



مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی-پژوهشی

مطالعه ترکیبات شیمیایی، میزان فنل، فلاوونوئید و فعالیت آنتی اکسیدانی 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 آنتی اکسیدانی

امروزه مصرف کنندگان تمایل بیشتری به استفاده از افزودنی های سالم و طبیعی دارند. ترکیبات فنولی که از محصولات طبیعی به دست می آیند، گزینه خوبی برای به حداقل رساندن اکسیداسیون لیپیدها هستند. گردو یکی از مهم ترین خشکبارهایی می باشد که به طور وسیع در سراسر جهان کشت می گردد. با توجه به اینکه پوست سبز گردو حدود ۶۴٪ وزن مرطوب میوه گردو را شامل می شود، سالانه رقمی برابر با ۲۴۰ هزار تن پوست سبز گردو از این میوه تولید می شود. 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، عصاره گیری با حلال متانول و به روش سوکسله انجام پذیرفت. جهت شناسایی ترکیبات شیمیایی و گروه های عاملی آزمون های GC-MS و FTIR انجام پذیرفت. همچنین میزان فنل و فلاوونوئیدهای عصاره پوست گردو نیز اندازه گیری شدند. در نهایت فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره پوست سبز گردو با استفاده از روش اندازه گیری 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 فنول ها، ترکیبات آلی و فیتو استرول ها بودند. نتایج FTIR نشان دهنده وجود گروه های 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 کوئرسیتین بود. مقادیر EC50 به دست آمده در این پژوهش برابر با ۰/۱۵ بود. نتایج نشان داد عصاره متانولی پوست سبز گردو می تواند به عنوان جایگزینی برای آنتی اکسیدان های سنتزی معرفی گردد.

DOI: 10.22034/FSCT.19.135.89
DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.135.9.5

* مسئول مکاتبات:

sedaghat@um.ac.ir

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 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 آنتی اکسیدان 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 آنتی اکسیدانی 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 گردو 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

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 پروتوکاتئیک، اسید سیرینزیک و اسید وانیلیک)، فلاونوئیدها (کاتکین، اپی کاتکین، میرستن) و جاگلون ۵ هیدروکسی ۱ و ۴ نفتوکینون) در گردو شناسایی شده است. ترکیباتی نظیر نفتوکینون، فلاونوئیدها و جاگلوناز ترکیبات مهم آنتی اکسیدانی برگ گردو محسوب می‌شوند. جاگلون یکی از مهمترین ترکیبات فنولی موجود در گردو دارای فعالیت آنتی اکسیدانی 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 ماکروویا اشاره نمود [۷-۹]. هدف از این مطالعه عصاره‌گیری از پوست سبز گردو و بررسی ترکیبات شیمیایی، گروه‌های عاملی، میزان فنل، فلاونوئید و فعالیت آنتی اکسیدانی آن می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- تهیه عصاره پوست سبز گردو

۲-۱-۱- 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

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 سانتی گراد) 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 میلی متر و ضخامت لایه داخلی

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

۲-۲-۲-آزمون FTIR

برای شناسایی گروه های عاملی بیومولکول های احتمالی عصاره پوست سبز گردو و ویژگی های مولکولی آن از طیف سنج مادون قرمز (FT-IR) استفاده می شود. طیف مادون قرمز (IR) عصاره پوست سبز گردو در دامنه ی ۴۰۰۰-۴۰۰ CM با استفاده از دستگاه FTIR برند Bruker مدل Vertex70 موجود در دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز اندازه گیری و ثبت شد. لازم به ذکر است که نمونه ها 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)، اندازه گیری گردید. مطابق با این روش، ۱ میلی لیتر از عصاره رقیق شده پوست سبز گردو را با ۱ میلی لیتر معرف فولین سیوکالتیو مخلوط شد. پس از گذشت مدت زمان ۳ دقیقه یک میلی لیتر محلول کربنات سدیم سیر شده به مخلوط عصاره و معرف اضافه گردید و این ترکیب را با آب مقطر به حجم ۱۰ میلی لیتر 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 اسپکتروفتومتر قرائت گردید. اسید گالیک به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون به کار گرفته شد و میزان ترکیبات فنولی نمونه ها به صورت میلی گرم اسید گالیک (GAE) بر گرم وزن خشک بیان گردید [۱۴].

