



مطالعه ترکیبات شیمیایی، میزان فنل، فلاوونوئید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره پوست سبز گردو

(*Juglans regia L.*)

زهرا رفیعی دهکردی^۱، ناصر صداقت^{۲*}، سحر صباحی^۳

۱- کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

۲- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

۳- استادیار، گروه تغذیه، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.

چکیده

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۲۳

کلمات کلیدی:

پوست سبز گردو،

ترکیبات شیمیایی،

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

امروزه مصرف کنندگان تمایل بیشتری به استفاده از افزودنی‌های سالم و طبیعی دارند. ترکیبات فنولی که از محصولات طبیعی به دست می‌آیند، گزینه خوبی برای به حداقل رساندن اکسیداسیون لیپیدها هستند. گردو یکی از مهم‌ترین خشکبارهایی می‌باشد که به طور وسیع در سراسر جهان کشت می‌گردد. با توجه به اینکه پوست سبز گردو حدود ۶۴٪ وزن مرطوب میوه گردو را شامل می‌شود، سالانه رقمی برابر با ۲۴۰ هزار تن پوست سبز گردو از این میوه تولید می‌شود. گردوهای استفاده شده در این مطالعه در سال ۱۴۰۰ و از باغات شهرستان سامان واقع در استان چهارمحال و بختیاری خریداری شدند. پس از پودر شدن پوست سبز و خشک شده، عصاره‌گیری با حلال متانول و به روش سوکسله انجام پذیرفت. جهت شناسایی ترکیبات شیمیایی و گروه‌های عاملی آزمون‌های GC-MS و FTIR انجام پذیرفت. همچنین میزان فنل و فلاوونوئیدهای عصاره پوست گردو نیز اندازه‌گیری شدند. در نهایت فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره پوست سبز گردو با استفاده از روش اندازه‌گیری کاهش ظرفیت رادیکالی به کمک ۲-۲ دی فنیل ۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) مورد بررسی قرار گرفت. در مجموع ۸۹ ترکیب شناسایی شدند که نشان دهنده ۹۹/۹ درصد و کل ترکیبات داخل عصاره بودند. مهمترین ترکیبات شناسایی شده که بیشترین سطح زیر منحنی را داشتند شامل پلی فنول‌ها، ترکیبات آلی و فیتو استرول‌ها بودند. نتایج FTIR نشان دهنده وجود گروه‌های عاملی هیدروکسیل، گروه آلکان و آروماتیک لیگنین بودند. در مطالعه حاضر مقدار ترکیبات فنولی در عصاره پوست گردو 96.07 ± 0.22 (میلی گرم اسید گالیک بر گرم وزن خشک نمونه) به دست آمد. همچنین ترکیبات فلاوونوئیدی عصاره پوست سبز گردو ۳۴۹ میکروگرم بر گرم کوئرستین بود. مقادیر EC50 به دست آمده در این پژوهش برابر با ۰/۱۵ بود. نتایج نشان داد عصاره متانولی پوست سبز گردو می‌تواند به عنوان جایگزینی برای آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی معرفی گردد.

DOI: 10.22034/FSCT.19.135.89
DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.135.9.5

sedaghat@um.ac.ir

* مسئول مکاتبات:

۱- مقدمه

ترکیبات فنولی متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که در قسمت‌های مختلف همه گونه‌های گیاهی وجود دارند. آن‌ها به گروه بزرگ و ناهمگنی از مولکول‌های فعال بیولوژیکی تعلق دارند و تولید آن‌ها به آنزیم‌های مختلف درگیر در مسیرهای متابولیک بستگی دارد. ترکیبات فنولی در مکانیسم‌های فیزیولوژیکی رشد و نمو میوه و درخت نقش دارند و بر ویژگی‌های مختلف دوره‌های قبل و بعد از برداشت میوه تأثیر می‌گذارند. همچنین ترکیبات فنولیک نقش مهمی در مکانیسم‌های دفاعی گیاهان دارند [۱ و ۲]. علاوه بر این، ترکیبات فیتوشیمیایی مانند فنولیک‌ها برای رفاه انسان مفید هستند. آن‌ها می‌توانند خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی عروقی و دژنراتیو را با جلوگیری از استرس اکسیداتیو و اکسیداسیون ماکرومولکول‌های بیولوژیکی کاهش دهند. ترکیبات فنولی می‌توانند رادیکال‌های آزاد را از بین ببرند و علاوه بر فعالیت‌های ضد سرطانی توصیف شده، دارای خواص کی‌لیت فلزی نیز هستند. در سال‌های اخیر، توجه زیادی به توصیف محتوای پلی‌فنول و ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی مواد مختلف گیاهی، به‌ویژه آجیل‌ها شده است، زیرا مصرف منظم آن‌ها با کاهش خطر برخی از بیماری‌ها مانند سرطان و بیماری‌های قلبی عروقی (CVDs) مرتبط است [۳].

جنس *Juglans* یا به ویژه خانواده Juglandaceae شامل چندین گونه است و به طور گسترده در سراسر جهان پراکنده است. گردوی ایرانی، انگلیسی، معمولی یا *Juglans regia L.*، عضو شناخته شده آن است، که شامل اشکال قابل توجهی از درختان خزان کننده است که عمدتاً در مناطق معتدل شناسایی شده و به صورت تجاری در آسیا، غرب آمریکای جنوبی، ایالات متحده، ایالات و اروپای مرکزی و جنوبی کشت می‌شود [۴]. گردو یک گونه درخت بزرگ است که به طور سنتی به دلیل چوب و میوه با ارزشش، به ارتفاع ۲۵ تا ۳۵ متر و تنه تا قطر ۲ متر کشت می‌شود. گردو یک محصول با ارزش است و از پوست سبز گردو، پوسته، مغز، ریشه و برگ به طور گسترده‌ای در صنایع دارویی و آرایشی استفاده می‌شود. در این راستا می‌توان از تمام قسمت‌های درخت گردو به عنوان منبع عالی از ترکیبات مختلف بیان کننده پتانسیل آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی و

