مهندسی بیوسیستم ایران، دوره ۵۱، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۹ (ص ۶۷۲-۶۶۳)
DOI: 10.22059/ijbse.2019.263611.665084

Evaluation of Antioxidant Activity of Hydroalcoholic Extracts from Pumpkin (*Cucurbita moschata* D.) Seed, Flesh and Skin

MARYAM RAMROUDI[1*], SEYED KAMAL KAZEMITABAR[1], REZA ESMAEILZADEH KENARI[2], HAMID NAJAFI ZARINI[1]

1. Department of Biotechnology and Plant Breeding, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University Sari, Iran.
2. Department of Food Science and Industry, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University Sari, Iran.

(Received: Aug. 11, 2018- Revised: Dec. 8, 2018- Accepted: Feb. 5, 2019)

ABSTRACT

The aim of this study is to determine the total phenol and flavonoid content and antioxidant activity of hydroalcoholic extracts from different parts of pumpkin (skin, seed and flesh). The maximum extract production was obtained for flesh (27.83 g extract/100 g powder) while the lowest yield obtained from the seed extract (6.30 g extract/100 g powder). For seed extract, the highest amount of total phenol (25.80 ± 0.69 mg (GAE)/g extract) and flavonoid content (7.24 ± 0.28 mg(QE)/g extract) obtained respectively through the assay of Folin Ciocalteu and aluminum calorimetric and the best antioxidant activity was gained through antioxidant assays of DPPH (IC50=794.32µg/ml) and β-carotene bleaching (at a dose of 2000 µg/ml it was equivalent to synthetic antioxidant BHA in the concentration of 200 µg/ml). Based on the results of oxidative stability index (OSI) for extracts, the skin extract showed the highest stability (8.58 ± 0.55 h) and no significant difference was observed between the seed and fruit extracts (7.13 ± 0.168 h and 7.33 ± 0.08 h, respectively). The results suggested that hydroalcoholic extracts of various parts of the pumpkin's fruit, especially its seeds, may serve as a potential source of natural antioxidant for food and pharmaceutical products.

Keywords: Pumpkin (*Cucurbita moschata* D.), Total phenol, Total flavonoid, Antioxidant activity, Oxidative stability.

*Corresponding Author's Email: mr.commerce@yahoo.com

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره هیدروالکلی دانه، گوشت میوه و پوست کدوحلوایی

مریم رمرودی[1*]، سیدکمال کاظمی‌تبار[1]، رضا اسماعیل‌زاده کناری[2]، حمید نجفی زرینی[1]

۱. گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

۲. گروه صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۵/۲۰- تاریخ بازنگری: ۱۳۹۷/۹/۱۷- تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۱۱/۱۶)

چکیده

هدف از این مطالعه، تعیین محتوای فنول و فلاونوئید تام و همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره هیدروالکلی قسمت‌های مختلف کدوحلوایی (پوست، دانه و گوشت میوه) است. بالاترین بازده استخراج عصاره، برای گوشت میوه به دست‌آمد (۲۷/۸۳ گرم عصاره در ۱۰۰ گرم پودر) و عصاره دانه دارای کم‌ترین بازده استخراج بود (۶/۳۰ گرم عصاره در ۱۰۰گرم پودر). برای عصاره دانه کدوحلوایی بالاترین مقدار فنول کل، به روش فولین سیوکالچو (معادل۰/۶۹±۲۵/۸۰ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره) و فلاونوئید کل، به روش رنگ‌سنجی آلومینیوم‌کلراید (معادل ۰/۲۸±۷/۲۴ میلی گرم کوئرستین در گرم عصاره) به همراه بهترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی، به‌روش DPPH (میکروگرم بر میلی لیتر۷۹۴/۳۲ =IC50) و بی‌رنگ شدن بتاکاروتن (در غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ، معادل با آنتی‌اکسیدان سنتزی BHA در سطح ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) به دست آمد. براساس نتایج آزمون شاخص پایداری اکسایشی (OSI) عصاره‌ها، عصاره پوست کدو دارای بالاترین میزان پایداری اکسایشی (معادل۰/۵۵ ± ۸/۵۸ ساعت) بود و بین عصاره‌های حاصل از دانه و گوشت میوه تفاوت معنی‌داری مشاهد نشد (به ترتیب معادل ۰/۱۶۸±۷/۱۳ و ۰/۰۸±۷/۳۳ ساعت). نتایج نشان می‌دهد که عصاره هیدروالکلی قسمت‌های مختلف میوه کدوحلوایی و به خصوص دانه آن ممکن است به عنوان یک منبع بالقوه از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در محصولات و فرآورده‌های صنایع غذایی و دارویی قابل بهره‌گیری باشند.

واژه های کلیدی: کدوحلوایی، فنل کل، فلاونوئید کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، پایداری اکسایشی

مقدمه

طبیعت هزاران سال است که به عنوان منبع مواد دارویی مورد استفاده بشر بوده است و شمار قابل توجهی از داروهای مدرن از منابع طبیعی حاصل شده‌اند. حداقل تعداد گیاهان گل‌دار کره زمین در حدود ۲۵۰۰۰۰ گونه برآورد شده است که از این تعداد، تنها ۶ درصد برای کاربردهای بیولوژیکی گزینش شده و ۱۵درصد از نظر فیتوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفته‌اند (Shekhar and Prasad, 2015). واکنش‌های بیوشیمیایی متعددی در بدن اکسیژن فعال تولید نموده و توانایی تخریب بیومولکول‌ها را دارا می‌باشند، ترکیبات آنتی‌اکسیدانی می‌توانند با اثرات زیان بخش این رادیکال‌های آزاد مقابله کنند (Kris-Etherton *et al.*, 2002). آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی (به عنوان مثال TBHQ[1]، BHA[2] و BHT[3]) به طور گسترده‌ای به عنوان مکمل‌های غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند، اما کاربرد آن‌ها به دلیل امکان وجود عوامل سمی و سرطان‌زا که در طول تجزیه آن‌ها بوجود می‌آید، مورد بازنگری قرار گرفته‌است(Maisuthisakul *et al.*, 2007). اخیرا به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی و اثرات بالقوه روی سلامتی، استفاده از ترکیبات طبیعی فنلی مورد توجه قرار گرفته است (Anagnostopoulou *et al.*, 2006). نظر به این‌که گیاهان یکی از منابع مهم آنتی‌اکسیدان‌ها بوده و باعث حفاظت سلول‌ها از آسیب‌های اکسیداتیو می شوند، تحقیقات در این زمینه رو به افزایش است (Kumaran, 2006).

