمولاً این روش برای بررسی مقدار آنتی‌اکسیدان در بسیاری از ترکیبات گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Chen *et al.*, 2013).

محلول متانولی رادیکال DPPH دارای رنگ بنفش می‌باشد و جذب نوری را در ۵۲۰-۵۱۵ نانومتر نشان می‌دهد. پایه و اساس این روش آن است که رادیکال DPPH به‌عنوان پذیرندهٔ الکترون از یک مولکول اهداکننده مانند آنتی‌اکسیدان عمل می‌کند و درنتیجه طبق واکنش زیر رنگ محیط از بنفش به رنگ زرد تبدیل می‌شود و شدت جذب کاهش می‌یابد بنابراین از روی اندازه‌گیری کاهش شدت جذب به‌وسیلهٔ طیف‌سنجی می‌توان به خصوصیات آنتی‌اکسیدانی آن پی برد (حسینی و همکاران، ۱۳۹۲).

$$DPPH^{\circ}\ (purple) + H - A \rightarrow DPPH\text{-}H\ (yellow) + A^{\circ}$$

برای تعیین قدرت آنتی‌اکسیدان عصاره‌ها ابتدا محلول ۰/۰۰۶ درصد رادیکال آزاد DPPH در متانول تهیه شد، سپس به لوله‌های آزمایش حاوی متانول (شاهد) و عصاره‌های مورد نظر ۱ میلی‌لیتر از محلول فوق اضافه شد. پس از هم‌زدن لوله‌های آزمایش به مدت ۱۵ دقیقه جذب محتوی آنها در طول موج ۵۱۲ نانومتر و درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد براساس رابطهٔ (۱) محاسبه شد (شاددل، ۱۳۹۰). مقادیر به‌دست‌آمده از رابطهٔ (۱) براساس A٪ با نرم‌افزار graph pad prism, version 5 به $EC_{۵۰}$ تبدیل شد (naghavi *et al.*, 2015).

رابطهٔ (۱)

$$A\% = \frac{A_C - A_S}{A_C} \times 100$$

که در این رابطه A٪ درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH

A_C: جذب شاهد

A_S: جذب نمونه

طبق تعریف $EC_{۵۰}$ مقدار آنتی‌اکسیدانی است که می‌تواند ۵۰ درصد رادیکال DPPH را مهار کند. هرچه $EC_{۵۰}$ کوچکتر باشد مهارکنندگی رادیکال آزاد روی نمونه بیشتر است (حسینی و همکاران، ۱۳۹۲).

اندازه‌گیری قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها به روش احیای آهن (FRAP)[2]

این روش به‌عنوان آزمایشی ساده و ارزان می‌تواند قدرت آنتی‌اکسیدانی نمونه را مشخص کند. (حسینی و همکاران، ۱۳۹۲) در واقع روش FRAP یک واکنش اکسیداسیون احیاست که با تغییر رنگ همراه است. زمانی‌که احیاکنندهٔ واکنش (آنتی‌اکسیدان) الکترون خود را اهداء می‌کند آهن سه‌ظرفیتی به آهن دوظرفیتی تبدیل می شود که می‌توان شدت رنگ تولیدشده طی این واکنش را اندازه گرفت و به ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پی برد (Liu *et al.*,1982; Guo *et al.*, 2003; Martinek, 1964). واکنش زیر بیان‌گر اساس و پایهٔ این آزمون است.

$$Fe^{+3}\text{-complex with TPTZ (colourless or Yellow)} \xrightarrow{\text{Antioxidant}} Fe^{+2}\text{ complex with TPTZ (blue)}$$

در این روش ابتدا برای تهیهٔ محلول FRAP، بافراستات، معرف TPTZ[3] (تری‌پیریدیل-اس-تری آزین) و محلول ۲۰ میلی‌مولار کلریدآهن III ۶ آبه به نسبت ۱:۱:۱۰ حجمی باهم مخلوط و در جای تاریک نگهداری شد. سپس دستگاه اسپکتروفتومتر توسط محلول FRAP تنظیم گردید برای رسم منحنی استاندارد کاتیون آهن دوظرفیتی، محلول پایه‌ای از آمونیوم فروس‌سولفات ۱ میلی‌مولار آماده شد. سپس

