

تعیین بهترین دما، زمان و غلظت حلال در استخراج عصاره ضداکسایشی چوب بینابینی میوه گردو طی فرایند فراصوت

علی گوهری^۱، وحید حکیم زاده^{۲*}، ابراهیم گل‌مکانی^۳

۱- دانشجوی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان، ایران.

۲- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان، ایران.

۳- استادیار دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.

(تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۵/۰۲)

چکیده

تا کنون بررسی‌های انجام شده بر روی قسمت‌های مختلف میوه گردو بیانگر وجود خاصیت ضداکسایشی، ضد میکروبی و ضدسرطانی بوده است. در این تحقیق خصوصیت ضداکسایشی عصاره حاصل از چوب بینابینی میوه گردو با غلظت‌های مختلفی از حلال متانول طی زمان‌ها و دماهای مختلف و تحت فرایند فراصوت با طرح آماری سطح پاسخ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که اگرچه افزایش دما و زمان منجر به افزایش خاصیت ضداکسایشی گردید اما در سطوح بالای دما، زمان و حلال به دلیل اکسیداسیون ترکیبات فنولیک و رقیق شدن عصاره‌ها کمی از قدرت ضداکسایشی عصاره‌ها کاسته شد. بهترین شرایط برای استخراج عصاره بر اساس بازدهی و قدرت ضداکسایشی به سه روش فنل کل، DPPH و FRAP در زمان ۲۸/۷۱ دقیقه، دمای ۳۹/۲۲ درجه سانتی‌گراد و غلظت حلال ۴۱۶/۵۷ میلی‌لیتر به ازای ۲۵ گرم پودر چوب بینابینی میوه گردو تعیین گردید. طی این شرایط بازده استخراج به ۳/۷۰۶ درصد، میزان ترکیبات فنولیک به حدود ۲۲/۶۷ میلی‌گرم گالیک اسید، قدرت آنتی‌اکسیدان به روش DPPH به مقدار ۰/۰۱۰۸ بر حسب IC₅₀ و در روش FRAP به میزان ۱۲۷۰/۰۵ بر حسب میلی‌مول آهن دوظرفیتی رسید.

کلیدواژه‌گان: آنتی‌اکسیدان، چوب بینابینی، فنولیک، گردو، متانول.

* مسئول مکاتبات: v.hakimzadeh@yahoo.com

۱- مقدمه

قرنهاست که عصاره گیاهان با خصوصیات ضدکاسایشی، ضدمیکروبی و سلامتی بخش در زمینه پزشکی برای مقابله با بیماری های مختلف نظیر التهابات، سرطان، پیری و نقص ایمنی کاربرد دارند [۱]. تعداد زیادی از ترکیبات ضدکاسایش طبیعی یا سنتزی در درمان یا پیشگیری از بیماری های مرتبط با رادیکال های آزاد معرفی شده اند. از طرفی با توجه به اثرات نامطلوب ضدکاسایش های سنتزی بر بدن، امروزه تلاش وسیعی در جهت جایگزین نمودن آنها با انواع طبیعی خصوصاً انواع گیاهی صورت می گیرد [۲]. رایج ترین ضدکاسایش های طبیعی شامل فلاونوئیدها، مشتقات اسیدسینامیک، توکوفرول ها، اسیدهای آمینه، پتیدها و اسیدهای آلی چندعاملی می باشند [۳].

گردو با نام علمی *Juglans regia* L. گیاهی از خانواده Juglandaceae است. از بین خواص بیشمار این میوه می توان به ویژگی ضد کرم، ضد انگل و ضدکاسایشی آن اشاره کرد [۴]. همچنین برگ های آن در طب سنتی، برای درمان دردهای روماتیسمی، تب، دیابت، بیماری های پوستی و از ریشه آن برای درمان دیابت و از گل های آن برای درمان مالاریا و دردهای روماتیسمی استفاده می شود [۵]. در مطالعه ای نشان داده شده است که عصاره پوست سبز میوه گردو توانایی کشتن سلولهای کارسینومای پروستات را دارا هستند [۶]. ترکیبات فرار و فنل های پوست سبز گردو، دارای خاصیت ضد التهابی و آنتی بیوتیکی هستند. از طرف دیگر، نشان داده شده است که تانن موجود در پوست سبز گردو دارای خواص ضدکاسایش و ضدمیکروبی است [۷، ۹، ۸]. پژوهش های انجام شده بر روی برگ گردو خاصیت آنتی باکتریال آن را نیز اثبات نموده است به عنوان مثال در مطالعه ای اثر ضدباکتریایی گردو بر روی استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس اثرزینوزا، باسیلوس سرئوس مورد بررسی قرار گرفت [۱۰]. ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها دو گروه عمده ترکیب های فنلی موجود در برگ گردو هستند. مهمترین فلاونوئیدهای گردو ژوگلون، کوئرستین گالاتوزید، مشتق های کوئرستین پنتوزید، آرابینوزید، رامنوزید و مشتق های کامپفرول پنتوزید و مهمترین ترکیب فنلی آن کافئوئیل کوینیک اسید است. مهمترین ترکیب شیمیایی گردو ژوگلون است که از لحاظ ساختمانی ۵- هیدروکسی ۱ و ۴- نفتوکینون می باشد که تنها در بخش های سبز و تازه گردو یافت شده و در برگ های خشک اثر آن از بین می رود [۱۱]. بخش های مختلف گردو از

