مقایسه فنل کل و خواص آنتی اکسیدانی پوست سبز گردوی سه منطقه از شمال ایران (شاهرود، بندر گز و هزار جریب)

محمد دولت آبادی[1]، زینب رفتنی امیری[2*]، رضا اسماعیل زاده کناری[3]

١- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
٢- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
٣- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

(تاریخ دریافت: ٩٣/٢/٢٣ تاریخ پذیرش: ٩٣/٧/٨)

چکیده

پوست سبز گردو از ضایعات گردو است که می تواند منبع ترکیبات طبیعی با خواص آنتی اکسیدانی ارزشمند باشد. در این پژوهش، تاثیر مناطق (شاهرود، بندر گز و هزار جریب)، حلال (اتانول ٩٦٪، آب و اتانول – آب به نسبت ١:١ حجمی) و زمان استخراج (٦ الی ٢٤ ساعت) بر بازدهی استخراج ترکیبات فنلی پوست سبز گردو به روش غرقابی در دمای محیط در قالب آزمایش فاکتوریل با سه تکرار در طرح کاملا تصادفی مورد بررسی قرار گرفت. سپس، خواص زیست فعالی عصاره پوست سبز گردو در طرح کاملا تصادفی مقایسه شد. محتوای فنل کل عصاره توسط روش فولین سیوکالتیو تعیین شد. فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره با استفاده از سنجش قدرت احیاکنندگی آهن III و توانایی مهار رادیکال های آزاد DPPH مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این پژوهش نشان می دهد که نوع حلال از نظر میزان قطبیت، زمان و منطقه رویش این گیاه بر مقدار ترکیبات فنولی استخراجی نقش موثری داشته و همچنین فعالیت و خواص آنتی اکسیدانی به غلظت ترکیبات فنولی عصاره بستگی دارد. بالاترین مقدار ترکیبات فنولی با ٤٩/٦٦ میلی گرم بر گرم (بر حسب اسید گالیگ) مربوط به پوست سبز گردوی منطقه هزار جریب با حلال آب – اتانول به نسبت ١:١ حجمی در ٢٤ ساعت بوده است. همچنین بالاترین خواص آنتی اکسیدانی در همین عصاره دیده شد.

کلید واژه گان: پوست سبز گردو، ترکیبات فنولی، حلال، خواص آنتی اکسیدانی

* مسئول مکاتبات: zramiri@gmail.com

۱- مقدمه

گردو درختی است که به طور سنتی برای چوب و میوه ارزشمند آن کشت می شود. دانه گردو دارای منافع اقتصادی زیادی در صنایع غذایی است و بخاطر ویژگی های تغذیه ای ، بهداشتی در سراسر جهان محبوب و با ارزش است [۱]. دیگر محصولات به دست آمده از درخت گردو دارای کاربردهای متعددی است ازجمله پوست سبز گردو، پوست و برگ درخت که در صنایع آرایشی و بهداشتی و دارویی استفاده می شود [۲]. پوست سبز گردو به عنوان مواد اولیه برای نوشیدنی سنتی گردو مورد استفاده می باشد [۲]. اثرات مفید ترکیبات فنلی از جمله خاصیت ضد سرطانی، ضد جهش و محافظت از قلب و همچنین مشکوک به سمی بودن آنتی اکسیدان های مصنوعی، منجر به مطالعات متعددی برای به دست آوردن این ترکیبات از منابع طبیعی شده است. به همین منظور ضایعات صنایع غذایی ، جنگل و یا کشاورزی مورد توجه قرار گرفت. با به کار گیری این ضایعات جهت تولید آنتی اکسیدان های طبیعی علاوه بر مقرون به صرفه شدن تولید به حفظ محیط زیست نیز کمک می شود[۳].

تمایل مصرف کنندگان به پرهیز از مصرف محصولات با نگهدارنده هایی با منشا شیمیایی که با افزایش مقاومت به آنتی بیوتیک ها همراه است [۵و٤] رو به افزایش است [٦]. ترکیبات فنلی موادی هستند که خاصیت آنتی اکسیدانی دارند. این ترکیبات در تمامی بخش های درخت گردو (میوه، پوست وبرگ) موجود است و اثر ضد میکروبی وآنتی اکسیدانی آن شناخته شده است. بنابراین، اجزای مختلف درخت گردو می تواند ، به عنوان منبع آنتی اکسیدان طبیعی و عوامل ضد میکروبی، ارزشمند باشد[۲]. در این راستا ، مغز گردو قبلا به عنوان یک آنتی اکسیدان توسط لی و همکاران [۷] و لابوکاس و همکاران [۸] و زهانگ و همکاران [٦] مورد ارزیابی قرار گرفته است.