[1] Di Phenyl PicrylHydrazyl

[2] Ferric Reducing Antioxidant Power

[3] Tripyridyl-S-Triazine

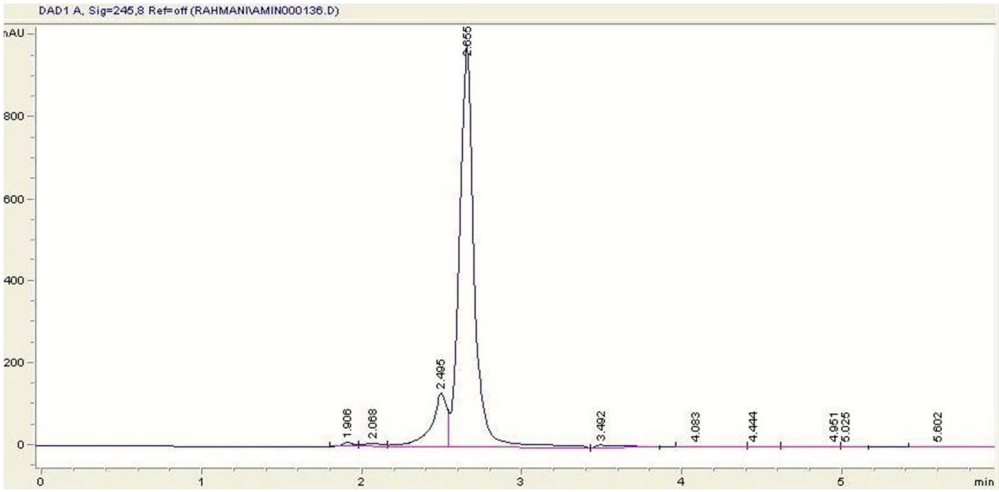
مقادیر ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰ میکرولیتر از این محلول در لولهٔ آزمایش ریخته و حجم هریک را با آب‌مقطر به ۱۰۰ میکرولیتر رسانده شد. به هریک از لوله‌ها ۳ میلی‌لیتر معرف FRAP اضافه شد. مخلوط حاصل به‌خوبی مخلوط گردید و به مدت ۴ دقیقه در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد انکوباسیون شد. پس از طی این مدت جذب محلول در طول موج ۵۹۵ نانومتر نسبت به شاهد قرائت شد و منحنی کالیبراسیون رسم شد. از لولهٔ آزمایش فاقد آمونیوم فروس‌سولفات به‌عنوان شاهد استفاده شد (Benzie & train, 1996).

نتایج و بحث

شناسایی لوتئین با HPLC

در شکل (۱) می‌توان کروماتوگرام به‌دست‌آمده لوتئین خالص با HPLC را مشاهده کرد که باتوجه‌به زمان بازداری آن پیک‌های به‌دست‌آمده در زمان‌های بازداری مشابه برای سایر عصاره به‌عنوان میزان لوتئین مورد ارزیابی قرار گرفت که در جدول (۱) آمده است.

براین‌اساس و ازآنجایی‌که سطح زیر پیک لوتئین خالص ۵۰۰۰ و غلظت آن ۱۰ پی‌پی‌ام بود می‌توان غلظت سایر عصاره‌ها را به‌دست آورد.



شکل ۱- منحنی کروماتوگرام HPLC لوتئین خالص استاندارد

جدول ۱- مقایسهٔ میزان لوتئین عصاره‌ها باتوجه‌به سطح زیر پیک آنها با حلال‌های مختلف در دماهای مختلف

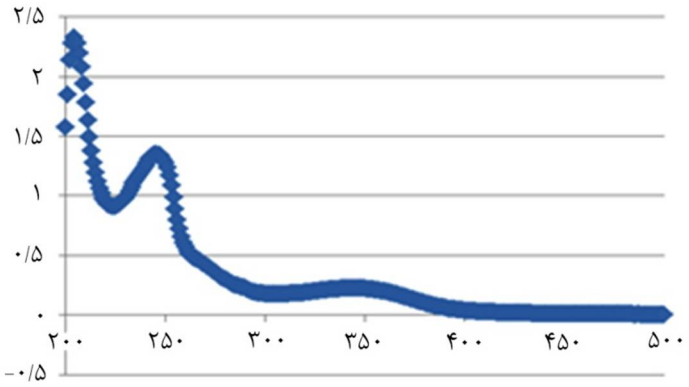
غلظت (پی-پی‌ام)	سطح زیر پیک	دما (°C)	حلال استخراج
متانول	۴۰	۹۵۶۱	۱۹/۱۲۲
متانول	۲۵	۷۳۶۳	۱۴/۷۲۶
اتانول	۴۰	۵۲۳۰	۱۰/۴۶
اتانول	۲۵	۲۰۲۱	۴/۰۴۲
اتیل‌استات	۴۰	۴۰۷	۰/۸۱۴
اتیل‌استات	۲۵	۲۲۰	۰/۴۴