جمله مغز میوه آن، پوست میوه و چوب خشک شده وسط مغز میوه دارای خواص متعددی در علوم دارویی و خصوصیات آنتی باکتریال و ضدکاسایشی می باشند [۱۲ و ۱۳]. پوست سخت و تیره داخلی گردو که مغز آن را به چهار قسمت تقسیم می کند نیز در طب سنتی ایران برای درمان افزایش تری گلیسرید خون استفاده می شده است [۱۴].

امواج فراصوت، امواج صوتی هستند که فرکانس بیش تر از ۲۰ کیلوهرتز دارند. امواج صوتی در طول حرکتشان در محیط آبی سیکل های انبساطی و انقباضی را به وجود می آورند. طی انبساط حباب هایی در مایع ایجاد می شود که پس از درشت شدن متلاشی می شوند و جت های مایع (جریان های سریع) با سرعت بالا تولید می کنند و سبب ایجاد ضربه شدیدی به سطح جامد می شود که به پدیده کاویتاسیون معروف است. همچنین هنگام متلاشی شدن حباب، در مرکز آن گردیدان دمایی ایجاد می شود و باعث بالا رفتن دما و در نتیجه افزایش ضریب نفوذ شده و در نهایت باعث افزایش انتقال جرم می شود. بدین ترتیب فراصوت سبب نفوذ بیش تر حلال داخل بافت ماده می شود. امواج صوتی طی استخراج می تواند دیواره های سلولی بیولوژیکی را تخریب کند و آزاد شدن محتویات درونی آن ها را آسان کند، بنابراین تخریب کارآمد سلولی و انتقال جرم مفید در دماهای کمتر به عنوان دو فاکتور اصلی در استخراج با امواج صوتی هستند. مشخصات گیاه مثل مقدار رطوبت، اندازه ذره و حلال استفاده شده نیز به منظور به دست آوردن استخراج کارآمد و موثر، مهم هستند. از فاکتورهای دیگر که در اثربخشی استخراج با امواج صوتی نقش دارند می توان فرکانس، فشار، دما و زمان امواج صوتی را نام برد [۱۵ و ۱۶].

امروزه به دلیل اهمیت در مدیریت ضایعات، توجه به ضایعات صنایع مختلف مانند صنایع خوراکی به منظور افزایش ارزش افزوده آنها رو به گسترش است. به طوری که استحصال ترکیبات مهم و فراسودمند از این مواد در ظاهر بدون مصرف، همچون ضدکاسایش ها، آنزیم ها، ترکیبات ضدمیکروبی و غیره برای استفاده در سایر بخشهای صنایع غذایی یکی از زمینه های گسترده تحقیقاتی است [۱۷]. از این رو در این تحقیق به بهینه یابی استخراج ترکیبات ضدکاسایشی چوب بینایی میوه گردو که مقادیر زیادی از آن طی مصرف تازه خوری یا فرآوری از بین می رود تحت شرایط مختلف همچون غلظت حلال، دما و زمان به کمک فرآیند فراصوت پرداخته می شود.

۲- مواد و روش ها

پس از رسم منحنی کالیبراسیون مطابق روش فوق، جذب عصاره ها نیز در طول موج ۵۹۳ نانومتر نسبت به شاهد (شامل ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر همراه با ۳ میلی لیتر معرف FRAP)، اندازه-گیری گردید و با قراردادن مقدار جذب نمونه‌ها در معادله مربوط به منحنی استاندارد توانایی احیاکنندگی عصاره‌ها محاسبه شد. داده‌ها بر اساس معادل میلی‌مول یون فروس ایجاد شده بر گرم وزن عصاره بیان گردید.

۲-۲-۲- روش DPPH

در این روش شدت جذب رنگ زرد حاصل از مخلوط نمونه‌ها با محلول متانولی DPPH اندازه‌گیری شد. ابتدا ۰/۱ ml از محلول متانولی نمونه مورد نظر (در غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲ و ۶۴ mg/ml) در یک لوله آزمایش ریخته شد. سپس به آن ۰/۱ ml محلول متانولی DPPH اضافه گردید. محتویات هر لوله توسط ورتکس کاملاً مخلوط و پس از گذشت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و محیط تاریک، جذب آنها در طول موج ۵۱۷ nm با استفاده از اسپکتروفتومتر UV/Vis (مدل آلیجنت، آمریکا) در برابر بلانک حاوی متانول خوانده شد. در این روش از BHT به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. هر چه قدرت آنتی اکسیدان نمونه بیشتر باشد رنگ محلول حاصل زردتر است. در نهایت درصد مهار اکسیداسیون هر نمونه به وسیله معادله زیر محاسبه شد [۱۹].

$$\%AI = (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}} \times 100$$

A_{control} : جذب محلول کنترل در ۵۱۷ نانومتر
 A_{sample} : جذب نمونه در ۵۱۷ نانومتر

برای محاسبه IC_{50} یا همان غلظتی از سوبسترا برحسب میلی-گرم بر میلی‌لیتر که برای کاهش DPPH به میزان ۵۰٪ مقدار اولیه نیاز است عصاره‌های مورد نظر از برنامه نرم افزاری graphpad prism, version 5 استفاده شد.