یکی از محصولات عمده ضایعات تولید گردو، پوست سبز آن است که کمتر مورد استفاده قرار گرفته است. الیویرا و همکاران اثر حلالهایی با قطبیت متفاوت (آب ، اتانول و آب – اتانول به نسبت (۱:۱)) را بر خواص عصاره پوست سبز گردو بررسی کرده و گزارش نمودند که مخلوط حلال قطبی و غیر قطبی بازده استخراج ترکیبات فنلی را افزایش داده و منجر به افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی می شوند [۹]. پژوهشگران دیگر مانند لی و همکاران [۷] و زهانگ و همکاران [٦] هم از این حلال ها برای استخراج ترکیبات فنلی از سایر منابع طبیعی استفاده کردند که نتیجه مشابهی در مورد اثر حلال های قطبی وغیر قطبی بر استخراج ترکیبات فنلی اعلام نمودند. لی و همکاران در سال ۲۰۰٦ ترکیبات فنلی استخراجی از پوست پنج گونه مرکبات (لیموین بن، لیمو ماير، گریپ فروت ، نارنگی و پرتقال) با استفاده از حلال اتانول وآب را بررسی کردند. نتایج حاکی از آن بود که پارامترهای اصلی تاثیر گذار روی بازده استخراج پلی فنل ها، شرایط پوست، دمای استخراج، غلظت حلال و گونه مرکبات می باشد. گریپ فروت دارای بالاترین ترکیبات فنلی بوده است. در مورد تاثیر دما نیز با افزایش دما تا ۸۰ درجه سلیسوس بازده استخراج افزایش یافت [۷]. در پژوهشی که توسط تاباتا وهمکاران انجام شد، با بررسی خواص آنتی اکسیدانی عصاره استخراجی از برگ چای سبز به وسیله حلال آب داغ به این نتیجه رسیدند که هرچه میزان فنل کل در عصاره های استخراجی بیشتر باشد، فعالیت مهاری رادیکال های آزاد DPPH[1] بالاترخواهد بود [۱۰]. در پژوهشی که توسط کاسازا و همکاران انجام شد، ترکیبات فنلی بقایای میوه انگور را با حلال های اتانول و متانول توسط روش های غیر سنتی استخراج کردند، بالاترین قدرت مهار رادیکال آزاد مربوط به عصاره متانولی در مقایسه با عصاره اتانولی بوده است که مطابق با مقدار فنل کل عصاره ها بوده است [۱۱].

ترکیبات فنلی عصاره پوست سبز گردو توسط استامپار و همکاران مورد تجزیه قرار گرفت و ترکیبات سازنده آن مشخص گردید، تعداد ۱۳ ترکیب فنولی شامل: هیدروکسی سینامیک اسیدها (اسید کلروژنیک، اسید کافئیک، اسید فرولیک و اسید سیناپیک) و هیدروکسی بنزوئیک اسیدها (اسید گالیک،اسید الاژیک، اسید پروتوکاتئیک، اسید سیرینژیک و اسید وانیلیک) و فلاونوئیدها (کاتکین، اپی کاتکین، میرستن و ژوگلون) در گردو شناسایی شده است. در بین این ترکیب ها ژوگلون بیشترین میزان را دارد و ترکیب اصلی موجود در پوست سبز گردو است [۲]. پوست سبز گردو از ضایعات کشاورزی است که پتانسیل انجام تحقیقات تکنولوژیکی را دارد. لذا این تحقیق با هدف مقایسه ترکیبات فنل استخراج شده از پوست سبز گردوی سه منطقه در شمال ایران با حلال

1. ۲ ۲ ، دی فنیل ۱ – پیکرو هیدرازیل

ها و زمان های مختلف استخراج و هم چنین قدرت آنتی اکسیدانی آن ها برای اولین بار انجام شده است.

٢- مواد و روش ها

٢-١- مواد شیمیایی مورد استفاده

از معرف فولین سیو کالتیو، فری سیانید آهن، تری کلرو استیک اسید، کلرید آهن و الکل اتانول ٩٦٪ ساخت شرکت مرک آلمان استفاده شد.

٢-٢- روش ها

٢-٢- ١- نمونه برداری

برداشت گردو در شهرستان بندرگز با آب و هوای معتدل خزری دراول مهر ماه و شهرستان شاهرود با آب و هوای نیمه خشک در١٥مهر ماه ومنطقه هزارجریب واقع در ارتفاعات البزر با آب وهوای کوهستانی در ٢٥ مهر ماه سال ١٣٩٢ با انتخاب تصادفی چند درخت گردو در یکی از باغ های هر منطقه، به صورت دست چین، بدون هیچ گونه آسیبی به پوست سبز آن و به صورت کاملا تصادفی انجام شد. عمر درختان گردو حدود ٣٥ تا ٤٠ سال بوده که هرس نشده و از آفت کش شیمیایی نیز استفاده نشده بود. پس از تمیز کردن گردوهای جمع آوری شده، پوست سبز آن جدا شد و تا انجام آزمایش در دمای ١٨- درجه سلسیوس نگهداری شد.

٢-٢-٢- آماده سازی نمونه برای استخراج ترکیبات فنولی

پوست های سبز گردو از فریزر خارج شده و قبل از یخ زدایی توسط آسیاب خانگی (ساخت شرکت سانیو) خرد شده و بلافاصله نسبت به استخراج ترکیبات فنلی آن اقدام شد.

٢-٢-٣- استخراج ترکیبات فنلی

استخراج ترکیبات فنلی با استفاده از روش فرناندز و همکاران [١٢] با کمی تغییرات انجام شد. حلال انتخابی (آب مقطر، اتانول ٩٦٪ و آب- اتانول(١:١ حجمی)) بوده و برای هر یک از حلال ها چهار زمان استخراج (٦، ١٢، ١٨ و ٢٤ ساعت) در دمای محیط به روش غرقابی منظور شد. مقدار ١٠گرم پوست سبز گردو با ١٠٠ میلی لیتر از هر یک از حلال ها با همزن مگنتی با دور٦٠ دور در دقیقه مخلوط شد. عصاره ها با کاغذ صافی صاف شده و توسط تبخیر کننده چرخشی در دمای ٤٠ درجه سانتیگراد تغلیظ شدند. سپس عصاره های استخراجی با آب مقطر به حجم ١٠٠ میلی لیتر رسانده شده و ترکیبات فنل کل و فعالیت آنتی اکسیدانی آن ها اندازه گیری شد.