طبق جدول (۱)، نتایج نشان داد میزان لوتئین در عصارهٔ به‌دست‌آمده از حلال متانول و دمای ۴۰ درجهٔ سانتی‌گراد نسبت به سایر عصاره‌ها بیشتر بود.

Hamulka و همکاران (۲۰۰۵)، با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) غلظت لوتئین در سبزی‌هایی مانند کدوحلوایی (mg/۱۰۰g ۸۲/۲)، کدوسبز (mg/۱۰۰g ۱۴/۱)، بروکلی (g۱۰۰/ mg۹۷/۱) و نخودسبز (mg/۱۰۰g ۲۳/۲) را اندازه‌گیری کردند و اعلام کردند غلظت آن در میوه‌ها کمتر است (Chandrika*et al.*, 2010).

شناسایی لوتئین به روش UV-Vis

همان‌طورکه در شکل (۲) دیده می‌شود بیشترین جذب برای لوتئین خالص در طول موج ۲۴۵ نانومتر اتفاق افتاد.



شکل ۲- منحنی طول موج جذب لوتئین در اسپکتروفتومتر UV-Vis

براین‌اساس نتایج حاصل از رنگ‌سنجی سایر عصاره‌ها در این طول موج (جدول ۲) نشان داد که حلال متانول در دمای ۴۰ درجهٔ سانتی‌گراد با جذب حدود ۱/۹۳۴ توانست بیشترین استخراج کاروتنوئیدها را بر پایهٔ لوتئین انجام دهد.

جدول ۲- میزان جذب نوری عصاره‌های استخراج‌شده با حلال‌ها و درجه حرارت‌های مختلف

حلال استخراج	دما (°C)	بیشترین جذب در ۲۴۵ نانومتر
متانول	۴۰	۱/۹۳۴
متانول	۲۵	۱/۵۹۰
اتانول	۴۰	۱/۲۶۸
اتانول	۲۵	۱/۱۰۹
اتیل‌استات	۴۰	۰/۲۹۲
اتیل‌استات	۲۵	۰/۲۳۲

Mogosanu و همکاران (۲۰۰۹) ، به شناسایی چند کاروتنوئید عمده در دوگونه از گیاه سنسیو[1] توسط اسپکتروفتومتری UV-Vis پرداختند که نتایج این محققین نشان داد میزان کاروتنوئید عمده در این گیاه لوتئین بود که جذب نوری بالاتری را نسبت به سایر کاروتنوئیدها نشان داد (Mogosaniu *et al.*, 2009).

قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH

مطابق جدول (۳)، عصارهٔ به‌دست‌آمده از حلال متانول در دمای ۴۰ درجهٔ سانتی‌گراد نسبت به سایر عصاره‌ها دارای بیشترین خاصیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH بود و درنتیجه قدرت آنتی‌اکسیدانی بیشتری داشت.

جدول ۳- ظرفیت آنتی‌اکسیدانی با رادیکال DPPH عصاره‌های استخراج‌شده با حلال‌ها و درجه حرارت‌های مختلف

نام نمونه	دما (°C)	DPPH ($EC_{۵۰}$)
متانول	۴۰	۱۹۷۳
متانول	۲۵	۲۳۱۲
اتانول	۴۰	۲۲۷۱
اتانول	۲۵	۲۲۳۸
اتیل‌استات	۲۵	۲۳۴۹
اتیل‌استات	۴۰	۲۰۳۶

