DOI: http://dx.doi.org/10.22104/jift.2017.2203.1510

فصلنامه فناوری‌های نوین غذایی، دوره ۵، شماره ۲، صفحه ۳۵۹-۳۴۹، زمستان ۱۳۹۶

تاثیر روش‌های مختلف استخراج بر میزان ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ گردوی (*Juglans regia L.*) مناطق شاهرود، دماوند و هزارجریب

عیسی سندگل[1]، زینب رفتنی امیری[2*]، جعفر محمدزاده میلانی[2]

1. دانشجوی کارشناسی ارشد، علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
2. دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

(تاریخ دریافت: 96/2/27، تاریخ بازنگری: 96/4/19، تاریخ پذیرش: 96/5/5)

چکیده

نگرانی از ایمنی آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک به تحقیقات گسترده‌ای درباره گیاهان، که منبع غنی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی هستند منجر شد. برگ گردو منبعی غنی از ترکیبات فنولی است که این ترکیبات مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی هستند. در این پژوهش ابتدا تاثیر مناطق شاهرود، دماوند و هزارجریب و روش‌های استخراج غرقابی، اولتراسوند و ماکرویو بر بازده استخراج ترکیبات فنلی از برگ درخت گردو با آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار مورد بررسی قرار گرفت. سپس فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های عصاره برگ گردو با آزمون‌های DPPH و قدرت احیا کنندگی مورد ارزیابی قرار گرفت. بالاترین بازده استخراج ترکیبات فنلی با روش اولتراسوند و بیش‌ترین میزان ترکیبات فنلی مربوط به منطقه دماوند بوده است. بالاترین میزان ترکیبات فنلی مربوط به برگ گردوی منطقه دماوند با روش استخراج اولتراسوند، 245/08±0/46 میلی‌گرم گالیک اسید درهرگرم عصاره و کم‌ترین مقدار آن به برگ گردوی هزارجریب با روش غرقابی، 170/49±7/4 میلی‌گرم گالیک اسید درهرگرم عصاره بود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها نیز متناسب با میزان ترکیبات فنلی آن‌ها بود. کم‌ترین میزان EC_{50} برای آزمون‌های DPPH و قدرت احیا کنندگی مربوط به روش استخراج اولتراسوند و منطقه دماوند بوده است.

واژه‌های کلیدی: برگ گردو، دماوند، اولتراسوند، ترکیبات فنلی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی.

* نویسنده مسئول: z.raftani@sanru.ac.ir

1- مقدمه

گردو با نام علمی *Juglans* از خانواده *Juglandaceae* و جنس *Juglans* است. گونه‌های این جنس همگی خزان‌دار و دارای میوه خوراکی می‌باشند و خواهان آب و هوای مدیترانه‌ای هستند. گردوی ایرانی *Juglans regia L.* گونه غالب از خانواده *Juglandaceae* می‌باشد که منشا طبیعی آن مناطق کوهستانی آسیای مرکزی است [1]. محصولات جانبی به‌دست آمده از گردو مانند گردوی سبز، پوسته، مغز، پوست درخت و برگ آن می‌توانند در صنایع دارویی و آرایشی مورد استفاده قرار گیرند [2]. برگ‌های آن در طب سنتی برای درمان التهابات پوستی، عرق کردن بیش از حد و زخم معده به‌طور وسیعی مورد استفاده قرار می‌گیرد [3]. برگ‌های خشک گردو به‌طور گسترده‌ای به صورت دم کرده مصرف می‌شود [4].