خانواده Cucurbitaceae شامل چندین گونه از گیاهان کشت شده با اهمیت اقتصادی از جمله؛ هندوانه (*Citrullus lanatus* L.)، کدو (*Cucurbita sp.*)، خیار (*Cucumis sativus* L.) و خربزه (*Cucumis melo* L.) است (Ritschel *et al.*, 2004). کدو حلوایی (*Cucurbita moschata* D.)، از جمله صیفی‌جات بومی کشور مکزیک است. برخی از مطالعات علمی در مورد کدو حلوایی، اهمیت آن را به عنوان منبع آلفا و بتاکاروتن، لوتئین، ویتامین C، فیبر غذایی، مواد معدنی و ترکیبات فنلی نشان

* نویسنده مسئول: mr.commerce@yahoo.com

1. Tertiary butylhydroquinon
2. Butylated hydroxyanisol
3. Butylated hydroxytoluene

می‌دهد. مهم‌ترین قسمت کدو، دانه‌های کم‌چرب و غنی از پروتئین آن است. در طب نوین، از فراورده‌های دارویی حاصل از روغن دانه این گیاه، داروهایی جهت درمان تورم و هایپرتروفی خوش‌خیم غده پروستات در مردان، جلوگیری و معالجه سخت شدن رگ‌ها، درمان مشکلات سوزش لوله‌های ادراری، ایجاد تعادل هورمونی در خانم‌ها، تنظیم فعالیت دستگاه گوارش و پیشگیری از تجزیه ویتامین A، تهیه و توصیه می‌شود. گزارش شده است که مصرف تخمه انواع کدو، از طریق پایین آوردن سطح کلسیم و بلورهای اُگزالات کلسیم، خطر ابتلا به سنگ مثانه را کاهش داده‌است (Abdel-Rahman, 2004; Murray & Lagow, 2004; Fruhwirth & Hermetter, 2007).

دومین قسمت مهم این گیاه میوه آن است. این میوه بتاکاروتن زیادی دارد و دارای مقادیر متوسطی از کربوهیدرات، ویتامین‌ها و مواد معدنی است (Yadav *et al*., 2010). پودر کدو-تنبل کلسترول تام سرم در حیوانات دیابتی را کاهش می‌دهد (Jin *et al*., 2013). آمینواسیدهای مختف شامل آلانین، آرژنین، آسپارتیک اسید، گلوتامیک اسید، هیستیدین، لوسین، ایزولوسین، گلیسین، لیزین، متیونین، فنیل آلانین، سرین، ترئونین، والین و تیروزین در پوست کدو تنبل شناسایی شده‌اند (Kim *et al*., 2012). محتوای بالای فیبر موجود در میوه کدو، آن را برای کمک به هضم غذا مناسب می‌سازد. همچنین در طب سنتی به عنوان یک ماده دافع کرم روده و مدر، در درمان هموروئید استفاده می-شود (Sopan *et al*., 2014).

باوجود ویژگی‌های ارزشمند کدوحلوایی، به کشت، بازاریابی و پژوهش در مورد آن توجه زیادی نشده‌است و تعداد مطالعات علمی کمی در مورد ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی، فیزیکوشیمیایی، تغذیه‌ای، عملکردی و تکنولوژیکی آن وجود دارد(Valenzuela- Jacobo *et al*., 2011). بنابراین هدف عمده این مطالعه، تعیین محتوای فنلی، فلاونوئیدی و فعالیت آنتی-اکسیدانی بخش‌های مختلف کدو حلوایی و بررسی امکان جایگزینی آن‌ها با آنتی‌اکسیدان‌های رایج مصرفی است.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی:

کلیه مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش دارای درجه آزمایشگاهی بودند. معرف فنل فولین سیوکالچو[1] ، متانول و کلروفرم از شرکت مرک آلمان، اتانول از شرکت شیمی پژوهش آسیا و معرف DPPH[2]، گالیک اسید، آسکوربیک اسید، آلومینیوم کلراید، سدیم کربنات، استات پتاسیم، اسید لینولئیک، بتاکاروتن، BHA و TBHQ از شرکت سیگما تهیه شدند.

آماده سازی نمونه‌ها:

بذرهای کدوحلوایی در بازه زمانی اوایل خردادماه تا اواخر مهرماه در مزرعه پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری کاشته شدند. پس از برداشت محصول، میوه‌های رسیده به آزمایشگاه منتقل شدند. سپس میوه‌ها به طورکامل شسته و خشک شدند و دانه، پوست و گوشت آن‌ها از یکدیگر جدا شد. دانه‌ها در دمای اتاق و پوست و گوشت میوه به صورت برش‌های ورقه‌ای در دمای ۴۰ درجه سلسیوس برای مدت حدودا ۱۶ ساعت در آون خشک شدند.

عصاره اتانولی و بازده استخراج عصاره:

تهیه عصاره اتانولی به روش فراصوت، طبق روش (Falleh *et al*.,2012) و با کمی تغییر انجام شد. قسمت‌های مختلف خشک شده کدو به طور جداگانه با استفاده از دستگاه آسیاب خانگی مایسون (مدلMCG-157S) پودر شده و با نسبت ۱:۵ (وزنی- حجمی، ۱گرم پودر: ۵ میلی لیتر حلال) با اتانول ۸۰ درصد مخلوط شدند. سپس مخلوط‌های به دست‌آمده در یک حمام اولتراسوند (Ultrasonic Cleaner KS-150 EI) با دمای۴۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۵دقیقه در معرض امواج فراصوت (فرکانس ۴۰ کیلوهرتز) قرار گرفتند.

پس از آن، عصاره‌های استخراجی با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره یک، فیلتر شده و حلال آن‌ها در دمای۴۰ درجه سلسیوس در دستگاه تبخیرکننده دوار تحت خلاء (VR 3000، ساخت کشور تایوان) تبخیر و هر یک از عصاره‌های غلیظ شده به شیشه‌های ساعت مجزا منتقل شدند. نهایتا عصاره‌های به دست آمده قبل از تعیین بازده استخراج عصاره، تا رسیدن به وزن ثابت در دسیکاتور قرار گرفتند. این عصاره‌ها تا زمان استفاده در ظروف تیره رنگ، در دمای ۲۰- درجه نگهداری شدند. با محاسبه وزن اولیه شیشه ساعت و وزن نهایی آن که حاوی عصاره خشک بر جای مانده بود، مقدار کل عصاره خشک استخراج شده (بازده استخراج) محاسبه و به صورت درصد (گرم در صد گرم نمونه خشک) آورده شد (Mata *et al*., 2007).