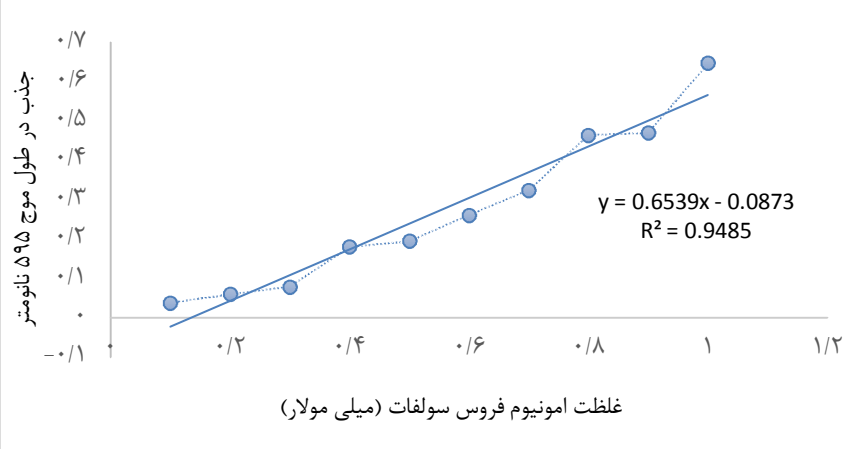
قدرت احیای آهن (FRAP)

همان‌طورکه در قسمت مواد و روش‌ها اشاره شد با احیای آهن بیشتر جذب نور افزایش می‌یابد که بیانگر قدرت آنتی‌اکسیدانی بالاتر است. با رسم منحنی کالیبراسیون (شکل ۳) و برازش معادلهٔ آن می‌توان مقدار میکرومول آهن II بر لیتر را باتوجه‌به میزان جذب نمونه‌ها به‌دست می‌آید که این مقادیر برای عصاره‌های به‌دست‌آمده با حلال‌ها و دماهای مختلف در جدول (۴) آمده است. نتایج به‌دست‌آمده براساس جدول (۴)، نشان داد که عصارهٔ متانول در دمای ۴۰ درجهٔ سانتی‌گراد نسبت به سایر عصاره‌ها دارای بیشترین خاصیت احیاکنندگی بود (Benzie & Strain, 1996).

[1] Senecio

جدول ۴- آنالیز قدرت احیاکنندگی آهن به روش FRAP

(میکرومول آهن II بر لیتر)	دما (°C)	حلال استخراج
متانول	۴۰	۱/۰۴۴
متانول	۲۵	۱/۰۱۴
اتانول	۲۵	۰/۹۲۵
اتانول	۴۰	۰/۸۷۸
اتیل‌استات	۴۰	۰/۷۲۶
اتیل‌استات	۲۵	۰/۷۰۳



شکل ۳ - منحنی استاندارد کاتیون آهن دوظرفیتی به روش FRAP

نتیجه‌گیری

نتایج این بررسی نشان داد که حلال متانول در استخراج عصارهٔ کاروتنوئیدی بر پایهٔ لوتئین از پوست کدوحلوایی در دمای ۴۰ درجهٔ سانتی‌گراد نسبت به سایر شرایط استخراج مؤثرتر بود. همچنین دمای استخراج ۴۰ درجهٔ سانتی‌گراد نسبت به ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد با متانول سبب استخراج عصارهٔ کاروتنوئیدی با قدرت آنتی‌اکسیدانی بیشتری شد. براین‌اساس سطح زیر پیک نمونهٔ استخراج‌شده با متانول در دمای ۴۰ درجهٔ سانتی‌گراد و همچنین میزان جذب آن به روش UV-Vis به‌ترتیب حدود ۹۵۶۱ و ۱/۹۳۴ بر پایهٔ لوتئین به‌دست آمد. قدرت آنتی‌اکسیدانی عصارهٔ فوق نیز به روش FRAP و DPPH نیز به‌ترتیب ۱/۰۴۴μmol Fe(II)/lit و ۱۹۷۳ (mg/۱۰۰ml) محاسبه شد. ازجمله کاربرد این گونه عصاره‌های کاروتنوئیدی می‌تواند در مواد خوراکی چرب مثل کره، روغن‌های خام باشد تا مصرف آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی را کاهش دهد.

منابع

۱- حسینی، س.، قراچورلو، م.، غیاثی طرزی، ب. و قوامی، م. ۱۳۹۲. مروری بر روش‌های تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (اساس واکنش، روش کار، نقاط قوت و ضعف). نشریه صنایع غذایی و تغذیه، ۱۱(۴):۱۱۱-۸۹.