ترکیبات فنلی، مواد زیستی هستند که به‌طور گسترده‌ای در گیاهان وجود دارند و از اجزای رژیم غذایی انسان می‌باشند. ترکیبات فنلی گیاهی گروه‌های مختلفی از جمله فلاونوییدها مانند آنتوسیانین‌ها، فلاونول‌ها و فلاون‌ها و غیر فلاونوییدی مثل فنولیک اسیدها، لیگنین‌ها و استلیبن‌ها را شامل می‌شوند. گردو به‌طور خاص تمامی گروه‌های ترکیبات فنلی را دارا می‌باشد [5]. فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنلی بر حسب ساختار ملکولی آن‌ها متفاوت است و فعالیت آنتی‌اکسیدانی میوه‌ها و سبزی‌ها به میزان ترکیبات فنلی آن‌ها بستگی دارد [6]. این فعالیت آنتی‌اکسیدانی به‌دلیل ویژگی‌های اکسایشی-کاهشی (Redox) وساختار شیمیایی این ملکول‌ها است که می‌توانند نقش مهمی در خنثی سازی رادیکال‌های آزاد، شلاته کردن فلزات سنگین و فرونشاندن اکسیژن یگانه و سه گانه داشته باشند [7]. تحقیقات زیادی در مورد شناسایی ساختار ترکیبات فنلی محصولات جانبی گردو انجام گرفته است [2، 8-10].

اولین مرحله در انجام آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی و استفاده از گیاهان در صنعت تهیه عصاره‌های گیاهی است [11]. عصاره‌های گیاهی در صنایعی هم‌چون داروسازی، آرایشی و بهداشتی کاربرد دارند. روش‌های مختلفی برای استخراج این ترکیبات وجود دارد. یکی از این روش‌ها، روش غرقابی است که روشی زمان بر است و میزان مصرف حلال و آلودگی محیطی در آن زیاد است. از این رو امروزه از روش‌های جدیدتر مثل استخراج کمک اولتراسوند ، ماکرویو ، آنزیم ، میدان الکتریکی ضربان‌دار و به‌عنوان روش‌های سریع برای استخراج ترکیبات موثر گیاهی بهره می‌گیرند[12].

در بررسی تحقیقات مشابه، رضایی ارمی و همکاران عصاره برگ گردو را با دو روش استخراج به کمک ماکرویو و سنتی استخراج کردند و ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های حاصل را مورد ارزیابی قرار دادند. آن‌ها به این نتیجه رسیدند که استخراج به کمک ماکرویو در مقاسیه با روش سنتی با صرف زمان بسیار کم‌تر، بازدهی بالاتری از نظر درصد استخراج ترکیبات فنولی دارد. در بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی مشخص شد که بین میزان ترکیبات فنولی موجود در عصاره و فعالیت آنتی‌اکسیدانی رابطه مستقیمی وجود داشته و هم‌چنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها وابسته به غلظت بوده است[13]. آلمیدا و همکاران ترکیبات فنولی موجود در برگ گردو را خالص‌سازی کردند و کوئرستین سه گالاکتوزید را به‌عنوان ترکیب فنولی اصلی و عمده موجود در برگ گردو عنوان کردند. هم‌چنین نشان دادند که عصاره برگ گردو توانایی بسیار زیادی در خنثی سازی انواع گونه‌های رادیکال آزاد دارد و می‌تواند به‌عنوان منبعی از آنتی‌اکسیدان های طبیعی مورد استفاده قرار گیرد[14]. در بررسی اثر سه روش استخراج غرقابی، استخراج به کمک اولتراسوند و استخراج به کمک ماکرویو بر روی میزان ترکیبات فنولی برگ‌های گزنه، قره‌خانی و همکاران به این نتیجه رسیدند که در بین سه روش، استخراج به کمک ماکرویو بسیار موثرتر عمل کرده و بازدهی استخراج تقریبا 1/5 برابر سایر روش‌ها داشته است[15]. روحانی و همکاران ترکیبات آنتوسیانینی و آنتی‌اکسیدانی پرچم گل زعفران را توسط امواج فراصوت استخراج کردند. در این بررسی اثر شدت امواج فراصوت و زمان روی میزان ترکیبات فنولی، ترکیبات آنتوسیانینی، مهار رادیکال آزاد DPPH و قدرت احیاکنندگی مورد ارزیابی قرار گرفت. آن‌ها به این نتیجه رسیدند که بهترین شرایط استخراج ترکیبات فنولی و هم‌چنین بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به زمان 10 دقیقه و شدت صوت 100% بوده است[16].