٢-٢-٤- اندازه گیری ترکیبات فنلی

میزان کل ترکیبات فنلی عصاره پوست سبزگردو با استفاده از معرف فولین سیو کالتیو و مطابق روش سیداد هارجو و همکاران [١٣] انجام شد. به ١ میلی لیتر عصاره، ١ میلی لیتر محلول فولین سیو کالتیو ٠/١ درصد و ٠/٨ میلی لیتر محلول کربنات سدیم اضافه کرده و به مدت ٢ ساعت در تاریکی نگهداری نموده و سپس ١ میلی لیتر از محلول بدست آمده را به حجم ١٠ میلی لیتر با آب مقطر رقیق نموده و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (یونیکو uv,vis ٢١٠٠) جذب هر یک از نمونه ها ، در طول موج ٧٦٠ نانو متر قرائت شد. غلظت ترکیبات فنلی بر حسب اسید گالیک با استفاده از منحنی استاندارد رسم شده با معادله y=٠/٠٠٢٥ x-٠/٠٢٩٢ و R^2=٠/٩٩٨٨ محاسبه شد.

٢-٢-٥- ارزیابی فعالیت مهار رادیکال های آزاد DPPH

توانایی مهار رادیکال آزاد DPPH به روش لی وهمکاران [١٤] انجام شد. ابتدا ١ میلی لیتر از عصاره با غلظت ٢٥ میکرو گرم بر میلی لیتر را با ١ میلی لیتر از محلول متانولی یک میلی مولار DPPH به شدت مخلوط کرده و به مدت ٣٠ دقیقه در دمای آزمایشگاه در مکانی تاریک نگهداری کرده و جذب آن در طول موج ٥١٧ نانومتر خوانده شد و درصد مهار رادیکال های آزاد DPPH طبق فرمول زیر محاسبه شد.

درصد مهار رادیکال های DPPH = (درصد جذب شاهد − درصد جذب نمونه) / درصد جذب شاهد

٢-٢-٦- ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ها به روش قدرت احیا کنندگی

اندازه گیری قدرت احیا کنندگی با استفاده از روش بکار گرفته توسط عربشاهی و همکاران [١٥] انجام شد. یک میلی لیتر از عصاره را به وسیله آب دیونایز به حجم ١٠ میلی لیتر رسانیده و سپس ٢/٥ میلی لیتر از آن را با ٢/٥ میلی لیتر بافر فسفات سدیم ٠/٢ مولار دارای pH=٦/٦ دریک لوله آزمایش مخلوط کرده و به آن مقدار ٢/٥ میلی لیتر فری سیانید آهن (١٪ وزنی/حجمی) اضافه کرده و به مدت ٢٠ دقیقه در دمای ٥٠ درجه سلسیوس اینکوبه نموده و سپس به آن ٢/٥ میلی لیتر تری کلرو استیک اسید (١٠٪ حجمی / حجمی) افزوده و آنگاه با استفاده از سانتریفوژ با دور ١٠٠٠ دور در دقیقه به مدت

۱۰دقیقه مخلوط را سانتریفوژ کرده و سپس از فاز فوقانی مقدار ۲/۵ میلی لیتر برداشته و با ۰/۵ میلی لیتر کلرید آهن III (۰/۱٪ وزنی/حجمی) مخلوط کرده آنگاه جذب محلول بدست آمده توسط دستگاه اسپکترفتومتر در طول موج ۷۰۰ نانومتر اندازه گیری شد.

۲-۳- تجزیه وتحلیل آماری

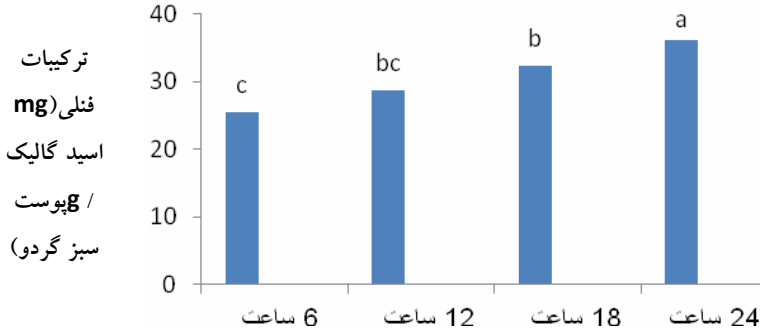
اثر متغیرهای منطقه (هزار جریب، بندر گز و شاهرود)، زمان استخراج (٦، ۱۲، ۱۸ و ٢٤ ساعت) و حلال (آب، الکل و آب – الکل (۱:۱)) بر میزان ترکیبات فنلی پوست سبز گردو با استفاده از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی در سه تکرار مورد بررسی قرار گرفت. سپس تاثیر منطقه، حلال و زمان استخراج بر درصد مهار رادیکال های آزاد و هم چنین قدرت احیا کنندگی در طرح کاملا تصادفی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. میانگین داده ها بر اساس آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵٪ مطالعه شد و آنالیز داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS - 19 و رسم نمودارها با نرم افزار Excel انجام شد.