معادله ۱

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

$Y = X$ = جذب خوانده شده، X = میزان فنول

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

مقدار فلاونوئید در عصاره پوست سبز گردو به روش چانگو همکاران (۲۰۰۲)، اندازه گیری گردید. ابتدا ۰/۱ میلی لیتر کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد متانولی با ۰/۱ میلی لیتر استات پتاسیم یک مولار مخلوط شد و سپس ۲/۸ میلی لیتر آب مقطر دو بار تقطیر به آن اضافه گردید. در مرحله بعد ۰/۵ میلی لیتر از محلول عصاره که با ۱/۵ میلی لیتر 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 میلی لیتر) برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. سپس جذب مخلوط واکنش در طول موج ۴۱۵ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر برند BEL مدل Uv-M51 اندازه گیری 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

$$Y = ax + b$$

$Y =$ جذب خوانده شده از نمونه

$X =$ غلظت

۲-۲-۵- میزان به دام اندازی رادیکال های آزاد DPPH

فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره های پوست سبز گردو با استفاده از روش اندازه گیری کاهش ظرفیت رادیکالی به کمک ۲-۲ دی فنیل ۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) مورد بررسی قرار گرفت. DPPH یک ترکیب بنفش رنگ است که به علت حضور گروه های فنیل در ساختار آن به راحتی به صورت رادیکال در می آید و منبع رادیکال آزاد می باشد. توانایی دادن الکترون و یا اتم هیدروژن توسط عصاره ها و ترکیبات مختلف در این آزمون با میزان بی رنگ کردن یا کاهش میزان جذب نوری محلول بنفش DPPH در متانول مورد بررسی قرار گرفت. غلظت های مختلفی (۱- ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر) از عصاره پوست سبز گردو و نیز آنتیاکسیدان سنتزی TBHQ در حلال متانول تهیه شد. ۰/۳ میلی لیتر از محلول های تهیه شده با ۲/۷ میلی لیتر محلول متانول حاوی معرف (DPPH غلظت ۰/۱ میلی مولار) مخلوط شدند. مخلوط همزده شده و به مدت ۶۰ دقیقه در

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

معادله ۳

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

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 حجم های متفاوتی از عصاره پوست سبز گردو (آنتی اکسیدان)، متانول و محلول DPPH می باشد).

۲-۴- آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل داده ها به روش تجزیه واریانس یک طرفه و با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام گردید. برای مقایسه میانگین ها از روش آزمون چند دامنه ای 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 داده های Nist. 62 lib. and FFNSC 2 انجام شد.

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 شده اند.

در پژوهش حاضر مقایسه نتایج ترکیبات شیمیایی عصاره پوست سبز گردو با مطالعات پیشین در نقاط مختلف دنیا نشان داده شده است. هرچند اجزای اصلی عصاره تا حدودی مشابه با سایر مطالعات است، اما با این وجود دارایی کسری تفاوت ها به ویژه در درصد و نوع ترکیبات شیمیایی باشند. تفاوت در میزان ترکیب اصلی گردو را می توان به دلایلی همچون تفاوت های 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 متابولیت های ثانویه متنوعی تحت شرایط محیطی متفاوت، بیوسنتز می شود. پژوهش های مختلفی این مطلب را تأیید کرده اند [۱۸].

مهمترین ترکیبات شناسایی شده که بیشترین سطح زیر منحنی را داشتند شامل پلی فنول ها، ترکیبات آلی و فیتواسترول ها بودند. اکثر ترکیبات فرار معمولاً در پوست سبز گردو وجود دارد. گزارش شده است که بسیاری از فیتوکمیکال های شناسایی شده فعالیت های زیستی جالب توجه دارند. برای مثال Dihydroxynaphthalene، یک متابولیت زیست فعال با فعالیت فیتوتوکسیک است که معمولاً در گیاهان و قارچ ها یافت می شود. 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 بیماری های قلبی نیز محسوب می گردد [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 سیرینیک، میریستین و جوگنون)

با استفاده از کروماتوگرافی مایع فاز معکوس شناسایی شدند [۲۰].

موثرترین ترکیب شناخته شده در این تحقیق ترکیبات پلی فنولی هستند که طبق تحقیقات صورت گرفته مشخص شده است که ترکیبات فنولی به همراه اسیدهای آلی و هگزا متیل ها به دلیل ساختار شیمیایی خود از پتانسیل آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی بالایی برخوردار هستند. همان طور که اشاره شد برخی تفاوت ها در محتوا و نوع ترکیبات پلی فنولی ممکن است با عوامل محیطی و

تنوع در رقم نمونه مرتبط باشد. از دیدگاه فارماکولوژیک، خاصیت آنتی اکسیدان، ضد التهابی و ایمنی زایی وابسته به ترکیبات پلی فنولی می باشد. علاوه بر این، اسید چرب غیر اشباع مانند اسید هگزادکانوئیک و اسید اکتادکانوئیک قادر هستند بر عملکرد پلاکت ها و سیستم قلبی عروقی تأثیر گذار باشند. دیگر اجزایی مانند توکوفرول به عنوان فنول متیله، قادر به تعدیل وضعیت اکسیداتیو هستند [۲۱].