اخیرا علاقه فزاینده‌ای به سمت ترکیبات فیتوشیمیایی

به‌عنوان منبعی غنی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به‌وجود آمده است. هدف استفاده از این ترکیبات در صنایع غذایی و دارویی، جایگزینی آن‌ها با آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی می‌باشد که برای سلامتی بشر مضر هستند. برگ گردو یک منبع بالقوه از ترکیب-های محافظ سلامت می‌باشد و به‌طور وسیعی در طب سنتی کاربرد دارد. در این مطالعه تاثیر سه روش استخراج سنتی (غرقابی)، استخراج به کمک ماکرویو و استخراج به کمک اولتراسوند روی میزان استخراج ترکیبات فنلی از برگ گردوی مناطق مختلف بررسی شد. هم‌چنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های به‌دست آمده با دو روش مهار رادیکال آزاد DPPH و قدرت کاهندگی آهن (III) مورد ارزیابی قرار گرفت.

2-مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی مورد استفاده دراین تحقیق متانول، اتانول (شرکت صنایع شیمیایی غدیر ساخت کشور ایران)، معرف فولین-سیوکالتو، بافر فسفات، بی‌کربنات سدیم، فری‌سیانید پتاسیم، اسید گالیک، تری کلرواستیک اسید، معرف DPPH (2و2 دی فنیل 1- پیکروهیدرازیل) و آهن (III) کلرید (شرکت مرک ساخت کشور آلمان) می‌باشند.

2-1- مواد اولیه

در این پژوهش برگ گردو از سه منطقه شاهرود، هزارجریب و دماوند در شهریور ماه سال 1392 جمع آوری شدند. به‌طوری که نمونه‌های چیده شده فاقد هر گونه آثار آفتاب سوختگی و کاملا سالم بودند. پس از تهیه، برگ‌ها به مدت ده روز در سایه کاملا خشک شدند و سپس توسط آسیاب (شرکت مجیک بلندر ساخت کشور کره‌جنوبی) خرد و از الک با مش 40 عبور داده و برای انجام آزمون-های بعدی در کیسه‌های پلی‌اتیلنی محافظ رطوبت و در دمای 18- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند [17].

2-2- روش‌ها

2-2-1- استخراج سنتی (غرقابی)

برای این منظور10 گرم از نمونه‌های برگ گردوی خشک از هر یک از مناطق گفته شده با نسبت 10:1 یعنی 1 قسمت نمونه و10 قسمت حلال، با حلال اتانول:آب (4:6) مخلوط شد. سپس نمونه‌ها برای استخراج به مدت 24ساعت روی شیکر (شرکت فن‌آزما ساخت کشور ایران) با 120 دور در دقیقه قرار گرفت.

2-2-2- استخراج به کمک اولتراسوند

در این روش 10 گرم برگ گردو به نسبت 10:1 وزنی-حجمی، با حلال اتانول:آب (4:6) مخلوط شده و به مدت 40 دقیقه در دمای 30 درجه سانتی‌گراد و فرکانس 60-50 هرتز توسط دستگاه حمام اولتراسونیک (مدل اس 30 اچ شرکت الماسونیک ساخت کشور آلمان) استخراج صورت گرفت [18].

2-2-3-استخراج به کمک ماکرویو

برای استخراج عصاره توسط ماکرویو ابتدا 10 گرم از نمونه با 100 میلی‌لیتر حلال اتانول:آب (4:6) کاملا مخلوط شده و سپس تحت اثر امواج ماکرویو (مدل سولار دام شرکت ال جی ساخت کشور کره‌جنوبی) با توان 360 وات به مدت 10 دقیقه استخراج انجام شد [12].