۳- نتایج وبحث

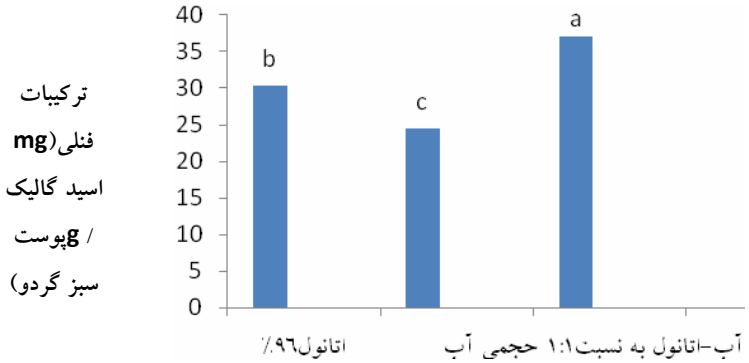
۳-۱- ترکیبات فنلی

نتایج آنالیز واریانس، نشان داد که هر یک از متغیر ها (زمان ، حلال و منطقه) واثر متقابل حلال – منطقه وحلال – زمان تاثیر معنی داری بر مقدار ترکیبات فنلی استخراجی در سطح($P < ۰/۰۵$) دارند. با توجه به شکل۱، بیشترین غلظت ترکیبات فنلی در زمان ٢٤ ساعت مشاهده شد و با سایر زمان ها اختلاف معنی داری دارد. همچنین باتوجه به شکل ۲، بیشترین غلظت ترکیبات فنلی متعلق به حلال اتانول - آب (۱:۱) می باشد و با توجه به شکل ۳ از نظر منطقه، بالاترین ترکیبات فنلی مربوط به پوست سبز گردوی منطقه هزارجریب بوده که با منطقه شاهرود اختلاف معنی داری ندارد و با توجه به شکل۲، ترکیبات فنلی موجود در عصاره های آبی کمتر از عصاره های الکلی می باشد. آب به عنوان یک حلال قطبی، یک محیط قطبی ایجاد می کند که در این محیط ترکیباتی با قطبیت پایین، کمتر استخراج می گردند و به همین علت میزان ترکیبات فنلی استخراج شده با آب کاهش می یابد [١٦]. در عوض با افزودن آب به حلال های آلی یک محیط نسبتاً قطبی تشکیل می گردد که می تواند مقادیر و انواع بیشتری از ترکیبات فنلی با قطبیت متوسط را استخراج کند [١٦]. از طرف دیگر حضور مقادیر مناسب آب در حلال آلی ، به صورت مطلوبی موجب افزایش تورم بافت گیاهی می گردد که این تورم، موجب افزایش سطح تماس بین ماتریکس گیاهی و حلال شده و در نتیجه باعث افزایش میزان استخراج می شود [۱۷]. میزان قطبیت حلال های مختلف میزان استخراج ترکیبات فنولی را تحت تاثیر قرار می دهد[۱۸]. ترکیبات فنلی عصاره های حاصل از حلال های مختلف، از نظر مقدار ترکیبات فنل کل و میزان فعالیت آنتی اکسیدانی متفاوتند، حلالیت ترکیبات فنلی بسته به نوع حلال، درجه پلیمریزاسیون آن ها و برکنش آن ها با سایر ترکیبات موجود در بافت های گیاهی متفاوت است. گزارش شده که حلال های اتانول و متانول به صورت مخلوط با آب (٤٠-٨٠ درصد) توانایی بیشتری نسبت به حالت خاص الکلی خود در استخراج ترکیبات فنلی از بافت های گیاهی دارند [۱۹]. زمان استخراج تاثیر معنی داری روی میزان استخراج ترکیبات فنلی کل داشته، زیرا با گذشت زمان حلال فرصت پیدا می کند که به درون بافت گیاه نفوذ کرده وهمچنین ترکیبات فنلی نیز فرصت کافی برای جدا شدن از ماتریکس و ورود به حلال را دارند [۲۰]. همان طور که در نمودار ۳ مشاهده می شود با افزایش زمان استخراج در حلال ها، میزان ترکیبات فنلی افزایش یافت. در تحقیقی که توسط رضایی ارمی وهمکاران بر روی عصاره استخراجی برگ گرودی شهمیرزاد بومی ایرانی انجام شد زمان های انتخابی برای استخراج ٦،۱۲،۱۸،٢٤ ساعت بود، که بیشترین عصاره استخراجی در حلال اتانول – آب با نسبت ۵۰٪ مربوط به زمان ٢٤ ساعت با مقدار٨٤/٦٢ (میلی گرم گالیک اسید در هر گرم وزن خشک) گزارش نمودند [۲۱] که مشابه این پژوهش می باشد. در مطالعه ای که فرناندز و همکاران بر روی پوست سبز گردو داشتند، با انتخاب حلال های مختلف بیشترین راندمان استخراج رابه حلال اتانول۵۰٪ نسبت دادند [۱۲].همچنین الیویرا و همکاران با مطالعه بر روی پوست سبز گردو از پنج رقم گردوی مختلف نتایج مشابه فرناندز وهمکاران بدست آوردند وبالاترین فنل کل متعلق به عصاره رقم Franquette به مقدار ٧٤/٠٨ میلی گرم بر گرم بود [۹] که مشابه این پژوهش می باشد. چان و همکاران فعالیت آنتی اکسیدانی پونه کوهی را بررسی و گزارش کردند