تعیین محتوای فنل کل:

محتوای فنل کل به روش فولین سیوکالچو، براساس توضیح Ordonez *et al*., (2006)و با کمی تغییر تعیین گردید. محلول پایه‌ی گالیک اسید با حل کردن ۲ میلی‌گرم گالیک اسید در ۲

1. Folin-Ciocalteu
2. 1, 1-diphenyl -2-picryl-hydrazyl

میلی‌لیتر آب مقطر تهیه شد و از این استوک، غلظت‌های ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵ و ۱۵/۶۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر آماده شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از هر یک از غلظت‌های محلول فوق به یک لوله آزمایش منتقل شده و با ۲/۵ میلی لیتر از معرف فولین سیوکالچو که به نسبت ۱ به ۱۰ با آب مقطر رقیق شده، مخلوط گردید.

پس از گذشت ۵ دقیقه ۲ میلی لیتر از محلول سدیم‌کربنات (۷/۵ درصد وزنی- حجمی) به آن اضافه شد. پس از ورتکس، لوله‌های آزمایش به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. سپس در طول موج ۷۶۰ نانومتر جذب محلول توسط دستگاه اسپکتروفوتومتری (JENUS; model UV-1200، ساخت چین) در مقابل بلانک (شامل همه اجزاء واکنش به جز عصاره یا محلول استاندارد که به جای آن‌ها از حلال عصاره استفاده شد) قرائت گردید. بدین ترتیب منحنی استاندارد گالیک اسید ترسیم شد. کلیه‌ی مراحل فوق برای نمونه‌های اصلی مورد آزمایش که از حل کردن ۱۰ میلی‌گرم از هریک از عصاره‌ها در یک میلی‌لیتر حلال به‌دست آمد تکرار شد. با استفاده از معادله به دست آمده از منحنی استاندارد، محتوای فنل کل عصاره‌ها محاسبه و نتایج به‌دست آمده بر حسب میلی گرم گالیک اسید در هر گرم عصاره گزارش شد.

تعیین محتوای فلاونوئید کل:

محتوای فلاونوئید کل به روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلراید، براساس توضیح Chang *et al*., (2002) و با کمی تغییر اندازه-گیری شد. محلول پایه‌ی کوئرستین با حل کردن ۲ میلی‌گرم کوئرستین در ۲ میلی‌لیتر آب مقطر تهیه شد و از این استوک، غلظت‌های ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آماده شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از هر یک از غلظت‌های محلول فوق به یک لوله‌ی آزمایش منتقل شده و با ۳ میلی‌لیتر متانول، ۰/۲ میلی لیتر آلومینیوم‌کلراید ۱۰درصد، ۰/۲ میلی‌لیتر استات‌پتاسیم یک مولار و ۵/۶ میلی لیتر آب مقطر مخلوط گردید. پس از ورتکس، لوله‌های آزمایش به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس در طول موج ۴۳۰ نانومتر جذب محلول توسط دستگاه اسپکتروفوتومتری در مقابل بلانک قرائت گردید. بدین ترتیب منحنی استاندارد کوئرستین ترسیم شد. کلیه‌ی مراحل فوق برای نمونه‌های اصلی مورد آزمایش که از حل کردن ۱۰ میلی‌گرم هریک از عصاره‌ها در یک میلی‌لیتر حلال به دست آمد تکرار شد. با استفاده از معادله حاصل از منحنی استاندارد، محتوای فلاونویید کل عصاره‌ها محاسبه و نتایج به‌دست آمده بر حسب میلی‌گرم کوئرستین در هر گرم عصاره گزارش شد.

ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH :

تاثیر عصاره بر رادیکال آزاد دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH) براساس روش توضیح داده شده توسط Yi *et al*., (2008) ، با اندکی تغییر انجام شد. DPPH یک رادیکال آزاد پایدار است و محلول متانولی آن برای ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی چندین ترکیب فنلی طبیعی موجود در گیاهان استفاده می‌گردد. آنتی-اکسیدان‌ها در تعامل با DPPH، با انتقال الکترون یا اتم هیدروژن به DPPH و در نتیجه خنثی کردن ماهیت رادیکال آزاد آن عمل می‌کنند و درجه تمایل و تغییر رنگ (از ارغوانی به زرد)، نشان دهنده توانایی پالایندگی (Scavenging) رادیکال‌ها توسط آنتی-اکسیدان است. تغییر عدد طول موج جذبی در ۵۱۷ نانومتر، به عنوان معیار اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی مورد استفاده قرار گرفته‌است (Patel Rajesh & Patel Natvar, 2011).

ابتدا محلول‌هایی با غلظت‌های مختلف (۵۰ تا ۵۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) از عصاره‌ها و آسکوربیک‌اسید در حلال متانول تهیه شد. سپس ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول متانولی DPPH (با غلظت یک میلی‌مولار) به ۱/۵ میلی لیتر عصاره افزوده و مخلوط حاصل به شدت ورتکس شد. لوله‌های آزمایش به مدت ۳۰ دقیقه در محل تاریک قرارگرفتند. بعد از این مدت، میزان جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد. در نمونه‌ی کنترل، عصاره با متانول جایگزین شد. درنهایت، درصد مهار رادیکال‌های DPPHتوسط عصاره، با استفاده از فرمول مربوطه (رابطه ۱) محاسبه و فعالیت‌آنتی‌اکسیدانی با استاندارد آسکوربیک‌اسید مقایسه شد.

IC50 به عنوان غلظتی از آنتی‌اکسیدان که جهت پالایش رادیکال DPPH به غلظتی معادل ۵۰ درصد مقدار اولیه‌ی آن مورد نیاز است، تعریف می گردد (Anandjiwal et al., 2008). IC50 نمونه‌ها از درصد پالایندگی محاسبه شده برای غلظت‌های متفاوت عصاره‌ها به دست آمد و واحد غلظت آن به صورت میکروگرم عصاره در میلی لیتر حلال بیان شد.