همچنین ضد درد، آنتی هیستامین، ضد زخم، ضد آسم، ضد دیابت، تعدیل کننده ایمنی، ضد باروری، محافظ کبد، محرک سیستم عصبی مرکزی، ضد درد استفاده کرد. خواص ضد التهابی، ترمیم کننده زخم، لیپولیتیک، لاروکش، حشره‌کش و بسیاری دیگر که بر سلامت انسان تأثیر مثبت دارند [۵]. گردو به عنوان یک گونه استراتژیک برای تغذیه انسان طبقه‌بندی می‌شود زیرا سازمان غذا و کشاورزی آن را در گروه گیاهان اولویت دار قرار داده است. گزارش شده است که فواید سلامتی گردو به طور کلی به مشخصات شیمیایی آن‌ها مربوط می‌شود. طبق مطالعات پیشین، گردو به عنوان یکی از بالاترین محتوای آنتی‌اکسیدان در بین تمام دانه‌ها و آجیل‌های مورد مطالعه دارد گردو منبع خوبی از توکوفرول‌ها و اسیدهای چرب ضروری از جمله لینولئیک اسید چرب اولیه و پس از آن اسید لینولئیک، پالمیتیک، اولئیک و استئاریک می‌باشد. مشخص شده است که غلظت بالای اسیدهای چرب چند غیراشباع با کاهش غلظت لیپوپروتئین با چگالی کم (LDL) و افزایش سطح لیپوپروتئین با چگالی بالا (HDL) خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی عروقی را کاهش می‌دهد گزارش شده است که غلظت روغن، توکوفرول‌ها و اسیدهای چرب می‌تواند به طور قابل توجهی در بین انواع مختلف گردو و شرایط محیطی نوسان داشته باشد. علاوه بر این، نشان داده شده است که گردو دارای غلظت بالایی از α -توکوفرول، یک ترکیب خانواده ویتامین E است که خواص آنتی‌اکسیدانی را به ویژه در مهار فرایندهای اکسیداسیون لیپید نشان می‌دهد [۶]. پوشش سبز میوه گردو که گردو را احاطه کرده است پوسته نام دارد و از ضایعات کشاورزی است که در طب عامیانه برای درمان بیماری‌های پوستی و تسکین درد کاربرد فراوانی دارد. در حال حاضر در داخل کشور از پوست سبز بیشتر برای سوزاندن استفاده می‌شود. با این حال، در سال‌های اخیر، عمدتاً به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی آن، در فارماکولوژی مدرن به طور قابل ملاحظه‌ای مورد توجه قرار گرفته است. پوسته سبز گردو در زمان برداشت و فراوری میوه جدا می‌شود. اخیراً به عنوان منبعی از ترکیبات طبیعی با خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی ارزش گذاری شده است. استفاده موثر از پوسته می‌تواند یک مسئله حیاتی باشد زیرا استفاده از آن به عنوان یک منبع غنی از مواد شیمیایی گیاهی اهمیت تولید گردو را برجسته می‌کند و همچنین به یک محصول

شدند و سپس با الک مش ۲۰ (جهت یکنواخت کردن اندازه ی ذرات) الک گردیدند و بعد از آن پودر به دست آمده از پوست سبز خشک شده گردو در ظرف شیشه‌ای درب‌دار قهوه‌ای رنگ (جهت ممانعت از ورود نور و رطوبت) و در دمای یخچال نگهداری شد [۱۰].

باید توجه کرد که زمان برداشت بر میزان ترکیبات فنولی نیز تاثیر داشته و بیشترین مقدار این ترکیب‌ها در اولین زمان برداشت (تیر) بود. به طوری که در این زمان میوه گردو به طور کامل نرسیده و پوست چوبی در حال سفت شدن است. برداشت دوم (مرداد) نسبت به برداشت سوم (شهریور) ترکیبات فنولی بالاتری را در پوست گردو سبز نشان داد ولی اختلاف معنی داری بین ترکیبات فنولی این دو برداشت وجود نداشت است.

۲-۱-۲- تهیه عصاره پوست سبز گردو به روش

سوکسله

برای تهیه عصاره از حلال متانول استفاده شد، زیرا نتایج پژوهش‌ها ی پیشین نشان داده است که متانول در مقایسه با سایر حلال‌ها نظیر آب، اتانول، استونیتریل، هگزان و اتیل استات در استخراج ترکیب‌های فنولی مؤثرتر می‌باشد. استخراج به روش سوکسله و طبق روش لیو و همکاران (۲۰۰۸) انجام شد. در این روش ۳۰ گرم از نمونه درون کارتوش قرار داده شده و به دستگاه سوکسله Foss مدل ۲۰۵۰ متصل گردید و پس از اضافه نمودن مقدار مناسب (حدود ۴۰۰ میلی‌لیتر) حلال (متانول ۶۰٪) به نمونه، استخراج در طی مدت زمان ۴۸ ساعت انجام گردید. سپس حلال در دستگاه تبخیرکننده چرخان تحت خلأ Heidolph مدل ۴۰۰۱، کاملاً تبخیر شد. عصاره به دست آمده تا پایان آزمایش‌ها در ظرف شیشه‌ای قهوه‌ای رنگ و در دمای یخچال (حدود ۴ درجه سانتی‌گراد) نگهداری گردید [۱۱].