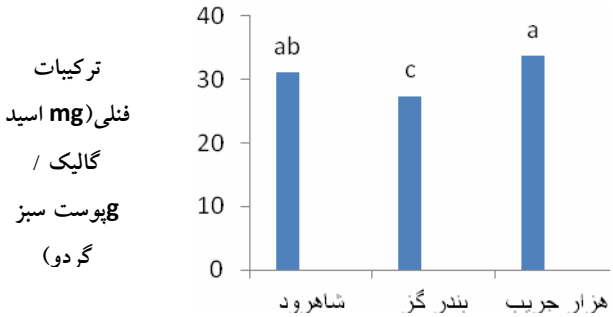
که در بین حلال های انتخابی حلال اتانول ۶۰٪، بالاترین مقدار استخراج ترکیبات فنولی در آن مشاهده شد [۲۲]. سان و همکاران نیز گزارش کردند که در استخراج ترکیبات فنولی از مارچوبه و بروکلی اتانول و استن کاراتر از آب بوده اند [۲۳] که مطابق نتایج این پژوهش می باشد.



شکل ۱ مقایسه میانگین ترکیبات فنلی استخراج شده از نمونه ها در زمان های مختلف استخراج



شکل ۲ مقایسه میانگین ترکیبات فنلی استخراج شده از نمونه ها با حلال های مختلف

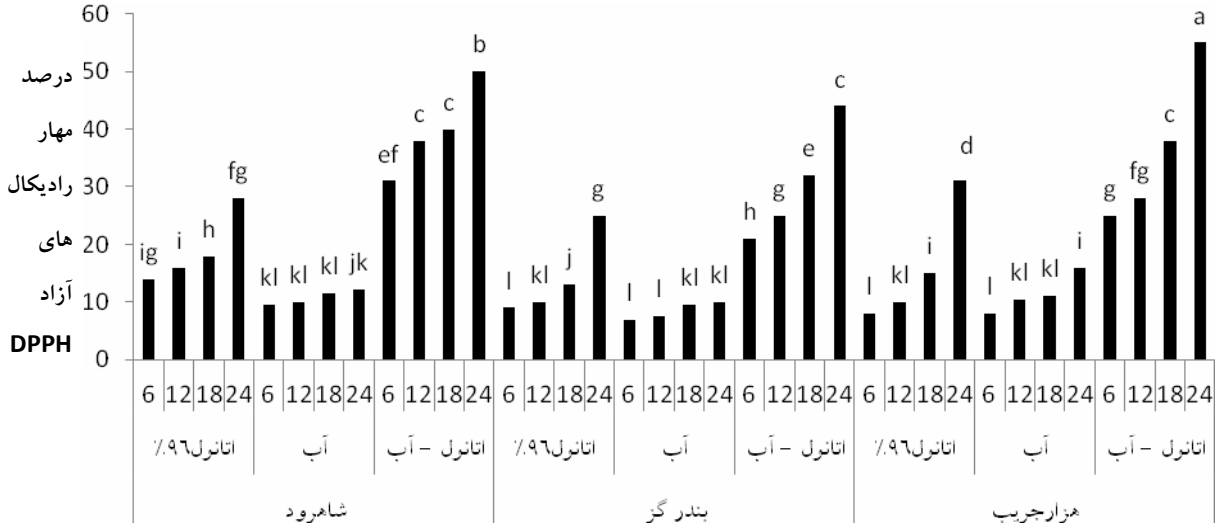


شکل ۳ مقایسه میانگین مقدارترکیبات فنلی استخراجی سه منطقه

۳-۲- مهار رادیکال های آزاد DPPH

شکل ٤ مقایسه میانگین میزان مهار رادیکال های آزاد DPPH توسط این عصاره را نشان می دهد. نتایج آنالیز واریانس داده ها ی حاصله نشان داد که غلظت ترکیبات فنلی نقش موثری بر مهار رادیکال های آزاد DPPH داشته و به همین دلیل اختلاف معنی داری بین نمونه ها حاصل گردیده است($P<0/05$). مطابق شکل ۳ یشترین غلظت ترکیبات فنلی متعلق به حلال اتانول – آب (۱:۱حجمی) در زمان ۲٤ ساعت بوده و بیشترین مهار رادیکال های آزاد DPPH به مقدار ۵۵٪ متعلق به همین عصاره است. با افزایش غلظت ترکیبات فنولی فعالیت مهار رادیکال های آزاد افزایش می یابد، زیرا در غلظت های بالاتر ترکیبات فنلی، به دلیل افزایش تعداد گروه های هیدروکسیل موجود در محیط واکنش، احتمال اهدای هیدروژن به رادیکال های آزاد DPPH و به دنبال آن قدرت مهار کنندگی عصاره افزایش می یابد [۲۳] و همان طوری که در نمودار ٤ مشاهده می شود با افزایش غلظت ترکیبات فنولی