عصاره‌های به‌دست آمده حاصل از روش‌های مختلف توسط کاغذ صافی واتمن شماره یک با کمک پمپ خلا فیلتر شد. عصاره‌های فیلتر شده حاصل توسط آون (شرکت ممرت ساخت کشور آلمان) و در دمای کم‌تر از 50 درجه سانتی‌گراد خشک شده و برای انجام آزمایشات بعدی در دمای کم‌تر از 18- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

2-2-4- اندازه‌گیری ترکیبات فنلی

میزان کل ترکیبات فنلی موجود در عصاره برگ گردو با روش رنگ سنجی فولین-سیوکالتو مورد بررسی قرار گرفت[19]. برای این منظور200 میکرولیتر از نمونه با غلظت 1000 میکروگرم در میلی‌لیتر در حلال استخراجی، با 500 میکرولیتر معرف فولین- سیوکالتو به نسبت 10:1 رقیق شده با آب مخلوط شده و بعد از گذشت 3 دقیقه 800 میکرولیتر محلول سدیم بی‌کربنات (7/5٪ وزنی – حجمی) به آن اضافه شد و به مدت 30 دقیقه در مکانی تاریک قرار داده شد. سپس مقدار جذب محلول توسط دستگاه اسپکتروفتومتر دو پرتویی ماوراء بنفش- مرئی (مدل اسپکول 2000 شرکت آنالیتیکا جنا

ساخت کشور آلمان) در طول موج 765 نانومتر خوانده شد. مقدار کل ترکیب‌های فنولی با استفاده از معادله خط رسم شده (R^2= 0/9988) برای اسید گالیک (شرکت مرک ساخت کشور آلمان)، بر مبنای اسید گالیک و به صورت میلی گرم اسید گالیک در هر گرم عصاره خشک بیان گردید.

2-2-5- ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی

2-2-5-1- ارزیابی فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

توانایی دادن اتم هیدروژن یا الکترون توسط ترکیبات و عصاره‌های مختلف در این آزمایش با میزان بی‌رنگ شدن محلول بنفش رنگ 2و2 دی فنیل 1- پیکروهیدرازیل (DPPH) در اتانول مورد سنجش قرار گرفت.

توانایی مهار رادیکال‌های آزاد DPPH به روش یائو و همکاران انجام گرفت [20]. برای این منظور 100 میکرولیتر از غلظت‌های مختلف عصاره به میزان 25، 50، 100، 200 و 500 میکروگرم در میلی‌لیتر، در حلال استخراجی تهیه و با 1/4 میلی‌لیتر محلول اتانول 50٪ مخلوط و به آن 1 میلی‌لیتر محلول0/004٪ از DPPH در اتانول اضافه شد. پس از 15 دقیقه جذب آن در 517 نانومتر خوانده شد. برای شاهد 1/5 میلی‌لیتر محلول اتانول 50٪ با 1 میلی‌لیتر محلول0/004% از DPPH در اتانول مخلوط شده و جذب آن در همان طول موج خوانده شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی بر حسب درصد مهار رادیکال ازاد DPPH طبق رابطه (1) محاسبه شد:

$$\text{درصد مهار DPPH} = \frac{\text{درصد جذب شاهد} - \text{درصد جذب نمونه}}{\text{درصد جذب شاهد}} \times 100 \qquad (1)$$

جهت بررسی بهتر فعالیت آنتی‌رادیکالی از فاکتور EC_{50} که بیانگر درصدی از عصاره که قادر به خنثی کردن 50 درصد از رادیکال‌های آزاد DPPH است، استفاده شد.

2-2-5-2- ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها به روش قدرت احیا کنندگی آهن (III)