۲-۲- شناسایی ترکیبات عصاره پوست سبز گردو

۲-۲-۱- تجزیه ترکیبات عصاره گردو

نمونه عصاره پوست سبز گردو با استفاده از یک دستگاه GC-MS برند Agilent مدل ۷۸۹۰ موجود در دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز با سیستم مجهز به ستون موبینه HP-5MS (به طول ۳۰ متر، قطر ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه داخلی

جانبی که به مقادیر زیاد تولید می‌گردد، می‌تواند کاربردهای زیادی داشته باشد. تعداد ۱۳ ترکیب فنولی شامل: هیدروکسی سینامیک اسیدها (اسید کلروژنیک، اسید کافئیک، اسید فرولیک و اسید سیناپیک)، هیدروکسی بنزوئیک اسیدها (اسید گالیک، اسید لائیک، اسید پروتوکاتیک، اسید سیرینزیک و اسید وانیلیک)، فلاونونوئیدها (کاتکین، اپی کاتکین، میرستن) و جاگلون ۵ هیدروکسی ۱ و ۴ نفتوکینون) در گردو شناسایی شده است. ترکیباتی نظیر نفتوکینون، فلاونونوئیدها و جاگلوناز ترکیبات مهم آنتی‌اکسیدانی برگ گردو محسوب می‌شوند. جاگلون یکی از مهمترین ترکیبات فنولی موجود در گردو دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی می‌باشد. همچنین پوست گردو به عنوان منبع مقرون به صرفه‌ای برای تهیه ی جاگلون است که می‌تواند پیش درآمدی برای تهیه ی ویتامین K باشد. برای استفاده از این ترکیبات فنولی از پوست سبز گردو، استخراج این ترکیبات ضروری است. از روشهای مختلفی برای استخراج ترکیبات فنولی استفاده میگردد. از جمله ی این روشها میتوان به خیساندن (غرقابی)، سوکسله، فراصوت و ماکروویواشاره نمود [۷-۹]. هدف از این مطالعه عصاره‌گیری از پوست سبز گردو و بررسی ترکیبات شیمیایی، گروه‌های عاملی، میزان فنل، فلاونونوئید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱-۲- تهیه عصاره پوست سبز گردو

۲-۱-۱-۲- تهیه پودر پوست سبز گردو

گردوهای مورد نیاز این پژوهش در سال ۱۴۰۰ از باغات شهرستان سامان واقع در استان چهارمحال و بختیاری به صورت تصادفی جمع‌آوری و خریداری گردید. گردوهای خریداری شده باید کاملاً سالم و فاقد هرگونه آسیب به پوست سبز باشند. لازم به ذکر است که از هیچگونه آفت‌کش شیمیایی در مراحل رشد درختان استفاده نشده بود. نمونه‌ها پس از خرید، شسته و آبکشی شده و سپس پوست‌گیری شدند و پوست‌های سبز جدا شده در یک محیط دور از نور مستقیم و در دمای محیط و در زیر پنکه کاملاً خشک شدند. پس از آن که پوست‌های سبز بطور کامل خشک شدند، به وسیله آسیاب برقی (مولینکس فرانسه) آسیاب

۰/۲۵ میکرون) تجزیه گردید. از گاز حامل هلیوم با سرعت ۱/۵ میلی‌لیتر در دقیقه و انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون استفاده شد. برنامه دمایی ستون از ۴۰ تا ۲۴۶ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۲/۵ درجه در دقیقه تنظیم گردید. شناسایی ترکیبات عصاره در نتیجه مقایسه طیف جرمی آن‌ها با یک طیف و مقایسه ضرایب بازداری آن‌ها با مقادیر مرجع صورت گرفت. ضرایب بازداری (شاخص کوآتر) با استفاده از زمان‌های بازداری آلکان‌های نرمال که با همان دستگاه و تحت همان شرایط تزریق شد، محاسبه گردیدند. مقادیر نسبی اجزا از روی سطح کل پیک‌ها توسط نرم افزار دستگاه محاسبه شدند [۱۲].

۲-۲-۲-۲-آزمون FTIR

برای شناسایی گروه‌های عاملی بیومولکول‌های احتمالی عصاره پوست سبز گردو و ویژگی‌های مولکولی آن از طیف‌سنج مادون قرمز (FT-IR) استفاده می‌شود. طیف مادون قرمز (IR) عصاره پوست سبزگردو در دامنه ی ۴۰۰-۴۰۰۰ CM با استفاده از دستگاه FTIR برند Bruker مدل Vertex70 موجود در دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز اندازه‌گیری و ثبت شد. لازم به ذکر است که نمونه‌ها تا زمان آنالیز در دیسکاتور قرار گرفتند [۱۳].

۲-۲-۳- تعیین محتوای فنول کل

مقدار فنول در عصاره پوست سبز گردو به روش بهبهانی و همکاران (۲۰۱۸)، اندازه‌گیری گردید. مطابق با این روش، ۱ میلی‌لیتر از عصاره رقیق شده پوست سبز گردو را با ۱ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتیو مخلوط شد. پس از گذشت مدت زمان ۳ دقیقه یک میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم سیر شده به مخلوط عصاره و معرف اضافه گردید و این ترکیب را با آب مقطر به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. واکنش در مدت زمان ۹۰ دقیقه و در یک محیط تاریک انجام پذیرفت. پس از اتمام واکنش، جذب در ۷۲۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت گردید. اسید گالیک به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون به کار گرفته شد و میزان ترکیبات فنولی نمونه‌ها به صورت میلی‌گرم اسید گالیک (GAE) بر گرم وزن خشک بیان گردید [۱۴].