میزان بیشتری از رادیکال های DPPH مهار شده است. نتایج مطالعه فرناندز همکاران بر روی پوست سبز گردو نشان داد که بالاترین مهار رادیکال های آزاد DPPH برای عصاره های۵۰٪ اتانول و کمترین برای عصاره آبی بوده است [۱۲]. همچنین الیویرا و همکاران با مطالعه بر روی پوست سبز گردو از پنج رقم گردوی مختلف نتیجه گرفتند که بالاترین مهار رادیکال های آزاد DPPH متعلق به عصاره اتانولی و آب می باشد [۹]. یانگ و همکاران فعالیت آنتی اکسیدانی سه نوع قارچ تجاری(وینتر، شیتیک، اویستر) را بررسی کرده وگزارش کردند که قارچ اویستر بعلت دارا بودن بالاترین مقدار ترکیبات فنولی دارای بالاترین خواص آنتی اکسیدانی، نیروی احیا کنندگی و توانایی مهار رادیکال های آزاد نیز می باشد [۲٤]. عربشاهی وعروج فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره برگ شاه توت را مورد مطالعه قرار دادند وگزارش نمودند که عصاره متانولی دارای بیشترین مقدار ترکیبات فنولی بوده و همچنین بعلت بالا بودن ترکیبات فنول کل، دارای بالاترین مهار رادیکال های آزاد DPPH می باشد [۱۵]. زانک و همکاران ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره اتانولی بافت های مختلف (پوست، دانه، پالپ) عناب چینی را بررسی کردند، نتایج نشان داد که در همه رقم ها، پوست بالاترین مقدار ترکیبات فنولی (فلاونوئیدی وآنتوسیانین) و بالاترین مهار رادیکال های آزاد DPPH را دارد [۲۵] که مطابق نتایج این پژوهش می باشد.

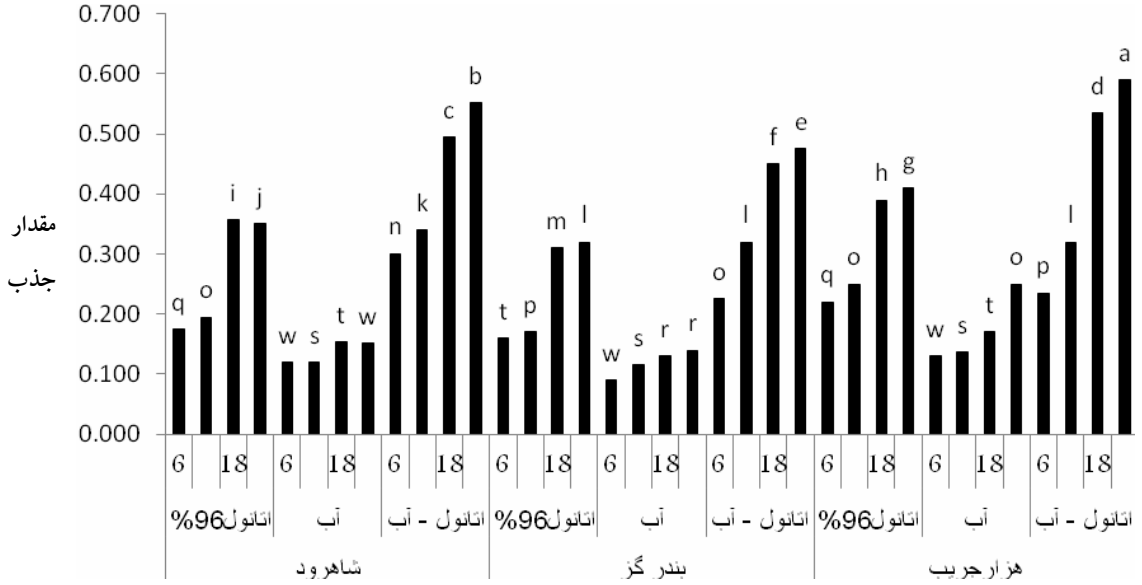


شکل٤ مقایسه میانگین درصد مهار رادیکال های آزاد DPPH عصاره های استخراجی سه منطقه با حلال ها و زمان های مختلف استخراج

۳-۳- قدرت احیا کنندگی

شکل ۵ مقایسه میانگین مقدار قدرت احیا کنندگی توسط این عصاره را نشان می دهد. نتایج آنالیز واریانس داده ها ی حاصله نشان داد که مقدار ترکیبات فنولی علاوه بر تاثیر بر مهار رادیکال های آزاد DPPH برقدرت احیا کنندگی موثر بوده واختلاف معنی دار است($P < ۰/۰۵$). بیشترین غلظت ترکیبات فنلی متعلق به حلال اتانول - آب (۱:۱حجمی) در زمان ۲٤ ساعت بوده و بیشترین میزان قدرت احیا کنندگی هم متعلق به همین عصاره است. ویژگی های احیاکنندگی در ارتباط با حضور احیاکننده ها می باشد[۲٦]. همان طور که در نمودار ۵ مشاهده می شود با افزایش غلظت ترکیبات فنولی در عصاره ها قدرت احیاکنندگی افزایش می یابد، زیرا ترکیبات فنولی عصاره قادر خواهد بود با اهدای الکترون یا اتم های هیدورژن واکنش های زنجیری تشکیل رادیکال های آزاد را، شکسته و اکسایش را به تاخیر اندازد، وجود عوامل احیا کننده عامل اصلی قدرت احیا کنندگی است که فعالیت آنتی اکسیدانی را از طریق شکستن واکنش زنجیری رادیکال آزاد انجام می دهند [۲۷]. پریرا و همکاران [۲۸] با بررسی نیروی احیاکنندگی عصاره آبی شش رقم مختلف برگ گردو (لارا، پارزین، ملانایز، فرانکوت، مایته و ماربوت) گزارش کردند که قدرت احیاکنندگی عصاره ها وابسته به غلظت بوده که مطابق با نتایج این پژوهش بوده است. اولیورا وهمکاران با بررسی قدرت احیاکنندگی عصاره آبی سه واریته برگ فندق (بولوبلر ،فرتایل دی کوتارد، داویانا) گزارش کردند که با افزایش ترکیبات فنلی قدرت احیا کنندگی افزایش می یابد [٤]. مطالعه فرناندز و همکاران بر روی پوست سبز گردو نشان داد که