۲-۲-۳- اندازه‌گیری فنل کل

اندازه‌گیری محتوای فنل کل عصاره‌ها با استفاده از معرف فولین سیو- کالجو انجام گرفت. در این سنجش، از گالیک‌اسید به عنوان استاندارد استفاده گردید و منحنی استاندارد آن رسم شد. سپس با استفاده از معادله خط حاصل، محتوای فنل کل عصاره‌ها تعیین گردید. برای رسم منحنی استاندارد گالیک‌اسید، به تعداد محلولهای گالیک‌اسید که شامل غلظتهای متفاوت از ۰/۰۳ تا ۰/۲۲ میلی گرم بر میلی لیتر می باشند ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و به هریک از لوله‌ها ۱/۵ میلی لیتر کربنات سدیم ۲۰ درصد و ۵۰۰

ابتدا چوب بینابینی گردوی تازه از مغز آن جدا شد و در هوای آزاد و سایه خشک گردید. سپس جهت استخراج عصاره، ابتدا چوب بینابینی با آسیاب خرد گردید و سپس از مش ۲۰ عبور داده شد. سپس به ترتیب در سه غلظت ۲۵۰، ۵۰۰ و ۷۵۰ میلی لیتر متانول به ازای ۲۵ گرم پودر مخلوط شد و در سه سطح دمایی ۲۵، ۳۵ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد و زمان‌های ۱۵، ۲۵ و ۳۵ دقیقه تحت امواج اولتراسونیک قرار گرفت. مخلوط حلال و پودر چوب بینابینی گردو تحت شدت ۴۰ کیلوهرتز با دستگاه اولتراسونیک (مدل باندلین سونورکس آلمان سری دی تی ۵۱۰ اچ) قرار گرفتند و سپس با کاغذ صافی صاف شدند [۱۶]. محلول صاف شده به منظور حذف حلال اضافی درون تبخیرکننده چرخشی مدل لایبورتا مدل ۴۰۰۳/۴۰۰۲ ساخت کشور آلمان قرار گرفت و در نهایت عصاره‌ها به پلیت منتقل و در زیر هود خشک شدند.

۲-۱- محاسبه بازده استخراج

با محاسبه وزن اولیه پلیت و وزن نهایی آن که حاوی ماده خشک بر جای مانده است، مقدار کل ماده خشک استخراج شده محاسبه شد و به صورت درصد (میلی گرم بر گرم نمونه خشک) بیان گردید.

۲-۲- ارزیابی فعالیت ضداکسایشی

توان ضداکسایشی عصاره‌های بدست آمده به سه روش مورد بررسی قرار گرفت

۲-۲-۱- روش FRAP

اساس اندازه‌گیری فعالیت ضداکسایشی عصاره‌ها به روش FRAP بر اساس توانایی آن‌ها در احیاکنندگی آهن می باشد که با تغییر رنگ محلول همراه است [۱۸]. برای این منظور ابتدا منحنی استاندارد رسم گردید. به این صورت که مقادیر ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول آمونیوم فروس سولفات ۱ میلی مولار در لوله‌های آزمایش ریخته شد و حجم هریک از آن‌ها با آب مقطر به ۱۰۰ میکرولیتر رسانده شد. سپس به هریک از لوله‌ها مقدار ۳ میلی‌لیتر معرف FRAP اضافه شد. مخلوط حاصل به خوبی ورتکس گردید و به مدت ۴ دقیقه در دمای ۳۰°C انکوبه شد. پس از طی این مدت، جذب محلول‌ها در طول موج ۵۹۳ نانومتر نسبت به شاهد قرائت گردید. از لوله آزمایش فاقد آمونیوم فروس سولفات به عنوان شاهد استفاده شد.

استاندارد، مقدار فنل کل موجود در عصاره‌ها محاسبه شد. در نهایت، داده‌ها بر اساس معادل میلی‌گرم گالیک‌اسید بر گرم وزن خشک عصاره بیان گردید [۲۰].

۲-۲-۴- تجزیه و تحلیل آماری

برای بررسی تاثیر پارامترهای دما، زمان و درصد حلال بر میزان استخراج و قدرت ضداکسایشی و همچنین تعیین شرایط بهینه استخراج از طرح آماری سطح پاسخ با نرم افزار دیزاین اکسپرت استفاده شد. در جدول ۱ می‌توان آزمایشات طراحی شده به روش سطح پاسخ را همراه با سطوح پارامترهای مختلف مشاهده کرد.