معادله ۱

$$x = \frac{y + 0.022}{0.0041}$$

$Y = \text{جذب خوانده شده}$ ، $X = \text{میزان فنول}$

۲-۲-۴- تعیین میزان فلاونونوئیدهای عصاره پوست گردو

مقدار فلاونونوئید در عصاره پوست سبز گردو به روش چانگو همکاران (۲۰۰۲)، اندازه‌گیری گردید. ابتدا ۰/۱ میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد متانولی با ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم یک مولار مخلوط شد و سپس ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر دو بار تقطیر به آن اضافه گردید. در مرحله بعد ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول عصاره که با ۱/۵ میلی‌لیتر متانول مخلوط شده بود، به مخلوط حاوی کلرید آلومینیوم، استات پتاسیم و آب مقطر اضافه شد. مخلوط نهایی حاصل برای هر عصاره (با حجم ۵ میلی‌لیتر) برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. سپس جذب مخلوط واکنش در طول موج ۴۱۵ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر برند BEL مدل Uv-M51 اندازه‌گیری شد. از کوئرتستین به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده گردید. نتیجه به دست آمده براساس میکروگرم بر گرم کوئرتستین به دست آمد [۱۵].

معادله ۲

$$Y = ax + b$$

$Y = \text{جذب خوانده شده}$ از نمونه

$X = \text{غلظت}$

۲-۲-۵- میزان به دام اندازی رادیکال‌های آزاد DPPH

فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های پوست سبز گردو با استفاده از روش اندازه‌گیری کاهش ظرفیت رادیکالی به کمک ۲-۲ دی‌فنیل ۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) مورد بررسی قرار گرفت. DPPH یک ترکیب بنفش رنگ است که به علت حضور گروه‌های فنیل در ساختار آن به راحتی به صورت رادیکال در می‌آید و منبع رادیکال آزاد می‌باشد. توانایی دادن الکترون و یا اتم هیدروژن توسط عصاره‌ها و ترکیبات مختلف در این آزمون با میزان بی‌رنگ کردن یا کاهش میزان جذب نوری محلول بنفش DPPH در متانول مورد بررسی قرار گرفت. غلظت‌های مختلفی (۱- ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) از عصاره پوست سبز گردو و نیز آنتیاکسیدان سنتزی TBHQ در حلال متانول تهیه شد. ۰/۳ میلی‌لیتر از محلول‌های تهیه شده با ۲/۷ میلی‌لیتر محلول متانول حاوی معرف (DPPH غلظت ۰/۱ میلی‌مولار) مخلوط شدند. مخلوط همزده شده و به مدت ۶۰ دقیقه در

ترکیبات موجود در عصاره پوسته گردو در جدول ۱، آورده شده است. در مجموع ۸۹ ترکیب شناسایی شدند که نشان دهنده ۹۹/۹ درصد و کل ترکیبات داخل عصاره بودند. فراوانی ترکیبات تشکیل دهنده در محور عمودی کروماتوگرامو زمان جداسازیدر محور افقی مشخص شده‌اند.

در پژوهش حاضر مقایسه نتایج ترکیبات شیمیایی عصاره پوست سبز گردو با مطالعات پیشین در نقاط مختلف دنیا نشان داده شده است. هرچند اجزای اصلیهصاره تا حدودی مشابه با سایر مطالعات است، اما بااینوجود داراییکسری تفاوت‌هابه‌ویژهدر درصد و نوع ترکیبات شیمیایی‌باشند. تفاوت در میزان ترکیب اصلی گردو را می‌توان به دلایلی همچون تفاوت‌های اکولوژیکی مانند طول و عرض جغرافیایی، ارتفاع، دما، رطوبت، اقلیم و خاک، مسیرهای متابولیکی و بیوسنتز مواد مؤثره در این گیاهان نسبت داد که در نتیجه متابولیت‌های ثانویه متنوعی تحت شرایط محیطی متفاوت، بیوسنتز می‌شود. پژوهش‌های مختلفی این مطلب را تأیید کرده‌اند [۱۸].

مهمترین ترکیبات شناسایی شده که بیشترین سطح زیر منحنی را داشتند شامل پلی‌فنول‌ها، ترکیبات آلی و فیتواسترول‌ها بودند. اکثر ترکیبات فرار معمولاً در پوست سبز گردو وجود دارد. گزارش شده است که بسیاری از فیتوکمیکال‌های شناسایی شده فعالیت‌های زیستی جالب توجه دارند. برای مثال Dihydroxynaphthalene، یک متابولیت زیست‌فعال با فعالیت فیتوتوکسیک است که معمولاً در گیاهان و قارچ‌ها یافت می‌شود. Stigmasterol، استرول گیاهی موجود در عصاره بوده که از فعالیت قوی ضد قارچی، ضد باکتریایی و ضد التهابی برخوردار است. همچنین به عنوان یک گیاه دارویی برای درمان زخم، برونشیت، دیابت و بیماری‌های قلبی نیز محسوب می‌گردد [۱۹].

ترکیبات مثل Hexenal و Hexaborane در عصاره گردو در تحقیقات مختلف گزارش شده است. کوسمولسکا و همکاران (۲۰۱۰)، گزارش کردند که شش ترکیب (اسید فرولیک، اسید وانیلیک، اسید کوماریک، اسید سیرینکیک، میریستین و جوگنون)

تاریکی قرار داده شد. سپس جذب در ۵۱۷ نانومتر به وسیله ی دستگاه اسپکتروفوتومتر برند BEL مدل Uv-M51 اندازه‌گیری شد. فعالیت به دام اندازی رادیکالی توسط رابطه زیر محاسبه گردید [۱۶].

معادله ۳

$$100 \times [(A_c - A_s) / A_c] = \text{به دام اندازی رادیکال آزاد } (\%)$$

که در این رابطه:

AC: جذب کنترل (که حاوی ۱ میلی لیتر متانول در ۱ میلی لیتر محلول DPPH می باشد).

AS: جذب نمونه (که حاوی حجم‌های متفاوتی از عصاره پوست سبز گردو (آنتی اکسیدان)، متانول و محلول DPPH می باشد).