۲- رنجبر، آ.، مقصودلو، ی.، قربانی، م. و صادقی ماهونک، ع.ر. ۱۳۹۱. نقش تیمار اتانولی و آنزیم پکتیناز بر راندمان استخراج لیکوپن از ضایعات صنایع تبدیلی گوجه فرنگی. نشریه پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران، ۸(۱): ۱۵-۹.

۳- شاددل، ر. ۱۳۹۰. بهینه یابی فرآیند استخراج مواد زیست‌فعال از پوست بنه به روش مادون بحرانی آب با استفاده از روش سطح-پاسخ و بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه فردوسی مشهد.

4- Benzie, I.F.F., & Strain, J.J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. Analytical Biochemistry, 239(1):70-76.

5- Chandrika, U.G., Basnayake, B.M., Athukorala, I., Colombagama, P.W., & Goonetilleke, A. 2010. Carotenoid Content and In Vitro Bioaccessibility of Lutein in Some Leafy Vegetables Popular in Sri Lanka. Journal of nutritional Science and Vitaminology, 56(3):203-207.

6- Chen, Z., Bertin, R., & Froldi, G. 2013. EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH-assay using several statistical programs. Food Chemistry, 138:414-420.

7- Durante, M., Lenucci, M.S., & Mita, G. 2014. Supercritical carbon dioxide extraction of carotenoids from pumpkin (cucurbita spp.): a review. International Journal of Molecular Sciences, 15(4):6725-6740.

8- Frankel, E.N. 1991. Recent advances in lipid oxidation. Journal of the Science of Food and Agriculture, 54:495-511.

9- Fu, C., Shi, H., & Li, Q. 2006. A review on pharmacological activities and utilization technologies of pumpkin. Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht, Netherlands), 61(2):73-80.

10- Gamboa-Pinto, A.J., Rock, C.L., Ferruzzi, M.G., Schowinsky, A.B. & Schwartz, S.J. 1998. Cervical tissue and plasma concentrations of alpha-carotene and beta-carotene are correlated. The Journal of Nutrition, 128(11):1933-1936.

11- Gonzalez-Montelongo, R.M., Gloria L.G., & Gonzalez, M. 2010b. The effect of extraction temperature, time and number of steps on the antioxidant capacity of methanolic banana peel extracts. Separation and Purification Technology, 71(3):347-355.

12- Guo, C., Yang, J., Wei, J., Li, Y., Xu, J., & Jiang, Y. 2003. Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. Nutrition Research, 23(12):1719-1726.

13- Hamulka, J., Koczara, J., & Gronek, M. 2005. Lutein content of selected polish foods and estimation of its intake. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 14/55(2):201-206.

14- Kumaran, A., & Karunakaran R.J. 2006. Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus* aromaticus. Food Chemistry, 97(1):109-114.

15- Lafka, T.I., Sinanoglou, V., & Lazos, E.S. 2007. On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. Food Chemistry, 104(3):1206-1214.

16- Liu, T., Chin, N., Kiser, M. & Bigler, W. 1982. Specific pectrophotometry of ascorbic acid in serum or plasma by use of ascorbate oxidase. Clinical Chemistry, 28(11): 2225-2228.

17- Lutein & zeaxanthin. 2005. Monograph," Alternative Medicine Review, vol. 10, no. 2, pp. 128–135, 2005.

18- Maiani, G., Castón, M.J., Catasta, G., Toti, E., Cambrodón, I.G., Bysted, A., Granado-Lorencio, F., Olmedilla-Alonso, B., Knuthsen, P., Valoti, M., Böhm, V., Mayer-Miebach, E., Behsnilian, D., & Schlemmer, U. 2009. Carotenoids: Actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. Molecular Nutrition & Food Research, 53(2):S194-218.

19- Martinek, R.G. 1964. Method for the determination of vitamin E (total tocopherols) in serum. Clinical Chemistry, 10(12):1078-1086.

20- Meléndez-Martínez, A.J., Vicario, I.M. & Heredia, F.J., 2007. Review: Analysis of carotenoids in orange juice. Journal of Food Composition and Analysis, 20(7):638-649.

21- Meléndez-Martínez, A.J., Britton, G., Vicario, I.M., & Heredia, F.J. 2007. Relationship between the colour and the chemical structure of carotenoid pigment. Food Chemistry, 101(3):1145-1150.