میکرولیتر معرف فولین سیو - کالچو اضافه گردید. مخلوط حاصل ورتکس و به مدت ۲ ساعت در دمای محیط نگهداری شد و جذب محلول‌ها در طول موج ۷۶۰ نانومتر نسبت به شاهد اندازه‌گیری شد. از لوله آزمایش فاقد گالیک‌اسید به عنوان شاهد استفاده شد. بدین ترتیب منحنی استاندارد بر اساس مقادیر مختلف گالیک‌اسید و مقادیر جذب به دست آمده رسم گردید. سپس برای اندازه‌گیری مقدار فنل کل عصاره‌ها مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره‌های رقیق شده با متانول در لوله‌های آزمایش ریخته شد. پس از انجام مراحل مختلف مطابق روش ذکر شده در بالا، مقدار جذب نمونه‌ها نسبت به شاهد در ۷۶۰ نانومتر خوانده شد. با قرار دادن مقدار جذب نمونه‌ها در معادله مربوط به منحنی

Table 1 Experimental runs based on Temperature, Time and Solvent concentration in RSM design statistical

Run	Temperature (°C)	Time (min)	Solvent volume (ml)
1	45	25	250
2	35	35	250
3	35	25	500
4	35	35	750
5	45	25	750
6	35	15	250
7	25	35	500
8	45	35	500
9	45	15	500
10	25	25	250
11	35	25	500
12	25	25	750
13	25	15	500
14	35	25	500
15	35	15	750

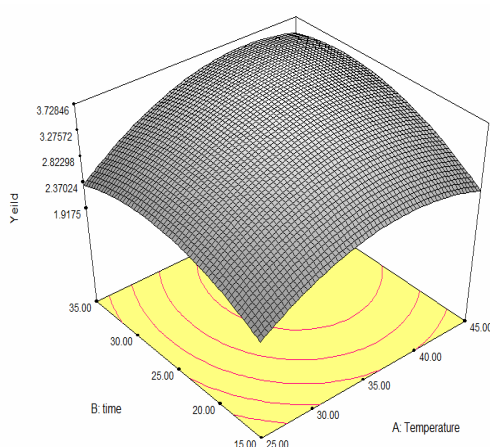


Fig 1 effect of Temperature and Time on extraction yield

۳- نتایج و بحث

۳-۱- اثر دما، زمان و غلظت حلال بر بازده

استخراج

نتایج بدست آمده مطابق شکل ۱ نشان داد که استخراج عصاره از چوب بینابینی گردو با افزایش زمان و دما روند صعودی دارد. افزایش راندمان با افزایش دما احتمالاً به دلیل بهبود انتقال جرم در نتیجه افزایش حلالیت است.

آنتوسیانین رابطه خطی وجود دارد و با افزایش زمان و افزایش دما مقدار آنتوسیانین افزایش پیدا می کند [۲۱]. همچنین طبق شکل ۲ نتایج حاکی از آن بود که غلظت های مختلف حلال در سطوح مختلف دما و زمان طی عصاره گیری با فراصوت تفاوت معنی داری در بازدهی استخراج نداشته است.

به علاوه افزایش دمای استخراج می تواند سبب شتاب دهی نفوذ حلال و تقویت استخراج ناخالصی ها و مواد زاید گردد. فان و همکاران در سال (۲۰۰۷)، طی استخراج آنتوسیانین سیب زمینی شیرین ارغوانی بیان کردند که بین زمان و دمای استخراج با مقدار