(رابطه ۱) $((A_C - A_S)/A_C) \times 100$ = درصد مهار رادیکال آزاد DPPH

که در این رابطه A_C و A_S به ترتیب جذب کنترل و جذب نمونه می‌باشندارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به روش بی‌رنگ شدن بتاکاروتن:

آزمون بی‌رنگ شدن بتاکاروتن بر اثر اکسایش اسید لینولئیک، به روش Sahin *et al*., (2004) با کمی تغییر اجرا شد. نیم میلی‌گرم بتاکاروتن در ۱ میلی لیتر کلروفرم حل شد و سپس ۲۵ میکرولیتر لینولئیک اسید و ۲۰۰ میلی‌گرم توئین ۴۰ به آن اضافه گردیده و کاملا مخلوط شد. سپس تحت تاثیر ازت، کلروفرم جدا گردیده و ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اشباع از اکسیژن همراه با تکان شدید به

آن اضافه شد. ۲/۵ میلی لیتر از محلول تهیه شده فوق به لوله آزمایش منتقل شد و ۳۵۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف عصاره (از غلظت ۱۰۰ تا ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر حلال) به لوله آزمایش اضافه گردید. کلیه‌ی مراحل فوق در مورد BHA و TBHQ به عنوان کنترل مثبت و همچنین نمونه شاهد (حاوی ۳۵۰ میکرولیتر حلال) انجام شد. بعد از ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای اتاق، جذب نوری نمونه‌ها در ۴۷۰ نانومتر قرائت گردیده و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی، از مقایسه جذب نوری نمونه‌ها با زمان صفر و از روی میزان پایداری رنگ زرد بتا کاروتن مورد سنجش قرار گرفته و با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

(رابطه ۲)

$$\%I = [1-(A_s(48) - A_s(0)) / (A_c(48) - A_c(0))] \times 100$$

در این رابطه: $A_s(48)$ = میزان جذب نمونه بعد از ۴۸ ساعت؛ $A_s(0)$ = میزان جذب نمونه در زمان شروع؛ $A_c(48)$= میزان جذب شاهد بعد از ۴۸ ساعت؛ $A_c(0)$ = میزان جذب شاهد در زمان شروع و I = درصد بازدارندگی می باشد.

تعیین شاخص پایداری اکسیداتیو (OSI[1]):

به منظور تعیین پایداری اکسیداتیو از دستگاه رنسیمت متروم (سوئیس) مدل ۷۴۳ استفاده شد. ابتدا عصاره‌های استخراجی با غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در روغن آفتاب گردان فاقد آنتی‌اکسیدان تهیه شدند و برای هر آزمون ۳ گرم از هر نمونه استفاده شد. دما و سرعت جریان هوا در این دستگاه به ترتیب ۱۲۰ درجه سانتیگراد و ۱۵ لیتر بر ساعت تنظیم شد (Iqbal & Bhanger, 2007).

آنالیزهای آماری:

مطالعه‌ی حاضر در قالب آزمایش فاکتوریل و به صورت طرح کامل تصادفی و در سه تکرار به اجرا درآمد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با نرم افزار SPSS نسخه ۲۴ انجام پذیرفت. آنالیز داده‌ها در قالب تجزیه و تحلیل واریانس ANOVA یک طرفه انجام شد تا معنی‌دار بودن تفاوت بین میانگین‌ها مشخص گردیده و سپس از آزمون دانکن برای مشخص کردن تفاوت معنی‌داری بین میانگین‌ها در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد. میزان IC50نمونه‌ها با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism 8 محاسبه شده و نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel ترسیم گردیدند.

نتیجه گیری و بحث

بازده استخراج عصاره‌ها:

به طور کلی بازده استخراج عصاره قسمت‌های مختلف میوه بین ۶/۳۰ تا ۲۷/۸۳ گرم عصاره در ۱۰۰ گرم پودر به دست آمد (شکل۱). تغییر در بازده استخراج عصاره‌های بخش‌های مختلف ممکن است به تفاوت قطبیت ترکیبات موجود در گیاهان نسبت داده شود. تفاوت‌هایی از این دست توسط Ibrahim & El-Masry (2016) در تعیین بازده استخراج قسمت‌های مختلف میوه خربزه (*Cucumis melo*) و Jayaprakasha *et al.*, (2001) در تعیین بازده استخراج عصاره دانه انگور با حلال‌های مختلف، گزارش شده‌است.

در میان عصاره‌های استخراجی بالاترین و پایین‌ترین بازده استخراج به ترتیب برای گوشت میوه و دانه به دست آمد ($p < ۰/۰۵$). بازده استخراج عصاره الکلی قسمت‌های مختلف کدوحلوایی به این ترتیب می باشد: دانه < پوست < گوشت میوه، که با نتایج حاصل از مطالعه Ismail *et al.*, (2010) در محاسبه بازده استخراج پوست، گوشت میوه و دانه خربزه تطابق دارد. به عبارت دیگر، بازده استخراج پایین در دانه کدوحلوایی به دلیل حلالیت پایین‌تر ترکیبات اساسی موجود در دانه (برای مثال چربی، نشاسته و پروتئین‌ها که به مقدار زیاد در دانه کدو موجود هستند) در حلال الکلی می باشد.

شکل۱- بازده استخراج (برحسب گرم عصاره در۱۰۰ گرم پودر) قسمت-های مختلف کدو حلوایی

۲-۳: محتوای فنل و فلاونوئید کل:

محتوای فنل و فلاونوئید کل عصاره‌ها در جدول ۱ نشان داده شده‌است. میزان فنل کل با استفاده از معادله استاندارد گالیک-اسید تعیین گردید ($y = ۰/۰۰۸X + ۰/۰۲۴۸$, $R^2 = ۰/۹۹۸۴$). منحنی کالیبراسیون ترسیم شد و مقدار فنل کل هر یک از عصاره‌ها به صورت معادل میلی‌گرم گالیک‌اسید در هر گرم از عصاره بیان شد. بالاترین میزان ترکیبات فنولی کل برای عصاره دانه کدو حلوایی (معادل ۰/۶۹ ± ۲۵/۸۰ میلی‌گرم گالیک‌اسید در هر گرم از عصاره) به دست آمد در حالی‌که عصاره پوست، کم‌ترین مقدار را برای این ترکیبات نشان داد (معادل ۰/۲۹ ± ۴/۸۱ میلی-گرم گالیک اسید در هر گرم از عصاره) ($p < ۰/۰۵$). مطالعات

1. Oxidative Stability Index

متعدد نشان داده است که محتوای فنول در گیاهان با فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها مرتبط است که این موضوع احتمالا به دلیل خواص احیاء کنندگی آن‌ها است که اجازه می‌دهد تا به عنوان عوامل کاهنده، اهداء کننده هیدروژن و دافع گونه‌های فعال اکسیژنی، نظیر اکسیژن سینگلت (O_2)[1] عمل کنند (Chang *et al.*, 2001).