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

۳-۱-۲- تفسیر طیف مادون قرمز با تبدیل فوریه FT-IR

عصاره پوست سبز گردو

برای بررسی ویژگی های جذبی و گروه های 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 طیف سنجی 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 گروه های عاملی و پیوندها بین عناصر را نشان می دهد [۲۲].

در شکل ۱، طیف مادون قرمز با تبدیل فوریه، پودر پوست سبز گردو قابل مشاهده است. این طیف تعدادی باند جذبی را نشان می دهد که حاکی از پیچیده بودن ماهیت ترکیبات موجود در پوست سبز گردو می باشد. در طیف پودر پوست سبز گردو، نوار جذب گسترده در cm^{-1} ۳۴۰۲ نشان دهنده وجود گروه هیدروکسیل (O-H) پیوندی است و می تواند اثبات کننده گروه عاملی الکل و یا فنول باشد. پیک جذب 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

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

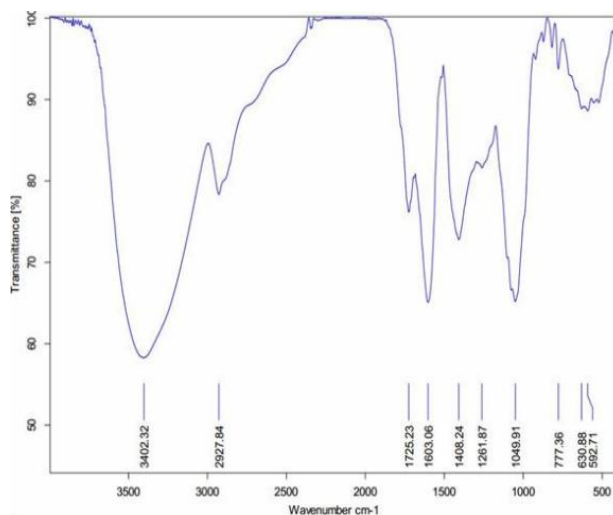


Fig 1 FTIR spectrum of green walnut skin powder

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

ترکیبات فنولی موادی هستند که خاصیت آنتی اکسیدانی دارند. این ترکیبات در تمامی بخش‌های درخت گردو (میوه، پوست و برگ) موجود است و اثر ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی آن شناخته شده است. بنابراین، اجزای مختلف درخت گردو می‌تواند به عنوان منبع آنتی اکسیدان 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 الازیک، اسید پروتوکاتیک، اسید سیرینزیک، اسید وانیلیک، فلاونونوئیدها 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 (میلی گرم 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].

۳-۱-۴- ترکیبات فلاونونوئیدی عصاره پوست سبز گردو

در این مطالعه ترکیبات فلاونونوئیدی عصاره پوست سبز گردو ۳۴۹ میکروگرم بر گرم کوثرستین بود. همانگونه که در مطالعات پیشین نیز مشخص شده بود بین محتوای فنولی و محتوای فلاونونوئیدی رابطه موثر و مثبت برقرار است [۲۵]. فلاونونوئیدها دارای خاصیت آنتی اکسیدانی 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]. فلاونونوئیدها می‌توانند با حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن عملکرد آنتی اکسیدانی داخل سلول را افزایش دهند. لازم به ذکر است که مهم‌ترین خصوصیت فلاونونوئیدها 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 آنتی اکسیدانی بالاتری نسبت به عصاره پوست گردوی حاصل از روش سوکسله می‌باشد. فنول‌ها به دلیل دارا بودن گروه‌های هیدروکسیل دارای فعالیت آنتی اکسیدانی می‌باشند. بنابراین محتوای ترکیبات فنولی در گیاهان ارتباط مستقیمی با خاصیت آنتی اکسیدانی آن‌ها دارد [۳۰]. بسیاری از پژوهشگران رابطه مستقیمی بین محتوای فنولی و فعالیت آنتی اکسیدانی را در میوه‌ها و سبزی‌ها گزارش نموده‌اند. ارتباط مستقیم غلظت پلی فنول با فعالیت آنتی اکسیدانی در مطالعه الیویرا و همکاران (۲۰۰۸) [۷] و ما و همکاران (۲۰۱۱) [۳۱]، بر روی پوست گردو، نشان داده شده است. نتایج ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره توسط روش بازدارندگی رادیکال DPPH نشان داد که با افزایش غلظت عصاره به ویژه در غلظت‌های کمتر از ۰/۲ میلی گرم بر میلی لیتر، 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

- [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، فلاوونوئید 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 پایان‌نامه 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., Tabatabaei-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 pyrolygneous 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

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

ABSTRACT

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.