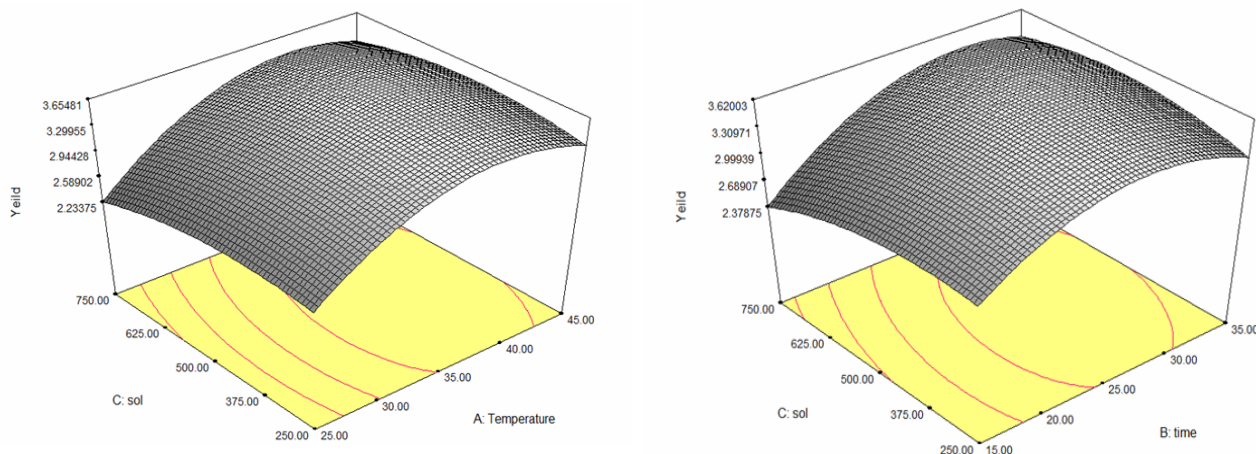


Fig 2 Effect of different solvent concentration on extraction yield

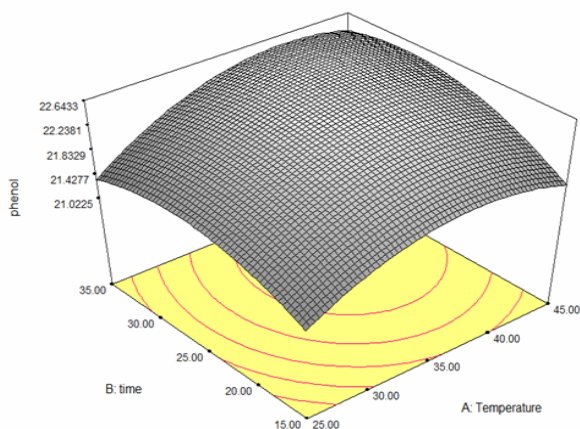


Fig 3 Effect of temperature and time on extraction of phenolic component

از طرفی با افزایش غلظت حلال کمی از میزان استخراج ترکیبات فنولیک کاسته شد که می تواند به دلیل رقیق شدن عصاره باشد (شکل ۴).

۲-۳- اثر دما، زمان و غلظت حلال بر میزان ترکیبات فنولیک

همانطور که در شکل ۳ دیده می شود افزایش دما و زمان به دلیل افزایش ضریب نفوذ حلال و افزایش زمان انتقال جرم میزان استخراج ترکیبات فنولیک را بهبود داد. در دماهای بالا و زمان های طولانی، کاهش مشاهده شده در میزان استخراج ترکیبات فنولیک نیز احتمالاً به دلیل واکنش های اکسیداسیون ترکیبات فنولیک بود. محققانی مانند ییلماز (۲۰۰۴) و مانسی (۲۰۰۹) طی بررسی استخراج ترکیبات فنولیک بیان داشتند که در دماهای بالا، کاهش میزان استخراج ترکیبات فنولیک به دلیل واکنشهای پلی مریزاسیون ترکیبات فنولیک با خودشان بوده است [۲۲ و ۲۳].

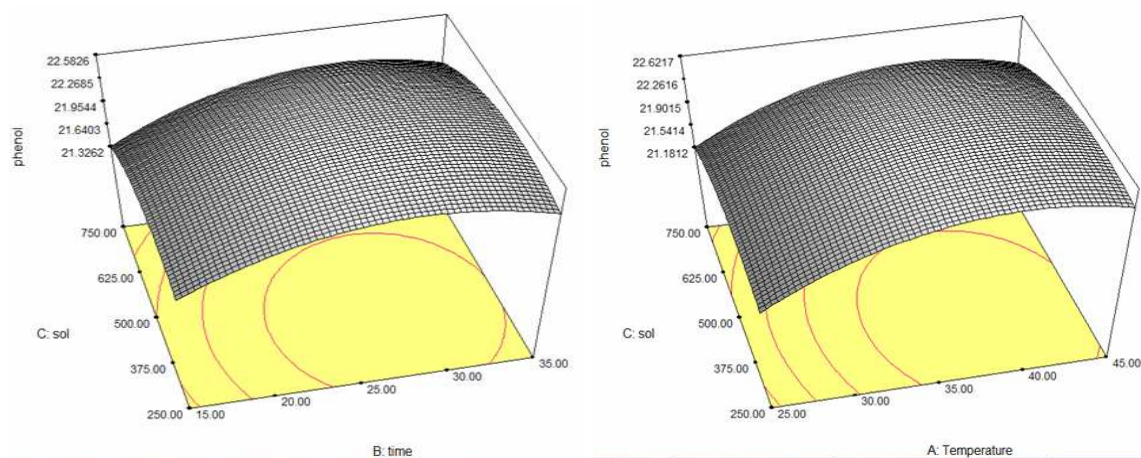


Fig 4 Effect of different solvent concentration on phenolic components

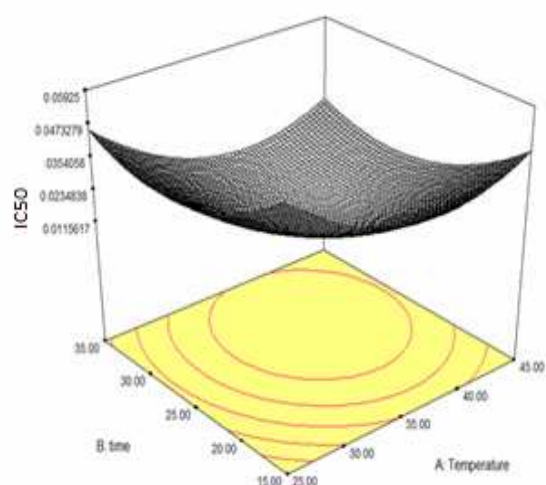


Fig 5 Effect of Temperature and Time on DPPH radical inhibitory power of extracts

۳-۳- اثر دما، زمان و غلظت حلال بر قدرت

کاهندگی آهن به روش FRAP

نتایج بدست آمده نشان داد که با افزایش زمان و دمای استخراج میزان قدرت کاهندگی آهن عصاره ها افزایش یافت. اما در بیشترین مقدار دما و زمان به دلیل واکنش های اکسیداسیون ترکیبات فنولیک میزان قدرت کاهندگی آهن کاهش پیدا کرد (شکل ۷).