فلاونوئیدها ازجمله عناصر آنتی‌اکسیدان شناخته شده موجود در گیاهان هستند که طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های زیست شناختی و شیمیایی، از جمله: فعالیت‌های پالایش رادیکال‌ها را بر عهده دارند (Miliauskas *et al.*,2004). براساس مطالعات صورت گرفته، فلاونوئیدها از طریق فعالیت‌هایی مانند پالایندگی و کلاته‌کنندگی، نقش آنتی‌اکسیدانی خود را ایفا می کنند(Ghimire *et al.*, 2011). مقدار کل ترکیبات فلاونوئیدی از معادله حاصل از ترسیم منحنی استاندارد کوئرستین ($y = ۰/۰۱۶۴X - ۰/۰۴۴۴$, $R^2 = ۰/۹۹۱۲$) به دست آمد و به صورت میلی گرم کوئرستین در هر گرم عصاره بیان شد. براساس نتایج به دست آمده، بیشترین مقدار فلاونوئید در عصاره دانه (۷/۲۴ ± ۰/۲۸ میلی‌گرم کوئرستین در هر گرم عصاره) و کمترین میزان آن در عصاره پوست کدو (۱/۶۶ ± ۰/۱۲ میلی گرم کوئرستین در هر گرم عصاره) مشاهده شد($p < ۰/۰۵$).

براساس نتایج حاصل از این تحقیق مقادیر فلاونوئید کل به دست آمده برای عصاره‌ها با محتوای فنول کل در آن‌ها مطابقت دارد. این نتایج نشان می‌دهند که فلاونوئیدها جزء ترکیبات اصلی فنولی موجود در گیاه کدو هستند که این واقعیت مطابق با نظر Pokorny *et al.*, (2001) می‌باشد. این محققین بیان داشتند که فلاونوئیدها رایج‌ترین و گسترده‌ترین گروه از ترکیبات فنلی گیاهی هستند و به طور معمول آنتی‌اکسیدان‌های موثری به شمار می‌روند.

به طور کلی ترتیب قرارگیری مقادیر به‌دست آمده برای فنل و فلاونوئید تام عصاره‌های مورد آزمایش به این قرار می‌باشد؛ پوست < گوشت میوه< دانه ($p < ۰/۰۵$). این یافته‌ها با مطالعات Ismail *et al.*, (2010) در بررسی محتوای فنلی و فعالیت آنتی-اکسیدانی عصاره‌های متانولی خربزه مغایرت دارد و با نتایج حاصل از مطالعه Dissanayake *et al.*, (2018) در مقایسه میزان فنل کل موجود در عصاره متانولی دانه و پوست کدوتنبل (*Cucurbita maxima*) و میزان فلاونوئید کل موجود در عصاره اتیل‌استاتی پوست و دانه این گیاه هم‌خوانی دارد.

فعالیت بازدارندگی رادیکال‌های آزاد:

DPPH یک رادیکال آزاد پایدار است که جهت تبدیل به یک مولکول دیامغناطیس پایدار، پذیرای دریافت یک هیدروژن یا الکترون است. تاثیر آنتی‌اکسیدان‌ها در ممانعت از فعالیت رادیکال آزاد DPPH به توانایی هیدروژن‌دهی آن‌ها ارتباط دارد (Soare *et al.*, 1997). در عصاره‌های مورد بررسی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی با غلظت عصاره‌ها وابسته بود. عصاره دانه که بیشترین میزان فنل و فلاونوئید کل را دارا می باشد، بالاترین درصد بازداری را برای هردو آزمون آنتی‌اکسیدانی DPPH (شکل۲) و بی‌رنگ شدن بتاکاروتن (شکل۳) به خود اختصاص داده‌است. مقایسه نتایج حاصل از مقادیر IC50 عصاره‌های الکلی کدو حلوایی در جدول۱ نشان داده شده‌است. این مقادیر برای هر سه عصاره مورد بررسی تفاوت معناداری را نشان دادند ($p < ۰/۰۵$). همچنین عصاره‌های مورد بررسی در مقایسه با آنتی‌اکسیدان آسکوربیک‌اسید توانایی کمتری در مهار رادیکال‌های آزاد نشان دادند.

در این مطالعه، فعالیت پالایندگی رادیکال DPPH برای عصاره دانه کدو حلوایی دارای روندی مشابه با نتایج به دست آمده برای محتوای فنل و فلاونوئید کل می‌باشد و نشان می‌دهد فعالیت بازدارندگی DPPH در این عصاره به مقدار ترکیبات فنلی به خصوص فلاونوئیدها بستگی دارد که موافق با نظر Heim *et al.*, (2002) است. براساس نتایج حاصل از آزمون DPPH، برتری عصاره گوشت میوه در میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی نسبت به عصاره پوست، در غلظت های بالاتر از ۳۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نمایان می‌گردد. به طوری که برخلاف عصاره دانه و پوست، در مقادیر بالاتر از این غلظت، روند افزایشی در مهار رادیکال‌های آزاد برای این عصاره متوقف نشده و دارای شیب صعودی بوده‌است. در غلظت‌های بین ۵۰ تا۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین این دو عصاره مشاهده نشد و در غظت‌های بین ۱۰۰۰ تا ۳۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره پوست در مهار رادیکال‌های آزاد موفق‌تر عمل کرده‌است. مقدار IC50 محاسبه شده برای عصاره پوست کدو (۱۰۸۶/۴۶) نسبت به عصاره میوه آن (۱۸۱۱/۳۴) به طور معناداری کمتر به دست آمد ($p < ۰/۰۵$). براساس نتایج حاصل از مطالعه‌ای با عنوان بررسی ترکیبات مغذی و آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی پوست و گوشت میوه کدو، عصاره پوست آن نسبت به عصاره گوشت میوه دارای مقادیر بالاتری از آهن و اسیدآسکوربیک بوده‌است. باتوجه به خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالای موجود در این ترکیبات، شاید بتوان عدم تفاوت قابل ملاحظه و در برخی مواقع برتری عصاره پوست نسبت به عصاره گوشت میوه در برخی از غلظت‌ها را، علی-رغم وجود مقادیر پایین‌تری از ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در این عصاره، توجیح نمود (Mala and Kurian, 2016).