۲-۴- آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها به روش تجزیه واریانس یک طرفه و با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام گردید. برای مقایسه میانگین‌ها از روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد [۱۷].

۳- نتایج و بحث

۳-۱- شناسایی ترکیبات عصاره پوست سبز گردو

۳-۱-۱- نتایج آزمون GC-MS عصاره ی پوست سبز گردو

بررسی پروفایل ترکیبات فرار با کروماتوگرافی گازی متصل به جرم GC-MS برند Agilent مدل ۷۸۹۰ موجود در دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز با سیستم مجهز به ستون موبینه HP-5MS (به طول ۳۰ متر، قطر ۰/۲۵ میلی متر و ضخامت لایه داخلی ۰/۲۵ میکرون) انجام پذیرفت و شناسایی ترکیبات و مقدار هر ترکیب جداگانه به صورت درصد بیان شد. تجزیه و تحلیل بین طیف جرمی مواد با استفاده از سطح زیر منحنی پیک هاو با مقایسه آن با دیتاهای موجود در پایگاه داده‌های Nist. 62 lib. and FFNSC 2 انجام شد.

تنوع در رقم نمونه مرتبط باشد. از دیدگاه فارماکولوژیک، خاصیت آنتی‌اکسیدان، ضد التهابی و ایمنی‌زایی وابسته به ترکیبات پلی‌فنولی می‌باشند. علاوه بر این، اسید چرب غیراشباع مانند اسید هگزادکانوئیک و اسید اکتادکانوئیک قادر هستند بر عملکرد پلاکت‌ها و سیستم قلبی عروقی تأثیرگذار باشند. دیگر اجزایی مانند توکوفرول به عنوان فنول متیله، قادر به تعدیل وضعیت اکسیداتیو هستند [۲۱].

با استفاده از کروماتوگرافی مایع فاز معکوس شناسایی شدند [۲۰]. موثرترین ترکیب شناخته شده در این تحقیق ترکیبات پلی‌فنولی هستند که طبق تحقیقات صورت گرفته مشخص شده است که ترکیبات فنولی به همراه اسیدهای آلی و هگزا متیل‌ها به دلیل ساختار شیمیایی خود از پتانسیل آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی بالایی برخوردار هستند. همان طور که اشاره شد برخی تفاوت‌ها در محتوا و نوع ترکیبات پلی‌فنولی ممکن است با عوامل محیطی و

Table 1 Compounds in skin of walnut extract

Identification of components of green walnut skin extract			
Library/ID	Peak number	Retention Time	Area
Butanal, 3-methyl-	1	3.6018	1.4955
4-Hexenal	2	5.7418	3.1450
2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one	3	9.0663	2.5859
4,5-Diamino-2-hydroxypyrimidine	4	12.0760	5.2923
4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-	5	13.9071	5.8259
2-Furancarboxaldehyde, 5-(hydroxymethyl)-	6	16.3675	10.4701
2,3-.MU.-TRIMETHYLSILYL-CC'-DIMETHYL-4,5-DICARBA-NIDO- HEXABORANE(8)	7	25.3796	14.2348
Phenol, 2-ethoxy-5-(1-propenyl)-	8	27.0905	7.8954
Benzoic acid, 4-hydroxy-3,5-dimethoxy- \$\$ Syringic acid \$\$ 3,5-Dimethoxy-4-hydro	9	30.4893	6.9227
1,7-Dihydroxynaphthalene \$\$ 1,7-Naphthalenediol \$\$ C.I. 76635 \$\$ Naphthalene-1,7		30.6381	7.0173
n-Hexadecanoic acid	10	33.2874	1.7561
9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-	11	36.4688	1.9727
Stigmasterol, 22,23-dihydro-	12	53.6461	4.5169

در شکل ۱، طیف مادون قرمز با تبدیل فوریه، پودر پوست سبز گردو قابل مشاهده است. ایمن طیف تعدادی باند جذبی را نشان می‌دهد که حاکی از پیچیده بودن ماهیت ترکیبات موجود در پوست سبز گردو می‌باشد. در طیف پودر پوست سبز گردو، نوار جذب گسترده در cm^{-1} ۳۴۰۲ نشان دهنده وجود گروه هیدروکسیل (O-H) پیوندی است و می‌تواند اثبات کننده گروه عاملی الکل و یا فنول باشد. پیکجذب در حدود cm^{-1} ۲۹۲۷، ۱۷۲۵ و ۱۰۴۹ به ترتیب به کشش CH- (گروه آلکان)، C=O و C-O اختصاص دارد. جذب مشاهده شده در cm^{-1} ۱۶۰۳ مربوط به کشش C=C

۳-۱-۲- تفسیر طیف مادون قرمز با تبدیل فوریه FT-IR عصاره پوست سبز گردو

برای بررسی ویژگی‌های جذبی و گروه‌های عاملی موجود در پودر پوست سبز گردو از طیف مادون قرمز با تبدیل فوریه (FT-IR) به روش قرص KBr کمک گرفته شد. اطلاعات به دست آمده از طیف‌سنجی مادون قرمز با تبدیل فوریه، بر اساس فرکانس ارتعاشی بر حسب زمان است و طیف حاصل نشانگر درصد جذب یا درصد عبور بر حسب عدد موج است. در نهایت بررسی و تحلیل این طیف، وجود یا عدم وجود گروه‌های عاملی و پیوندها بین عناصر را نشان می‌دهد [۲۲].