اما با افزایش نسبت حلال، به دلیل رقیق شدن عصاره، فعالیت ضداکسایشی کاهش یافت (شکل ۸).

۳-۳- اثر دما، زمان و غلظت حلال بر قدرت

مهار رادیکال آزاد DPPH

نتایج نشان داد که در زمان های کمتر و با افزایش دما، عصاره بدست آمده دارای شاخص IC_{50} کمتر و در نتیجه فعالیت ضداکسایشی بیشتری بود. اما در زمان های طولانی به دلیل اکسیداسیون ترکیبات حساس فنولیک و همچنین به علت افزایش استخراج ناخالصی ها طی فراصوت شاخص IC_{50} افزایش و در نتیجه فعالیت ضداکسایشی کمتر گردید (شکل ۵).

کیشک و همکاران (۲۰۱۰) بیان کردند قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH در زنجبیل تا زمان ۳۰ دقیقه زیاد شد و بعد آن ثابت ماند. همچنین قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH زنجبیل از دمای ۲۰ الی ۵۴ درجه زیاد شد و بعد آن بدلیل تجزیه شدن ترکیبات ضداکسایشی کاهش پیدا کرد [۲۴].

با افزایش دما در غلظت های پایین حلال، IC_{50} کاهش یافت (قدرت ضداکسایشی زیاد شد) ولی در غلظت های بالای حلال مقادیر IC_{50} افزایش داشت (قدرت ضداکسایشی کم شد). این امر را می توان به رقیق شدن عصاره در مقادیر بالای حلال و کاهش غلظت ترکیبات ضداکسایشی نسبت داد (شکل ۶).

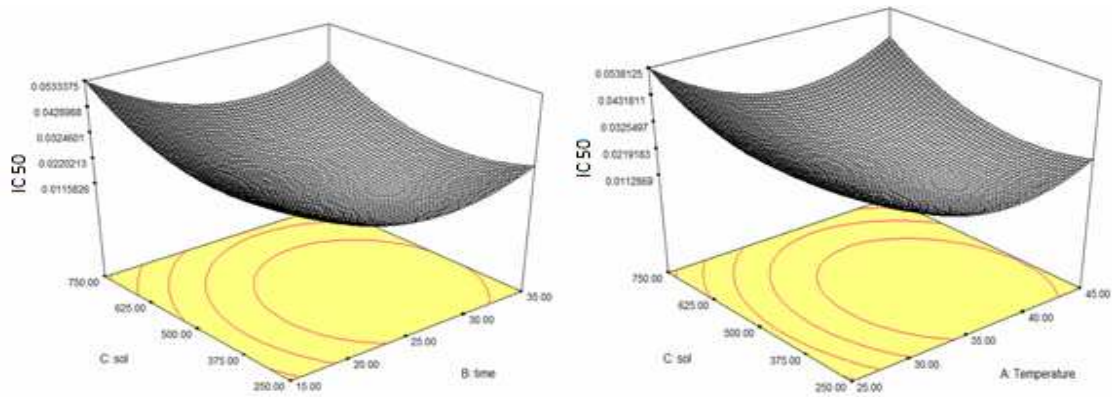


Fig 6 Effect of different solvent concentration on DPPH radical inhibitory power of extracts