بیشترین قدرت احیا کنندگی آهن III متعلق به عصاره های۵۰٪ اتانول و کمترین برای عصاره آبی بوده است [۱۲]. همچنین الیورا و همکاران با مطالعه بر روی پوست سبز گردو از پنج رقم گردوی مختلف به نتیجه مشابهی دست یافتند [۹]. باریرا وهمکاران فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره گل، برگ، پوسته خارجی، پوسته داخلی ومیوه بلوط را بررسی کرده وگزارش کردند قدرت احیا کنندگی این عصاره ها با افزایش غلظت افزایش می یابد [۲۶]. همچنین تاباتا و همکاران در پژوهش بر روی برگ و ساقه سبز چای اعلام کردند، نمونه با مقدار فنول کل بالاتر قدرت احیا کنندگی بالاتری نیز داشته است [۱۰] که مطابق نتایج این پژوهش می باشد.



شکل ۵ مقایسه میزان جذب عصاره ها جهت اندازه گیری قدرت احیا کنندگی پوست سبز گردوی سه منطقه با حلال ها و زمان های مختلف استخراج

٤- نتیجه گیری

پوست سبز گردو بعنوان منبعی برای استخراج ترکیبات فنلی با خواص آنتی اکسیدانی طبیعی می تواند استفاده شود. در استخراج ترکیبات فنلی، با افزایش زمان استخراج، فرصت بیشتری برای خروج این ترکیبات وجود داشته و مقدار استخراج فنل کل در عصاره افزایش می یابد. مخلوط حلال قطبی وغیر قطبی تاثیر بهتری در استخراج ترکیبات فنلی نسبت به هر یک از حلال ها به تنهایی داشته است. با افزایش میزان ترکیبات فنلی خواص آنتی اکسیدانی افزایش می یابد. بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق پوست سبز گردوهای مناطق مرتفع و کوهستانی (هزار جریب) دارای مقدار فنل و هم چنین خواص آنتی اکسیدانی بیشتری نسبت به منطقه معتدل (بندرگز) و منطقه نیمه خشک (شاهرود) داشت که می بایست اثر آب و هوا به عنوان فاکتور تاثیر گذار مورد تحقیق آتی قرار گیرد.

۵- منابع

[1] Lachman, J., Orsk, M., Hejtmnkov, A., Kovrov, E. 2010. Evaluation of antioxidant activity and total phenolics of selected Czech honeys. LWT- Food Science and Technology, 43(1), 52-58.

[2] Stampar, F., Solar, A., Hudina, M.,Veberic, R., Colaric, M. 2006. Traditinal walnut ligueur-cocktail of phenolics. Food chemistry, 95(4), 627-631.

[3] Contini, M., Baccelloni, S., Massantini, R., Anelli, G. 2008. Extraction of natural antioxidants from hazelnut (*Corylus avellana L.*) shell and skin wastes by lon maceration at room temperature. Food Chemistry, 110, 659–669.

[4] Olivera, I., Souse, A.,Valentao, P., Andrade, P., Ferreira, F., Bento, A., Seabra, R., Estevinho, I., Pereira , J. A. 2007. Hazel (corylus avellana) leaves as source of antimicrobial and antioxidant campounds. Food Chemistry , 105, 1018-1025.

[5] Rauha, J. P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kahkonen. M., Kujala, T., Pihlaja,

K., Vuorela, H., Vuorela, P. 2000. Antimicrobial effects of finnish plant extacts containing flavonoids and other phenolic compounds. Int. J. Food Microbial, 56, 3-12.

[6] Zhang, Z, Liao, L., Moore, J., Wu, T., Wang, Z. 2009.Antioxidant phenolic compound from walnut kernels (juglant L.). Food Chemistry, 113(1),160-165.

[7] Li, B. B., Smith, B., Hossain, M. M. 2006. Extraction of phenolic from citrus peels: I. Solvent extraction method. Separation and Purification Technology, 48(2), 182-18.

[8] Labuckas, D. O., Maestri, D. M., Perell, M., Martnez, M. L., Lamarque, A. L. 2008. Phenolics from walnut (Juglans regia L.) kernels: Antioxidant activity and interactions with proteins. Food Chemistry, 107(2), 607-612.

[9] Olivera, I., Souse, A.,Valentao, P., Andrade, P., Ferreira, F., Bento, A., Seabra, R., Estevinho, I., Pereira, J.A. 2008. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activities of three hazelnut (corylus avellana l.)cultivars. Food and chemical toxicology, 46(5), 1801-1807.

[10] Tabata, H., Katsybe, T., Tsuma,T., Ohte, Y., Imawaka, N., Utsumi, T. 2008. Isolation and evaluation of the radical –scavenging activity of the antioxidants in the leaves of an edible plant, mallotux japonicas. Food Chemistry, 109, 64-71.

[11] Casazza, A.A., Aliakbarian, B., Mantegna, S., Cravotto, G., Perego, P., 2010, Extraction of phenolics from Vitis vinifera wastes using non-conventional techniques, Journal of Food Engineering, 100(1), 50-55.

[12] Fernandez- Agullo, A., Pereira, E., Freirea, M. S., Valentao, Andrade, P. B., Gonzalez-Alvareza, 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 (2013), 126- 132.

[13] Siddhuraju, P., Mohan, P. S., Becker, K. 2002. Studies in the antioxidant activity of Indian laburnum. (Cassia fistula L.): A preliminary assessment of crude extracts from stem bark, leaves, flowers and fruit pulp. Food Chemistry, 79(2002), 61–67.