۳-۱-۴- ترکیبات فلاونوئیدی عصاره پوست سبز گردو
در این مطالعه ترکیبات فلاونوئیدی عصاره پوست سبز گردو ۳۴۹ میکروگرم بر گرم کوئرستین بود. همانگونه که در مطالعات پیشین نیز مشخص شده بود بین محتوای فنولی و محتوای فلاونوئیدی رابطه موثر و مثبت برقرار است [۲۵]. فلاونوئیدها دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالا بوده و با به دام انداختن رادیکال‌های آزاد و کاهش استرس اکسیداتیو و همچنین مهار ماکرومولکول‌های اکسیداسیون، خطر بیماری‌های دژنراتیو را کاهش می‌دهد [۲۶]. فلاونوئیدها می‌توانند با حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن عملکرد آنتی‌اکسیدانی داخل سلول را افزایش دهند. لازم به ذکر است که مهم‌ترین خصوصیت فلاونوئیدها نقش آن‌ها در پیشگیری از بیماری‌های قلبی می‌باشد [۲۷].

۳-۱-۵- میزان به دام اندازی رادیکال آزاد DPPH

مقادیر EC50 به دست آمده در این پژوهش برابر با ۰/۱۵ بود که با پژوهش وانگ و همکاران (۲۰۱۱) [۲۸] و پیرا و همکاران (۲۰۰۷) [۲۹]، مطابقت دارد. مقایسه مقادیر EC50 برای عصاره پوست سبز گردو و TBHQ نشان می‌دهد که TBHQ دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت به عصاره پوست گردوی حاصل از روش سوکسله می‌باشد. فنول‌ها به دلیل دارا بودن گروه‌های هیدروکسیل دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشند. بنابراین محتوای ترکیبات فنولی در گیاهان ارتباط مستقیمی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها دارد [۳۰]. بسیاری از پژوهشگران رابطه مستقیمی بین محتوای فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی را در میوه‌ها و سبزی‌ها گزارش نموده‌اند. ارتباط مستقیم غلظت پلی‌فنول با فعالیت آنتی‌اکسیدانی در مطالعه الیویرا و همکاران (۲۰۰۸) [۷] و ما و همکاران (۲۰۱۱) [۳۱]، بر روی پوست گردو، نشان داده شده است. نتایج ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره توسط روش بازدارندگی رادیکال DPPH نشان داد که با افزایش غلظت عصاره به ویژه در غلظت‌های کمتر از ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، درصد بازدارندگی رادیکال DPPH شدت می‌یابد که دلیل آن مربوط به افزایش ترکیبات فنولی موجود در عصاره می‌باشد. احتمالاً در غلظت‌های خیلی بالا به دلیل پیدایش

است که ممکن است به گروه آروماتیک لیگنین نسبت داده شود [۲۳ و ۲۴].

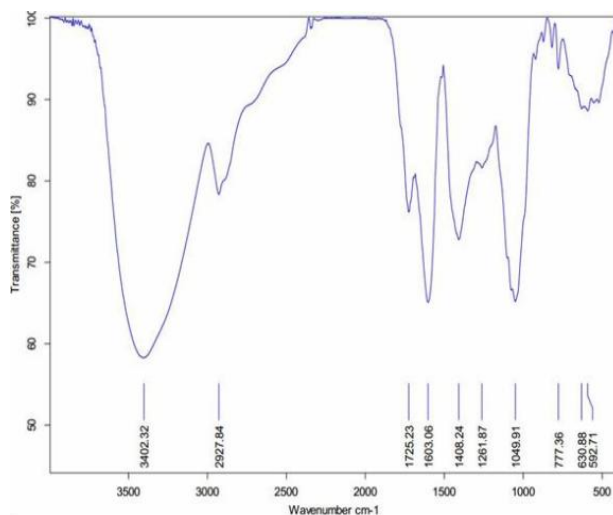


Fig 1 FTIR spectrum of green walnut skin powder

۳-۱-۳- ترکیبات فنولی عصاره پوست سبز گردو

ترکیبات فنولی موادی هستند که خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارند. این ترکیبات در تمامی بخش‌های درخت گردو (میوه، پوست و برگ) موجود است و اثر ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی آن شناخته شده است. بنابراین، اجزای مختلف درخت گردو می‌تواند به عنوان منبع آنتی‌اکسیدان طبیعی و عوامل ضد میکروبی، ارزشمند باشد. تعداد ۱۳ ترکیب فنولی شامل: هیدروکسی سین دامیک اسیدها (اسید کلروژنیک، اسید کافئیک، اسید فرولیک و اسید سیناپیک)، هیدروکسیبنزواتها (اسید گالیک، اسید الاژیک، اسید پروتوکاتیک، اسید سیرینژیک، اسید وانیلیک، فلاونوئیدها کاتکین، اپی کاتکین و میرستن) و جوگلون (هیدروکسی و نفتوکینون) در گردو شناسایی شده است. در بین این ترکیب‌ها جوگلون بیشترین میزان را دارد و ترکیب اصلی موجود در پوست میوه گردو است [۲۰].

در مطالعه حاضر مقدار ترکیبات فنولی در عصاره پوست گردو 967.07 ± 0.22 (میلی‌گرم اسید گالیک بر گرم وزن خشک نمونه) به دست آمد. اولویرا و همکاران (۲۰۰۸)، میزان فنول کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی ۵ واریته مختلف عصاره آبیپوست گردو را ارزیابی نموده و نشان دادند که پوست سبز گردو می‌تواند به عنوان منبع مهمی از ترکیبات محافظت کننده سلامتی و ضد میکروبی مورد توجه قرار گیرد [۷].