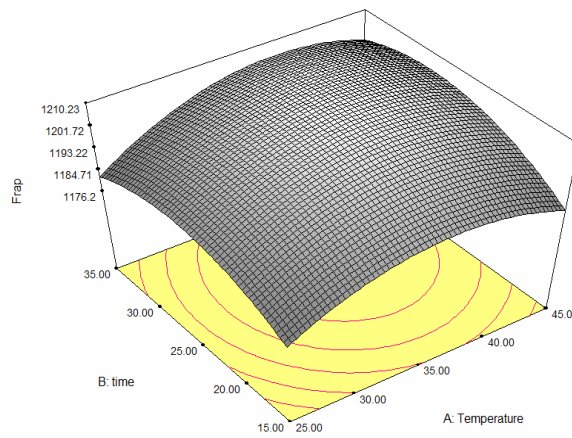


Fig 7 Effect of Temperature and Time on Ferric reduction capacity

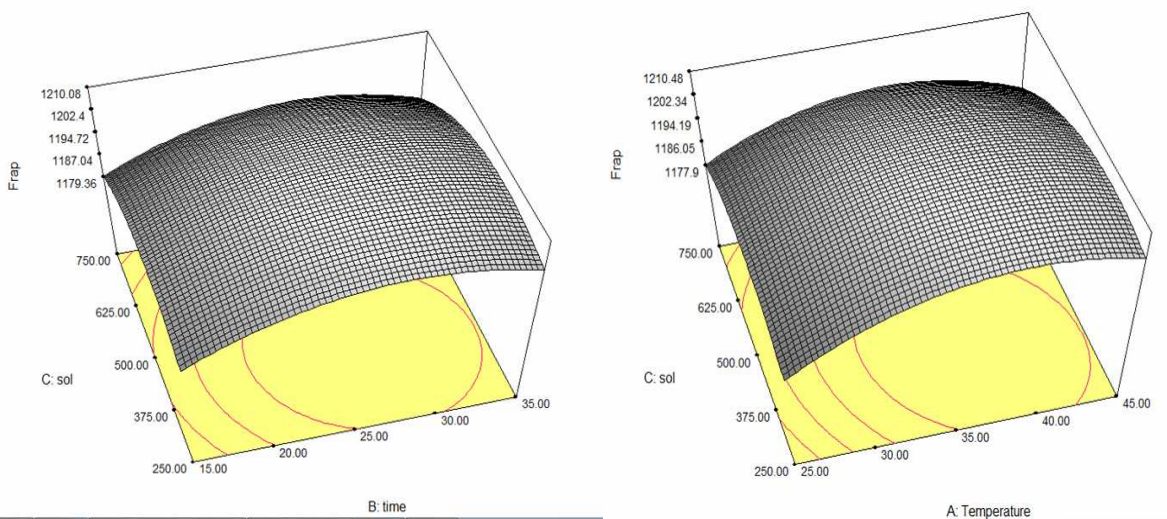


Fig 8 Effect of different solvent concentration on Ferric reduction capacity

۴- نتیجه گیری

نتایج کلی این بررسی را می توان در موارد زیر به طور خلاصه بررسی کرد

- به طور کلی افزایش دما و زمان منجر به بهبود قدرت ضداکسایشی شد اما در سطوح بالای دما و زمان به دلیل اکسیداسیون و پلیمریزاسیون ترکیبات، کمی از قدرت ضداکسایشی عصاره ها کاسته شد.

- غلظت های بالای حلال نیز به دلیل رقیق کردن عصاره و کاهش غلظت ترکیبات فنولیک در حجم سبب کاهش قدرت ضداکسایشی شد.

- شرایط بهینه در استخراج عصاره چوب بینابینی میوه گردو از نظر بازده استخراج و قدرت ضداکسایشی در زمان ۲۸/۷۱ دقیقه، دما ۳۹/۲۲ درجه سانتی گراد و غلظت حلال ۴۱۶/۵۷ بدست آمد.

تحت این شرایط میزان بازده استخراج ۳/۷۰۶، میزان ترکیبات فنولیک ۲۲/۶۷ میلی گرم اسید گالیک، قدرت آنتی اکسیدان به روش DPPH ۰/۱۰۸ بر حسب IC50 و به روش FRAP ۱۲۷۰/۰۵ میلی مول آهن دوظرفیتی بدست آمد.

۵- منابع

- [1] Bahmanabadi, J. 2010. Optimization of Barbary extraction by Ultrasound process using RSM. MSc. Thesis on Food Science and Technology Faculty, Islamic Azad University, Quchan Branch, Iran.
- [2] Zolfaghari, B. Yekdaneh, A. 2010. Recent advances in plant extraction techniques. Journal of Herbal Drugs, No 1: 51-55.
- [3] Karami, Z. Mirzaei, H. Emamjome, Z. Khomeiri, M. Sadeghi Mahoonak, A. 2010. Comparison and study of phenolic compounds extraction methods by ultrasonic methods and solvent-back system from licorice root. The first transnational conference on optimizing the production, distribution and consumption chain in the food industry. Gorgan.
- [4] Jalali, M. Abedi, D. Ghasemi dehkordi, N. Chaharmahali, A. 2004. Antimicrobial Effects of Hydroalcoholic Extract of Some Medicinal Plants against *Listeria Monocytogenes*. J Shahrekord Univ Med Sci. 2006; 8 (3) :25-33.
- [5] Khosroshahi, S. 2005. Guide to the use of medicinal herbs. Sokhan Gostar publishing house, 275p, Mashhad.
- [6] Jalilvand, M.R. Vakili, S.A. Aminimoghadam, N. Nematollahi, A. Kamal, H. Soudmand, M. 2010. Applied Approach in the Research of Natural Products and Medicinal Plants (Extraction, Separation, Phytochemical Tests and Biological Measures). Andishe Mandegar Publishing House. Qom.
- [7] Zieveie, F. 2010. Antifungal effect of some herbal essential oils on *Aspergillus flavus* mushroom. Islamic Azad University Damghan Branch.
- [8] Fatemi, H. 2002. Food chemistry. 4th edition. 480 p.
- [9] Firoozi, R. Shekar Foroosh, S. Malekzadeh, M. 2011. Effect of essential oils of oregano and nutmeg on growth and survival of *Staphylococcus aureus* in barbecued chicken. JFST No. 32(2), Vol. 8.
- [10] Kamkar A, Shariatifar N, Jamshidi A, Jebelli Javan A, Sadeghi T, Zeigham Monfared M. 2012. In vitro Evaluation of Antioxidant Activity of Iranian *Mentha longifolia* Essential Oil and Extracts. JMP. 1 (41) :185-194.
- [11] Poorfarzad, A. Habibi Najafi, M. Hadad Khodaparast, M.H. 2011. Correlation between the properties of fructan extracted from the gland of its series using ultrasound. The 21st Iranian Food Science and Technology Congress. Shiraz, Iran.
- [12] Basiri, SH. Shahidi, F. Kadkhodae, R. Farhosh, R. 2011. An investigation on the effect of ultrasound waves and pretreatment methods on the extraction of oil from pomegranate seeds. JFST Vol. 8, No. 1.
- [13] Gharekhani, M. Ghorbani, M. Rasoulnejad, N. Jebraeli, Sh. 2012. New methods of extraction of effective compounds from medicinal plants: extraction by ultrasonication and microwave extraction and solvent extraction. Iranian Chemical Engineering Journal ñ Vol. 10 - No. 59.
- [14] Salarbashi, D. 2007. Evaluation of antioxidant properties of Yarrow's plant. M.Sc. thesis on Food Science and Technology, Islamic Azad University, Sabzevar Branch, Iran.