22- Mogoşanu, G.D., Pintea, A., Bejenaru, L.E., Bejenaru, C., RĂU, G., & Popescu, H. 2009. Hplc analysis of carotenoids from *senecio vernalis* and *S. Jacobaea* (*asteraceae*). Farmacia, 57(6):780-786.

23- Naghavi Azad, A., Hakimzadeh, V., & Golmakani, E. 2015. Phenolic Contents and Antioxidants Activity from Aerial Parts of phlomis herba-venti L. subsp. Kopetdaghensis. Journal of Applied. Environmental and Biological Sciences, 4(11S):54-58.

24- Prevec, T., Šegatin, N., Ulrih, N.P., & Cigić, B. 2013. DPPH assay of vegetable oils & model antioxidants in protic and aprotic solvents. Talanta, 109:13-19.

25- Rodriguez, F., Zapata, M., & Garrido, J.L. 1998. High performance liquid chromatographic separation of chlorophyll c forms from marine phytoplankton using octylsilica bonded phases. Chromatographia, 48(9):677-680.

26- Roy, H., Lundy, S., Eriksen, C., & Kalicki, B. 2005. Lutein; Healthier lives through education in nutrition and preventive medicine. Pennington Nutrition Series; No. 3.

27- Seo, J.S., Burri, B.J., Quan, Z., & Neidlinger, T.R. 2005. Extraction and chromatography of carotenoids from pumpkin. Journal of Chromatography A, 1073(1-2): 371-375.

28- Shui, G., & Leong, L.P. 2006. Residue from star fruit as valuable source for functional food ingredients and antioxidant nutraceuticals. Food Chemistry, 97(2):277-284.

29- Singh, R.P., Murthy, K.N.C., & Jayaprakasha, G.K. 2002. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (Punica granatum) peel and seed extracts using in vitro models. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 50(1):81-86.

30- Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J., & Crouch, S.R. 2014. Fundamental of analytical chemistry. USA. Brooks/kole. 9th Edition.

31- Socaciu, C. 2008. Food Colorants Chemical and Functional Properties. Boca Raton. Taylor & Francis Group. Romania, CRC Press. 652.

32- Stăncuța, S., Sevastița, M., Crina, M., Anca, F., Sonia, S., & Romina, V. 2013. Evaluation of Extraction Methods for the Analysis of Carotenoids for Different Vegetable Matrix. Bulletin UASVM Food Science and Technology. 2013. 70(2):145-146.

33- Whang, H.J., Park, Y.K., & Seog, H.M. 1999. Carotenoid pigment of pumpkin cultivated in Korea. Korean Journal of Food and Nutrition, 12:508-512.

34- Xu, G.H., Chen, J.C., Liu, D.H., Zhang, Y.H., Jiang, P., & Ye, X.Q. 2008. Minerals, phenolic compounds, and antioxidant capacity of citrus peel extract by hot water. Journal of Food Science, 73(1):C11-18.

Study of the Best Temperature and Solvent in Extraction of Carotenoids Based on Lutein from Pumpkin Peel

Negar Khoshnevis[1], Vahid Hakimzadeh[2*], Mohammad Reza Abedi[3]

1- M.Sc. student, Department of Food Science and Technology, Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran
2- Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran
* Corresponding author (Vahid_Hakimzadeh@yahoo.co.nz)
3- Assistant Professor, Department of Applied Chemistry, Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran

Abstract

Carotenoids are a great category of natural pigments that have some features as antioxidant activity, provitamin and healthy properties. In most food wastes in industry, there are several components by antimicrobial, antioxidant and nutritional properties. Pumpkin peel as a waste of the foodstuff contains carotenoids specially Lutein, which has beneficial supplement in human health. The aim of this study was the extraction of carotenoids by ethanol, methanol and ethyl acetate as solvent in 25 and 40 °C. For investigation of extracts antioxidant power, the FRAP and DPPH tests were examined. Since the retention time of pure Lutein obtained at 2.243 min in HPLC, carotenoids extract prepared by methanol at 40 °C had the highest Lutein content. The area under the peak of lutein in mentioned extract was approximately 9561. Evolution by UV-VIS method showed methanol extract at 40 °C was the best sample as lutein content, too. According to FRAP and DPPH test, methanol extract had the highest antioxidant power by 1.044 Fe (II)/ lit and 1973 (EC50), respectively.

Keywords: Antioxidants, Carotenoid, Lutein, Methanol, Pumpkin