1. Degenerative

- [2] Tripoli, E., Giammanco, M., Tabacchi, G., Di Majo, D., Giammanco, S., & La Guardia, M. (2005). The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutrition research reviews*, 18(1), 98-112.
- [3] Cicerale, S., Lucas, L., & Keast, R. (2010). Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil. *International journal of molecular sciences*, 11(2), 458-479.
- [4] Sabatier, S., & Barthélémy, D. (2001). Bud structure in relation to shoot morphology and position on the vegetative annual shoots of *Juglans regia* L. (Juglandaceae). *Annals of Botany*, 87(1), 117-123.
- [5] Nabavi, S. F., Ebrahimzadeh, M. A., Nabavi, S. M., Mahmoudi, M., & Rad, S. K. (2011). Biological activities of *Juglans regia* flowers. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21, 465-470.
- [6] Asadi-Shekaari, M., Karimi, A., Shabani, M., Sheibani, V., & Esmaeilpour, K. (2013). Maternal feeding with walnuts (*Juglans regia*) improves learning and memory in their adult pups. *Avicenna journal of phytomedicine*, 3(4), 341.
- [7] Oliveira, I., Sousa, A., Ferreira, I. C., Bento, A., Estevinho, L., & Pereira, J. A. (2008). Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. *Food and chemical toxicology*, 46(7), 2326-2331.
- [8] Fernández-Agulló, A., Pereira, E., Freire, M. S., Valentao, P., Andrade, P. B., González-Álvarez, J., & Pereira, J. A. (2013). Influence of solvent on the antioxidant and antimicrobial properties of walnut (*Juglans regia* L.) green husk extracts. *Industrial crops and products*, 42, 126-132.
- [9] Beiki, T., Najafpour, G. D., & Hosseini, M. (2018). Evaluation of antimicrobial and dyeing properties of walnut (*Juglans regia* L.) green husk extract for cosmetics. *Coloration Technology*, 134(1), 71-81.
- [10] Darvishi, E., Kahrizi, D., & Arkan, E. (2019). Comparison of different properties of zinc oxide nanoparticles synthesized by the green (using *Juglans regia* L. leaf extract) and chemical methods. *Journal of Molecular Liquids*, 286, 110831.
- [11] Liu, J., Meng, M., Li, C., Huang, X., & Di, D. (2008). Simultaneous determination of three diarylheptanoids and an α -tetralone derivative in

نوعی حالت اشباع شدگی، افزایش غلظت تأثیر معنی‌داری بر میزان مهار رادیکال‌های آزاد ندارد. این نتایج نشان می‌دهد یک غلظت بحرانی از ترکیبات فنولی برای مهار رادیکال‌های آزاد کافی است [۳۲].

Table 2 The amount of EC50 according to DPPH

EC50	Antioxidant compound
0.15±0.0008	Green walnut skin extract
0.08±0.0006	TBHQ

۴- نتیجه‌گیری کلی

امروزه پوست سبز گردو که سالانه مقادیر بسیار زیادی از آن تولید می‌شود، بدون استفاده و عمدتاً به‌عنوان ضایعات در نظر گرفته می‌شود. در حالی که ترکیبات زیست‌فعال موجود در آن می‌تواند به‌عنوان یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی طبیعی مورد استفاده قرار گیرد. این تحقیق با هدف تعیین دقیق ساختار شیمیایی و گروه‌های عاملی زیست‌فعال موجود در پوست سبز گردو به انجام رسیده است. همچنین میزان فنل، فلاونوئید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره این محصول نیز تعیین شده است. پیشنهاد می‌شود در آینده کاربرد این ترکیب به‌عنوان یک ماده ضد میکروبی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا در افزایش زمان ماندگاری محصولات غذایی، بخصوص فرآورده‌های گوشتی بررسی گردد.

۵- تقدیر و تشکر

مقاله حاضر مستخرج از پایان نامه مصوب با کد ۵۷۵۷۳ / ۳ در دانشگاه فردوسی مشهد می‌باشد. نویسندگان مقاله بر خود لازم میدانند که از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد به دلیل مساعدتهای مالی جهت اجرای این طرح پژوهشی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

۶- منابع

- [1] Soto-Hernández, M., Tenango, M. P., & García-Mateos, R. (Eds.). (2017). Phenolic compounds: biological activity. *BoD-Books on Demand*.