توانایی عصاره‌ها برای احیا آهن سه ظرفیتی بر اساس روش رضایی ارمی و همکاران اندازگیری شد [13]. بر اساس این روش 1میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره به میزان 25، 50، 100، 200 و 500 میکروگرم در میلی‌لیتر در حلال استخراجی با 1میلی‌لیتر بافر فسفات (PH = 6/6 و M =0/2) و 1 میلی‌لیتر محلول فری سیانید پتاسیم (10 گرم در لیتر) کاملا مخلوط شد و به مدت 20 دقیقه در دمای 50 درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. سپس 1 میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک‌اسید (100گرم در لیتر) به مخلوط فوق اضافه و کاملا مخلوط شد. سپس نمونه‌ها به مدت 10 دقیقه سانتریفوژ (3000 g) گردید. پس از آن، 1 میلی‌لیتر از محلول رویی با 1میلی‌لیتر آب مقطر و 150 میکرولیتر محلول آهن (III) کلرید (1 گرم در لیتر) مخلوط گردید و در طول موج 700 نانومتر جذب آن با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. میزان جذب نشان دهنده قدرت احیا کنندگی عصاره‌ها می‌باشد. به طور معمول برای مقایسه نیروی احیاکنندگی عصاره‌های مختلف از فاکتوری تحت عنوان EC_{50} استفاده می‌شود. طبق تعریف EC_{50} به غلظتی از عصاره اطلاق می‌گردد که در طول موج 700 نانومتر جذبی معادل 0/5 داشته باشد. بنابراین هرچه این غلظت کم‌تر باشد، نشان‌دهنده نیروی احیاکنندگی بالاتر عصاره‌ها و در نتیجه فعالیت آنتی‌اکسیدانی بهتر آن‌ها است که به‌دلیل وجود ترکیبات فنلی می‌باشد.

2-2-6- تجزیه و تحلیل آماری

در این مطالعه تاثیر دو فاکتور روش استخراج سنتی، ماکروویو و اولتراسوند و منطقه شاهرود، هزارجریب و دماوند بر مقدار ترکیبات فنلی با آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تیمارها در سه تکرار انجام شده و نتایج با استفاده از روش آنالیز واریانس (ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال 5 درصد با نرم‌افزار SPSS 16 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نمودارها با نرم‌افزار اکسل رسم شده‌اند.

3- نتایج و بحث

3-1- مقایسه روش‌های مختلف استخراج روی میزان ترکیبات فنلی کل

آزمون فولین-سیوکالتو، که برای اندازگیری ترکیبات فنلی

کل عصاره برگ گردو استفاده شده، سالها است که به‌عنوان یک روش مرجع برای اندازگیری ترکیبات فنلی محصولات طبیعی مطرح است. این روش آسان و فراگیر است و ترکیبات مداخله کننده مانند قندها و آمینواسیدهای آروماتیک را محدود می‌کند [21].

نتایج آنالیز واریانس نشان داد که اثر نوع روش به‌کار رفته روی استخراج ترکیب‌های فنولی کل از برگ گردو تاثیر گذار بوده است. همان‌طور که در جدول (1) مشاهده می‌شود، در بین روش‌های مختلف استخراج روش اولتراسوند بالاترین میزان استخراج ترکیبات فنلی را با 226/55 میلی‌گرم گالیک اسید به گرم عصاره داشته است ($p<0/05$). امواج اولتراسوند به‌دلیل سینوسی بودن باعث ایجاد حباب‌هایی درون محیط می‌شوند که پر از بخار حلال هستند. در طی سیکل فشار این حباب‌ها و گاز درون آن‌ها فشرده شده و منفجر می‌شود و باعث افزایش فشار و دما در محیط می‌شود. نتیجه انفجار حباب‌ها درون محیط، مخلوط شدن بهتر حلال و ماده گیاهی است. علاوه‌بر این اولتراسوند یک نیروی مکانیکی هم ایجاد می‌کند و باعث افزایش نفوذ حلال در بافت گیاهی می‌شود. این دو عامل باعث افزایش انتقال جرم و شکستن دیواره سلولی می‌شود [22]. هم‌چنین اولتراسوند به‌دلیل به‌وجود آمدن رادیکال‌های آزاد طی پدیده کاویتاسیون می‌تواند باعث تغییرات شیمیایی شود [23]. در نتیجه آن نفوذ حلال‌ها به درون سلول‌ها و انتقال جرم افزایش می‌یابد. تغییرات سریعی که در نتیجه کاویتاسیون در دما و فشار به‌وجود می‌آید باعث شکستن برشی و رقیق کردن غشاء سلولی می‌شود و این‌ها پدیده‌هایی هستند که فراصوت را برای تغییر محیط امکان‌پذیر می‌نماید [24]. در پژوهشی که رودریگیز- روجو و همکاران برای مقایسه سه روش استخراج سنتی، ماکرویو و اولتراسوند انجام دادند، استخراج با امواج اولتراسوند به‌عنوان بهترین روش استخراج ترکیبات فنلی از برگ رزماری انتخاب شد و پس از آن روش ماکرویو و سنتی قرار گرفت [25]، که با نتایج به دست آمده در این پژوهش مطابقت دارد. گلی و همکاران ترکیبات فنلی پسته را استخراج کردند و روش اولتراسوند را روش مناسب برای استخراج ترکیبات فنلی اعلام کردند [26].