1. singlet oxygen

رادیکال آزاد اسیدلینولئیک که پس از جدا شدن یک اتم هیدروژن از یکی از گروه‌های متیلن آن شکل گرفته است، مولکول‌های بتاکاروتن را مورد حمله قرار داده، بنابراین باعث شکستن پیوند دوگانه و از بین رفتن رنگ نارنجی بتاکاروتن می‌گردد. میزان بی‌رنگ شدن بتاکاروتن در این واکنش از طریق تفاوت در قرائت عدد طول موج جذبی در ۴۷۰ نانومتر در زمان صفر و همچنین پس از بازه زمانی مورد نظر قابل اندازه‌گیری است (Lai and Lim, 2011).

در آزمون بی‌رنگ شدن بتاکاروتن عصاره پوست، گوشت و میوه کدو حلوایی در محدوده غلظتی ۱۰۰ تا ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شده و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها با آنتی اکسیدان‌های سنتزی BHA و TBHQ در دو سطح ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مقایسه شد. نتایج حاصل از این آزمون نیز موید ارتباط مستقیم میان غلظت عصاره‌ها و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها است. به‌طوری‌که پائین‌ترین درصد بازدارندگی در همه عصاره‌های کدو مربوط به غلظت ۱۰۰ و بالاترین درصد بازدارندگی مربوط به غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود (شکل۳).

نتایج آنالیز واریانس درصد بازدارندگی در جدول تجزیه واریانس آزمون بی‌رنگ شدن بتاکاروتن معنادار شد ($p < ۰/۰۵$) و براساس نتایج مقایسات میانگین، بیش‌ترین درصد بازدارندگی مربوط به آنتی‌اکسیدان سنتزی BHA در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. پس از آن TBHQ و BHA در غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب بالاترین درصد بازدارندگی را داشتند. نتایج همچنین نشان داد که از بین عصاره‌های مختلف، عصاره دانه در غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، دارای بالاترین درصد بازدارندگی بود که میزان بازدارندگی آن با نمونه شاهد BHA در غلظت ۲۰۰ تفاوت معناداری نداشت. پس از آن، عصاره پوست و عصاره میوه در غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای بالاترین درصد بازدارندگی بودند.

۴-۳:شاخص پایداری اکسیداتیو (OSI):

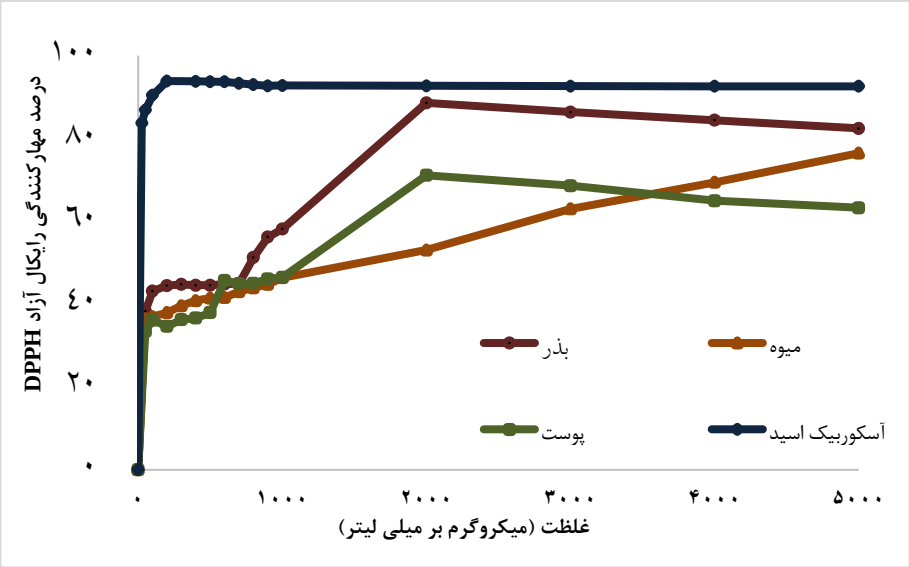
در میان عصاره‌های مختلف میزان پایداری اکسیداتیو بین ۷/۱۳ تا ۸/۲۸ ساعت متفاوت بود (جدول۱). نمونه‌های روغن حاوی هر سه عصاره، تفاوت معناداری را با میزان پایداری اکسیداتیو نمونه روغن شاهد فاقد آنتی‌اکسیدان (۵/۸۵ ساعت) نشان دادند. بیش‌ترین میزان OSI برای عصاره پوست به دست آمد(۸/۵۸±۰/۵۵ ساعت) و پس از آن، بین عصاره میوه و دانه کدو از نظر زمان پایداری اکسایشی اختلاف معناداری مشاهده نشد(به ترتیب: ۰/۰۸ ± ۷/۳۳ و ۰/۱۶۸± ۷/۱۳ ساعت).

از نتایج به‌دست آمده می‌توان استنباط کرد که بین محتوای فنولی و خاصیت مهار رادیکال‌های آزاد در عصاره‌ها با میزان شاخص پایداری اکسیداتیو در آن‌ها همبستگی مشخصی وجودندارد. دریک مطالعه، خاصیت آنتی‌اکسیدانیو بازدارندگی آنزیم لیپوکسیژناز عصاره ارقام مختلف دانه کدو با استفاده از حلال‌هایی با قطبیت متفاوت نظیر: آب، متانول، استون و اتیل استات مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتایج حاصل از این تحقیق ویژگی مهار رادیکال‌های آزاد در عصاره‌های مختلف دانه کدو ارتباط مستقیمی با میزان محتوای فنل کل در آن‌ها داشته و این در حالی است که بین محتوای فنولی و خاصیت مهارکنندگی آنزیم لیپوکسیژناز سویا در این عصاره‌ها همبستگی مشخصی مشاهده نشد. همچنین با وجود این که بیشترین ترکیبات فنولی به همراه بالاترین خاصیت بازدارندگی رادیکال‌های آزاد برای عصاره‌های آبی و متانولی به دست آمد، عصاره‌های استونی و اتیل استاتی، با میزان قطبیت کمتر، به ترتیب در مهار آنزیم لیپوکسیژناز سویا عملکرد بهتری را از خود نشان دادند (Xanthopoulou *et al*., 2009). همچنین لازم به ذکر است که اسیدهای چرب چند غیر اشباع موجود در دانه های روغنی (نظیر اسید لینولئیک و اسید لینولنیک) به رغم داشتن ارزش تغذیه‌ای مناسب و تاثیرات مفید بر بیماری‌های قلبی عروقی و انواع سرطان ها، آن‌ها را مستعد اکسیداسیون می‌کنند(Oomah *et al*., 2000).