- NotulaeBotanicaeHortiAgrobotanici Cluj-Napoca, 38(1), 53-56.
- [21] Wang, J., Zhao, J., Nie, S., Xie, M., & Li, S. (2022). MALDI mass spectrometry in food carbohydrates analysis: A review of recent researches. *Food Chemistry*, 133968.
- [22] Darvishi, E., Kahrizi, D., & Arkan, E. (2019). Comparison of different properties of zinc oxide nanoparticles synthesized by the green (using *Juglans regia* L. leaf extract) and chemical methods. *Journal of Molecular Liquids*, 286, 110831.
- [23] Haddadi, S. A., Alibakhshi, E., Bahlakeh, G., Ramezanzadeh, B., & Mahdavian, M. (2019). A detailed atomic level computational and electrochemical exploration of the *Juglans regia* green fruit shell extract as a sustainable and highly efficient green corrosion inhibitor for mild steel in 3.5 wt% NaCl solution. *Journal of molecular liquids*, 284, 682-699.
- [24] Akin, M., Nalbantoglu, S., Cuhadar, O., Uzun, D., & Saki, N. (2015). *Juglans regia* L. extract as green inhibitor for stainless steel and aluminium in acidic media. *Research on Chemical Intermediates*, 41(2), 899-912.
- [25] Kamali, M., Khosroyar, S., & Jalilvand, M. R. (2014). Evaluation of phenolic, flavonoids, anthocyanin contents and antioxidant capacities of different extracts of aerial parts of *Dracocephalumkotschyi*. *Journal of North Khorasan University of Medical Sciences*, 6(3), 627-634.
- [26] Ortega, J. T., Parmar, T., Golczak, M., & Jastrzebska, B. (2021). Protective effects of flavonoids in acute models of light-induced retinal degeneration. *Molecular Pharmacology*, 99(1), 60-77.
- [27] Kesarkar, S., Bhandage, A., Deshmukh, S., Shevkar, K., & Abhyankar, M. (2009). Flavonoids: an overview. *Journal of Pharmacy Research*, 2(6), 1148-1154.
- [28] Wang, H., Liu, F., Yang, L., Zu, Y., Wang, H., Qu, S., & Zhang, Y. (2011). Oxidative stability of fish oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during long-term storage. *Food Chemistry*, 128(1), 93-99.
- [29] Pereira, J. A., Oliveira, I., Sousa, A., Valentão, P., Andrade, P. B., Ferreira, I. C., ... & Estevinho, L. (2007). Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: Phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different the green walnut husks (*Juglans regia* L.) by high-performance liquid chromatography with photodiode array detector. *Journal of Chromatography A*, 1190(1-2), 80-85.
- [12] AlizadehBehbahani, B., Falah, F., Vasiee, A., & TabatabaeeYazdi, F. (2021). Control of microbial growth and lipid oxidation in beef using a *Lepidiumperfoliatum* seed mucilage edible coating incorporated with chicory essential oil. *Food science & nutrition*, 9(5), 2458-2467.
- [13] Falah, F., Vasiee, A., Tabatabaee-Yazdi, F., Moradi, S., & Sabahi, S. (2022). Optimization of γ -aminobutyric acid (GABA) production by *Lactobacillus* spp. from agro-food waste. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-13.
- [14] Behbahani, B. A., Yazdi, F. T., Vasiee, A., & Mortazavi, S. A. (2018). *Oliveriadicumbens* essential oil: Chemical compositions and antimicrobial activity against the growth of some clinical and standard strains causing infection. *Microbial pathogenesis*, 114, 449-452.
- [15] 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).
- [16] Gao, P., Liu, R., Jin, Q., & Wang, X. (2021). Effects of processing methods on the chemical composition and antioxidant capacity of walnut (*Juglans regia* L.) oil. *LWT*, 135, 109958.
- [17] Carvalho, M., Ferreira, P. J., Mendes, V. S., Silva, R., Pereira, J. A., Jerónimo, C., & Silva, B. M. (2010). Human cancer cell antiproliferative and antioxidant activities of *Juglans regia* L. *Food and chemical toxicology*, 48(1), 441-447.
- [18] Keskin, D., Ceyhan, N., & Ugur, A. (2012). Chemical composition and in vitro antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia*) green husks and leaves from West Anatolia. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 6(2), 583-588.
- [19] Mandrika, I., Kumar, S., Zandersone, B., Eranezhath, S. S., Petrovska, R., Liduma, I., ... & Tracevska, T. (2021). Antibacterial and anti-inflammatory potential of polyherbal formulation used in chronic wound healing. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021.
- [20] Cosmulescu, S. N., Trandafir, I., Achim, G., Mihai, B. O. T. U., Baci, A., & Gruia, M. (2010). Phenolics of green husk in mature walnut fruits.

- acids and phenols from walnut shell pyrolytic acid. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 91(2), 338-343.
- [32] Ling, B., Hou, L., Li, R., & Wang, S. (2014). Thermal treatment and storage condition effects on walnut paste quality associated with enzyme inactivation. *LWT-Food Science and Technology*, 59(2), 786-793.
- cultivars. *Food and chemical toxicology*, 45(11), 2287-2295.
- [30] Zhang, Y., Yang, L., Zu, Y., Chen, X., Wang, F., & Liu, F. (2010). Oxidative stability of sunflower oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during accelerated storage. *Food chemistry*, 118(3), 656-662.
- [31] Ma, X., Wei, Q., Zhang, S., Shi, L., & Zhao, Z. (2011). Isolation and bioactivities of organic



Homepage: www.fsct.modares.ir

Journal of Food Science and Technology (Iran)

Scientific Research

Evaluation the chemical composition, phenol, flavonoid and antioxidant activity of walnut skin extract (*Juglans regia L.*)

RafieiDehkordi, Z.¹, Sedaghat, N.^{2*}, Sabahi, S.³

1. MS.c in Food Science and Technology, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
2. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
3. Assistant Professor, Department of Nutrition, School of Allied Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Article History:

Received 2023/02/08
Accepted 2023/03/14

Keywords:

Green skin of walnut,
Chemical compounds,
Antioxidant activity.

DOI: 10.22034/FSCT.19.135.103
DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.135.9.5

*Corresponding Author E-Mail:
sedaghat@um.ac.ir

Today, consumers are more inclined to use healthy and natural additives. Phenolic compounds obtained from natural products are a good option to minimize lipid oxidation. Walnut is one of the most important nuts that is widely cultivated all over the world. Due to the fact that the green skin of the walnut contains about 64% of the wet weight of the walnut fruit, an amount equal to 240 thousand tons of green skin of the walnut is produced from this fruit every year. The walnuts used in this study were purchased in 1400 from the gardens of Saman city located in Chaharmahal and Bakhtiari province. After powdering the dried green peel, extracting with methanol solvent was done by Soxhlet method. In order to identify chemical compounds and functional groups, GC-MS and FTIR tests were performed. Also, the amount of phenol and flavonoids in the extract of walnut skin was measured. Finally, the antioxidant activity of green walnut skin extract was investigated by measuring the reduction of radical capacity with the help of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). A total of 89 compounds were identified, representing 99.9% of the total compounds in the extract. The most important identified compounds that had the highest area under the curve included polyphenols, organic compounds and phytosterols. FTIR results indicate the presence of hydroxyl, alkane and aromatic functional groups of lignin. In the present study, the amount of phenolic compounds in walnut peel extract was 96.07 ± 0.22 (mg of gallic acid per gram of dry weight of the sample). Also, the flavonoid compounds of green walnut skin extract were $349 \mu\text{g/g}$ of quercetin. EC50 values obtained in this study were equal to 0.15. The results showed that the methanolic extract of green walnut skin can be introduced as a substitute for synthetic antioxidants.