- [20] Hayouni, E. A., Abedrabba, M., Bouix, M., Hamdi, M, 2007 , The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chemistry*, 105: 1126-1134.
- [21] Fan, G, et al., 2008, Optimizing conditions for anthocyanins extraction from purple sweet potato using response surface methodology (RSM). *LWT*. 41,155 –160.
- [22] Yilmaz, Y., & Toledo, R. T, 2004, Major flavonoids in grape seeds and skins: Antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 255–260.
- [23] Irshid F, Mansi K, 2009, Effects of leaf extract of *Artica pilulifera* L. on male reproductive system of streptozotocin-diabetic rats. *Am. J. Pharmacol. Toxicol.* 2:22-28.
- [24] Kishk YFM and El Sheshetawy HE, 2010, Optimization of ginger (*Zingiber officinale*) phenolics extraction conditions and its antioxidant and radical scavenging activities using response surface methodology. *World J. Dairy & Food Sci.*, 5 (2), 188-196.
- [15] Romdhane, M. and Gourdon, C, 2002, Investigation in solid-liquid extraction: Influence of ultrasound. *Chem. Eng. J.*, 87, 11.
- [16] Shotipruk, A., Kaufman, P.B, 2001, Feasibility study of repeated harvesting of menthol from biologically viable *Mentha piperata* using ultrasonic extraction. *Biotechnol Prog.*, 17(5), 924-928.
- [17] Ranjbar, A. Maghsoudlou, Y. Ghorbani, M and Sadeghi Mahounak A.R, 2010 , The use of pectinase and ethanol treatment for lycopene purity and yield enhancement extracted from tomato peel. *EJFPP.*, Vol.1 (3): 37-50.
- [18] Benzie, I.F.F., Strain, J.J, 1999, Ferric reducing / antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymology*. 299: 15-27.
- [19] Moktan, B., Saha, J. and Sarkar, P.K, 2008, Antioxidant activities of soybean as affected by *Bacillus*-fermentation to kinema. *Food Research International*, 41: 586–593.

Optimizing of Temperature, Time and Solvent Concentration in Extraction of Antioxidant Extract from Walnut Interstitial Tissue During Ultrasound Process

Gohari, A.¹, Hakimzadeh, V.^{2*}, Golmakani, E.³

1. M.Sc. Student Department of Food Science and Technology, Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran.
2. Assistant Professor Department of Food Science and Technology, Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran.
3. Assistant Professor Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

(Received: 2017/01/29 Accepted: 2017/08/24)

Studies on different parts of the walnut is indicate the exist of antioxidant, antimicrobial and anticancer properties. In this work, the effect of variety levels of temperature, time and solvent concentration investigated on antioxidant property of Methanol extract of interstitial tissue in walnut kernel during ultrasound process by response surface methodology statistical design. The results showed that increasing of temperature and time improved the antioxidant property, but in highest level of temperature, time and solvent antioxidant property decreased due to phenolic component oxidation and polymerization or dilution of extract. The best of condition for achieve to extract with high antioxidant based on Total phenol, DPPH and FRAP methods were 28.71 min, 39.22 °C and 416.57 ml per 25 gr interstitial tissue powder. Under these parameter yield of extraction, total phenol component, DPPH and FRAP calculated 3.706%, 22.67 (Gallic acid), 0.0108 (IC₅₀) and 1270.05 (mMol Fe⁺⁺) .respectively.

Keywords: Antioxidant, Interstitial tissue, Methanol, Phenolic, Walnut.

* Corresponding Author E-Mail Address: v.hakimzadeh@yahoo.com