هم‌چنین بین دو روش ماکرویو و غرقابی، روش ماکرویو میزان ترکیبات فنلی بیش‌تری را استخراج کرد و اختلاف آن‌ها از نظر آماری معنی‌دار بود (جدول 1). اصول گرمادهی با استفاده از امواج ماکرویو بر مبنای تاثیر مستقیم ماکرویو روی ملکول‌ها توسط هدایت یونی و چرخش دوقطبی است. ملکول‌های قطبی مانند پلی‌فنل‌ها و محلول‌های یونی انرژی ماکرویو را به شدت جذب می‌کنند. زیرا آن‌ها یک گشتاور دوقطبی ثابت دارند. این امر موجب افزایش سریع دما و تکمیل سریع واکنش می‌گردد [27]. افزایش دما منجر به بهبود کارایی استخراج می‌گردد البته تا جایی که منجر به تخریب ترکیبات نگردد. دلیل این امر را این گونه توضیح می‌دهند که افزایش دما منجر به افزایش واجذبی ترکیبات از ماتریکس می‌شود [28].

نتایج نشان داد که اثر منطقه جغرافیایی در استخراج ترکیبات فنلی در سطح احتمال 5 درصد معنی‌دار است

جدول (1) مقایسه میانگین تاثیر روش استخراج روی ترکیبات فنلی کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی برگ گردوی مناطق مختلف

Table 1 Comparison of the mean values of the effect of extraction method on the total phenolic compounds and antioxidant activity of walnut leaves from different regions

روش استخراج Method of extraction	ترکیبات فنلی کل Total phenolic compound (mg GAE/g Dry extract)	EC_{50} (µg/ml) مهار رادیکال آزاد DPPH Inhibition of free radical DPPH	EC_{50} (µg/ml) قدرت احیاکنندگی Reducing power
روش سنتی Traditional	192.88c*	248.11c	156.31c
روش ماکرویو Microwave	212.43b	201.88b	139.84b
روش اولتراسوند Ultrasound	226.55a	168.11a	119.11a

*حروف غیر مشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی دار در سطح 0/05 می‌باشد.

Different letters at each column show significant difference in 95% of confidence level ($p<0.05$).

(p<0/05). از بین سه منطقه جغرافیایی بیش‌ترین میزان ترکیبات فنلی مربوط به منطقه دماوند و پس از آن به‌ترتیب شاهرود و هزارجریب بود (جدول 2). ترکیبات فنلی تحت تاثیر عوامل مختلفی می‌باشد. از آن جمله می‌توان به نور، فاکتورهای ژنتیکی، شرایط محیطی و شرایط نگه‌داری و حتی رقم‌های مختلف اشاره کرد [2]. در واقع ژنوتیپ، شرایط رشد مانند قابلیت دستیابی به آب، کیفیت نور و دما، روی سنتز و ذخیره ترکیبات فنلی در بخش‌های مختلف یک گیاه تاثیر می‌گذارد و در نتیجه فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز تحت تاثیر قرار می‌گیرد [29]. در این پژوهش میزان ترکیبات فنلی برگ گردو بین 245/08 -170/49 میلی‌گرم گالیک اسید در هر گرم عصاره متغیر بوده است (جدول 3). آلمیدا و همکاران میزان ترکیبات فنلی برگ گردو که توسط حلال اتانول:آب (4:6) استخراج شده بود را 270±3 میلی گرم گالیک اسید به گرم عصاره گزارش کردند [3].