[14] Li, J.W., Ding, S.D., Ding, X.L. 2005. Comparison of antioxidant capacities of extracts from five cultivars of Chinese jujube. Process Biochemistry, 40(11), 3607-3613.

[15] Arabshahi-Delouee, S., Urooj, A. 2007. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (Morus indica L.) leaves. Food Chemistry, 102(4), 1233-1240.

[16] Chirinos, R., Rogez, H., Campos, D., Pedreschi, R., Larondelle, Y. 2007. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (Tropaeolum tuberosum Ruiz and Pavon) tubers. Separation and Purification Technology, 55, 217-225.

[17] Li, J., Zu, Y.G., Fu, Y.J., Yang, Y.C., Li, S.M., Li, Z.N., Wink, M. 2010. Optimization of microwaveassisted extraction of triterpene saponins from defatted residue of yellow horn (Xanthoceras sorbifolia Bunge.) kernel and evaluation of its antioxidant activity. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 11(4), 637-643.

[18] Rumbaoa, R.G.O., Cornago, D.F., Geronimo, I.M. 2009. Phenolic content and antioxidant capacity of Philippine potato (Solanum tuberosum) tubers. Journal of Food Composition and Analysis, 22(6), 546-550.

[19] Suzuki, M., Watanabe, T., Miura, A., Harashima, E., Nakagawa, Y., Tsuji, K. 2002. An extraction solvent optimum for analyzing polyphenol contents by Folin-Denis assay. Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi, 49, 507-511.

[20] Spigno, G., Tramelli, L., De Faveri, D.M. 2007. Effects of extraction time, temperature and solvent onconcentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. Journal of Food Engineering, 81(1), 200-208.

[21] Rezai Erami, S., Jafari, S.M., Khomeiri, M., Bayat, H. 2014. Extraction of walnut leaves extracts with microwave assisted extraction and evaluation of antioxidant properties of phenolic compounds. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 29(4), 879-898.

[22] Chun, S.S.,Vattem, D.A., Lin,Y.T., Shetty, K. 2005. Phenolic antioxidants from clonal oregano (Origanumvulgare)With antimicrobial activity against *Helicobactor Pylori* Process Biochemistry, 40,809-816.

[23] Sun ,T., Powers , J. R., Tang , J. 2007. Evaluation of the antioxidant activity of asparagus, broccoli and their juices, Food Chemistry, 105(1), 101-106.

[24] Yang, J.H., Lin, H.C., Mau, J.L. 2002. Antioxidant properties of several commercial

mushrooms. Food Chemistry, 77(2), 229-235.

[25] Zhang, H., Jiang, L., Ye, S., Ye, Y., Ren, F. 2010. Systematic evaluation of antioxidant capacities of the ethanolic extract of different tissues of jujube (*Ziziphus jujuba Mill*.) from China. Food and chemical toxicology, 48(6), 1461-1465.

[26] Barreira, J.C.M., Ferreira, I.C.F.R., Olivira, M.B.P.P., Pereira, J. A. 2008. Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf,skins.and fruit. Food chemistry, 107(3), 1106-1113.

[27] Kumaran, A., Karunakaran, R. J. 2007. In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five
Phyllanthus species from India. LWT- Food Science and Technology, 40, 344-352.

[28] Pereira, J. A., Oliveira, I., Sousa, A., Valento, P., Andrade, P. B., Ferreira, I.C.F.R., Ferreres, F., Bento, A., Seabra, R., Estevinho, L. 2007. Walnut (Juglans regia L.) leaves: Phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. Food and Chemical Toxicology, 45(11), 2287-2295.

Comparison of total phenols and antioxidant properties of walnut (*Juglans regia* L.) green husk of three regions of northern Iran (Shahrood, Bandar Gaz and Hzargarib)

Dolatabadi, M. [1], Raftani Amiri, Z. [2*], Esmaeilzade Kenari, R. [3]

1. M Sc. Student, Food Science and Technology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari
2. Assistant Professor, Deptt of Food Science and Technology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari
3. Assistant Professor, Deptt of Food Science and Technology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari

(Received: 93/2/23 Accepted: 93/7/8)

Walnut green husk is waste of walnut that can be valuable source of natural compounds with antioxidant properties. In this study, the effect of regions (Shahrood, Bandar Gaz and Hzargarib), solvent (ethanol 96%, Water and ethanol - water (1:1 v/v)) and extraction time (6 to 24 hours) on the yield of extracted phenolic compounds from walnut green husk has been analyzed. Immersion method at room temperature in a factorial experiment with three replications in a completely randomized design has been used. Then, bioactive properties of walnut green husk extract in a completely randomized design have been compared. The total phenol content of the extract was determined by the method of Folin- ciocalteau. Antioxidant activity of the extract by the reducing power of Iron III and DPPH free radical scavenging ability was evaluated. The results of this study showed that, the solvent polarity, time extraction and plant habitat are effective on amount of extracted phenolic compounds; and also antioxidant activity of the extract depends on the concentration of phenolic compounds. The highest phenolic compounds with 49.66 mg/g (based on Galic acid) were achieved from Hezar jerib walnut green husks with water - ethanol solvent (1:1 v/v) for 24 hours. Also, the most antioxidant properties of the extracts were shown in this extract.

Key words: Antioxidant properties, Phenolic compounds, Solvent, Walnut green husks

* Corresponding Author E-Mail Address: zramiri@gmail.com