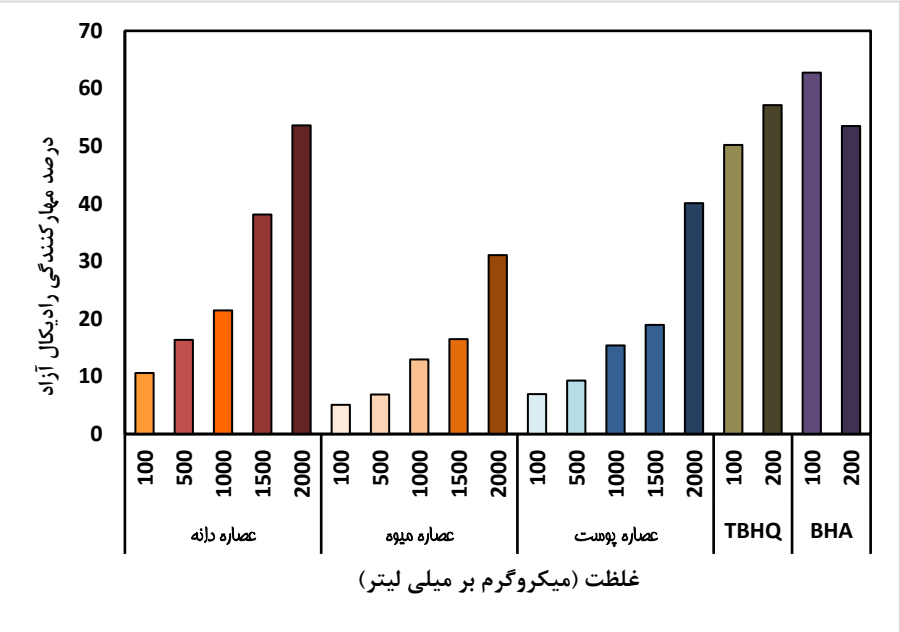
جدول۱- مقایسه میانگین مقدار کل ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی، IC50 و OSI برای قسمت های مختلف کدو حلوایی

نمونه	فلاونوئید کل mg(QE)/g extract	فنل کل mg(GAE)/g extract	IC50 µg extract /ml solvent	شاخص پایداری اکسیداتیو(OSI) (h)
عصاره دانه	۷/۲۴ [a]±۰/۲۸	۲۵/۸۰ [a] ±۰/۶۹	۷۹۴/۳۲ [c]	۷/۱۳±۰/۱۶۸ [b]
عصاره میوه	۵/۰۰ [b]±۰/۱۸	۱۱/۲۵ [b]±۰/۴۴	۱۸۱۱/۳۴ [a]	۷/۳۳±۰/۰۸ [b]
عصاره پوست	۱/۶۶ [c]±۰/۱۲	۴/۸۱ [c]±۰/۲۹	۱۰۸۶/۴۶ [b]	۸/۵۸±۰/۵۵ [a]

***داده‌های مشخص شده با حروف متفاوت در هر ستون نمایانگر وجود اختلاف در سطح پنج درصد است (P <۰/۰۵).**



شکل۲- مقایسه میانگین درصد مهار رادیکال DPPH در قسمت های مختلف کدو حلوایی و آنتی‌اکسیدان اسیدآسکوربیک



شکل۳- مقایسه میانگین درصد مهار رادیکال آزاد در آزمون بی‌رنگ شدن بتاکاروتن برای قسمت های مختلف کدو حلوایی و آنتی‌اکسیدان های BHA و TBHQ

نتیجه گیری کلی

در عصاره‌های مورد بررسی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی با غلظت عصاره‌ها وابسته بود. براساس نتایج به دست آمده بالاترین محتوای فنل و فلاونوئید کل و به موازات آن بیش‌ترین فعالیت آنتی-اکسیدانی، نسبت به سایر عصاره‌های مورد بررسی در دانه کدو-حلوایی مشاهده شد. نتایج تجزیه و تحلیل فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها در آزمون‌های بازدارندگی رادیکال DPPH و بی‌رنگ شدن بتاکاروتن نشان می‌دهد که ترکیبات موجود در این عصاره‌ها می توانند رادیکال‌های آزاد را از طریق مکانیزم‌های الکترون یا هیدروژن‌دهی تخلیه کنند و بنابراین ممکن است قادر به جلوگیری از واکنش‌های زنجیره‌ای رادیکال‌های مضر در ماتریس-های حساس باشند. طبق نتایج حاصل از این تحقیق و باتوجه به خواص دارویی و تغذیه‌ای ذکر شده برای بخش‌های مختلف کدو حلوایی، عصاره قسمت‌های محتلف میوه این گیاه و به‌خصوص عصاره دانه آن (با بالاترین میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، بازدارندگی رادیکال‌های آزاد و پایداری قابل قبول در مقابل اکسیداسیون چربی‌ها)، می‌توانند به عنوان منبعی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در تولیدات دارو و محصولات غذایی مفید و مغذی مورد استفاده قرار گیرند.

هیچگونه تعارض منافع بین نویسندگان وجود ندارد.

REFERANCES

Abdel-Rahman, M. K. (2006). Effect of pumpkin seed (*Cucurbita pepo* L.) diets on benign prostatic hyperplasia (BPH): chemical and morphometric evaluation in rats. *World J Chem*, 1(1), 33-40.

Anagnostopoulou, M. A., Kefalas, P., Papageorgiou, V. P., Assimopoulou, A. N., & Boskou, D. (2006). Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*). *Food chemistry*, 94(1), 19-25.

Anandjiwala, S., Bagul, M. S., Parabia, M., & Rajani, M. (2008). Evaluation of free radical scavenging activity of an ayurvedic formulation, Panchvalkala. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 70(1), 31.

Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., & Chern, J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of food and drug analysis*, 10(3).

Chang, S. T., Wu, J. H., Wang, S. Y., Kang, P. L., Yang, N. S., & Shyur, L. F. (2001). Antioxidant activity of extracts from Acacia confusa bark and heartwood. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(7), 3420-3424.

Dissanayake, D.M.R.H., Deraniyagala, S. A., Hettiarachchi, C.M., & Thiripuranathar, G.(2018) The Study of Antioxidant and Antibacterial Properties of Skin, Seeds and Leaves of The Sri Lankan Variety of Pumpkin. *IOSR Journal Of Pharmacy*, 8(2), 43-48.

Falleh, H., Ksouri, R., Lucchessi, M. E., Abdelly, C., & Magné, C. (2012). Ultrasound-assisted extraction: Effect of extraction time and solvent power on the levels of polyphenols and antioxidant activity of *Mesembryanthemum edule* L. Aizoaceae shoots. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 11(2), 243-249.

Fruhwirth, G. O., & Hermetter, A. (2007). Seeds and oil of the Styrian oil pumpkin: Components and biological activities. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(11), 1128-1140.

Ghimire, B. K., Seong, E. S., Kim, E. H., Ghimeray, A. K., Yu, C. Y., Ghimire, B. K., & Chung, I. M. (2011). A comparative evaluation of the antioxidant activity of some medicinal plants popularly used in Nepal. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(10), 1884-1891.

Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of nutritional biochemistry*, 13(10), 572-584.

Ibrahim, M.E.E.D., El-Masry, H. G. (2016). Phenolic Content and Antioxidant Activity of Cantaloupe *Cucumis melo* var. cantalupensis and Food Application. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*, 5(1), 16-24.

Iqbal, S., & Bhanger, M. I. (2007). Stabilization of sunflower oil by garlic extract during accelerated storage. *Food Chemistry*, 100(1), 246-254.

Ismail, H. I., Chan, K. W., Mariod, A. A., & Ismail, M. (2010). Phenolic content and antioxidant activity of cantaloupe (*Cucumis melo*) methanolic extracts. *Food Chemistry*, 119(2), 643-647.

Jayaprakasha, G. K., Singh, R. P., & Sakariah, K. K. (2001). Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food chemistry*, 73(3), 285-290.

Jin, H., Zhang, Y. J., Jiang, J. X., Zhu, L. Y., Chen, P., Li, J., & Yao, H. Y. (2013). Studies on the extraction of pumpkin components and their biological effects on blood glucose of diabetic mice. *Journal of food and drug analysis*, 21(2), 184-189.

Kim, M. Y., Kim, E. J., Kim, Y. N., Choi, C., & Lee, B. H. (2012). Comparison of the chemical compositions and nutritive values of various pumpkin (Cucurbitaceae) species and parts. *Nutrition research and practice*, 6(1), 21-27

Kris-Etherton, P. M., Hecker, K. D., Bonanome, A., Coval, S. M., Binkoski, A. E., Hilpert, K. F., & Etherton, T. D. (2002). Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American journal of medicine*, 113(9), 71-88.

Kumaran, A. (2006). Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. Food chemistry, 97(1), 109-114. Ahn, J. H., Kim, Y. P., & Kim, H. S. (2012). Effect of natural antioxidants on the lipid oxidation of microencapsulated seed oil. *Food Control*, 23(2), 528-534.

Lai, H., & Lim, Y. (2011). Evaluation of antioxidant activities of the methanolic extracts of selected ferns in Malaysia. *International Journal of Environmental Science and Development*, 2(6), 442.

Maisuthisakul, P., Suttajit, M., & Pongsawatmanit, R. (2007). Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. *Food chemistry*, 100(4), 1409-1418.

Mala, K. S., & Kurian, A. E. (2016). NUTRITIONAL COMPOSITION AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PUMPKIN WASTES. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical & Biological Sciences*, 6(3).

Mata, A. T., Proença, C., Ferreira, A. R., Serralheiro, M. L. M., Nogueira, J. M. F., & Araújo, M. E. M. (2007). Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food chemistry*, *103*(3), 778-786.

Miliauskas, G., Venskutonis, P. R., & Van Beek, T. A. (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food chemistry*, 85(2), 231-237.

Murray, L., Lagow, B., (2004). *PDR for Herbal Medicines*, 3rd ed. Montvale, NJ: Thomson PDR. 663-665.

Oomah, B. D., Ladet, S., Godfrey, D. V., Liang, J., &

Girard, B. (2000). Characteristics of raspberry (*Rubus idaeus* L.) seed oil. *Food chemistry*, 69(2), 187-193.

Ordonez, A. A. L., Gomez, J. D., & Vattuone, M. A. (2006). Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz extracts. *Food chemistry*, 97(3), 452-458.

Patel Rajesh, M., & Patel Natvar, J. (2011). In vitro antioxidant activity of coumarin compounds by DPPH, Super oxide and nitric oxide free radical scavenging methods. *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research*, 1, 52-68.

Pokorny, J., Yanishlieva, N., & Gordon, M. H. (Eds.). (2001). *Antioxidants in food: practical applications*. *CRC press*.

Ritschel, P. S., de Lima Lins, T. C., Tristan, R. L., Buso, G. S. C., Buso, J. A., & Ferreira, M. E. (2004). Development of microsatellite markers from an enriched genomic library for genetic analysis of melon (*Cucumis melo* L.). *BMC Plant Biology*, 4(1), 9.

Şahin, F., Güllüce, M., Daferera, D., Sökmen, A., Sökmen, M., Polissiou, M., ... & Özer, H. (2004). Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. vulgare in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food control*, 15(7), 549-557.

Shekhar, S., & Prasad, M. P. (2015). Evaluation of antioxidant activity determination in *Jasminum* species by DPPH method. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 4(3), 1529-1540.

Soare, J. R., Dinis, T. C., Cunha, A. P., & Almeida, L. (1997). Antioxidant activities of some extracts of *Thymus zygis*. *Free radical research*, 26(5), 469-478.

Sopan, B. A., Vasantrao, D. N., & Ajit, S. B. (2014). TOTAL PHENOLIC CONTENT AND ANTIOXIDANT POTENTIAL OF *CUCURBITA MAXIMA* (PUMPKIN) POWDER, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 5(5), 1903-1907.

Valenzuela, G. M., Soro, A. S., Tauguinas, A. L., Gruszycki, M. R., Cravzov, A. L., Giménez, M. C., & Wirth, A. (2014). Evaluation polyphenol content and antioxidant activity in extracts of *Cucurbita* spp. *Open Access Library Journal*, 1(03), 1.

Xanthopoulou, M. N., Nomikos, T., Fragopoulou, E., & Antonopoulou, S. (2009). Antioxidant and lipoxygenase inhibitory activities of pumpkin seed extracts. *Food Research International*, 42(5-6), 641-646.

Yadav, M., Jain, S., Tomar, R., Prasad, G. B. K. S., & Yadav, H. (2010). Medicinal and biological potential of pumpkin: an updated review. *Nutrition Research Reviews*, 23(2), 184-190.

Yi, Z., Yu, Y., Liang, Y., & Zeng, B. (2008). In vitro antioxidant and antimicrobial activities of the extract of *Pericarpium Citri* Reticulatae of a new Citrus cultivar and its main flavonoids. *LWT-Food Science and technology*, 41(4), 597-603.