3-2- ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها

جدول‌های 1 و 2 به ترتیب تاثیر فاکتورهای روش استخراج و منطقه را روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های مختلف نشان می‌دهد. تفاوت مشاهده شده در EC_{50} عصاره‌های مختلف را می‌توان به تفاوت در مقادیر ترکیبات فنلی آن‌ها نسبت داد. در بین روش‌های مختلف، عصاره‌های استخراج شده با روش اولتراسوند نسبت به روش‌های دیگر فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری را نشان دادند و از بین مناطق مختلف عصاره‌های منطقه دماوند کم‌ترین میزان EC_{50} را دارا می‌باشند (p<0/05). عصاره برگ گردو سرشار از ترکیبات فنلی بوده که به‌عنوان متابولیت‌های ثانویه در گیاهان ساخته می‌شوند. این ترکیبات به‌دلیل داشتن گروه‌های هیدروکسیل، توانایی

جدول (2) مقایسه میانگین تاثیر منطقه جغرافیایی روی ترکیبات فنلی کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی برگ گردوی مناطق مختلف

Table 2 Comparison of the mean values of the geographical area effect on the total phenolic compounds and antioxidant activity of walnut leaves from different regions

منطقه Region	ترکیبات فنلی کل Total phenolic compound (mg GAE/g Dry extract)	EC_{50} (µg/ml) مهار رادیکال آزاد DPPH Inhibition of free radical DPPH	EC_{50} (µg/ml) قدرت احیاکنندگی Reducing power
شاهرود Shahrood	213.71[b]*	207.54[b]	126.65[b]
هزارجریب Hezarjerib	185.35[c]	259.77[c]	186.06[c]
دماوند Damavand	232.80[a]	151.28[a]	102.54[a]

*حروف غیر مشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی دار در سطح 0/05 می‌باشد.
Different letters at each column show significant difference in 95% of confidence level (p<0.05).

جدول (3) مقایسه میانگین مقادیر فنل کل حاصل از روش‌های مختلف استخراج و مناطق مختلف

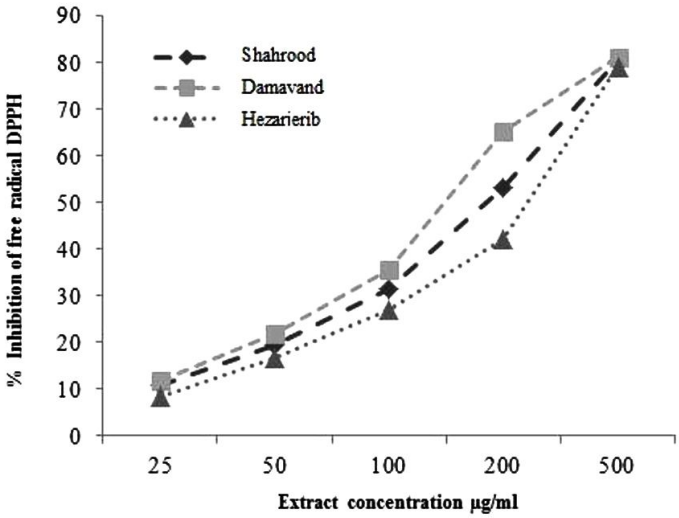
Table 3 Comparison of the mean values of total phenols which extract by different extraction methods and different regions

منطقه Region	ترکیبات فنلی کل Total phenolic compound (mg GAE/g Dry extract) غرقابی Immersion	اولتراسوند Ultrasound	ماکرویو Microwave
شاهرود Shahrood	187.27 ± 3.37[e]*	236.57± 2.22[b]	217.26 ± 2.44[c]
هزارجریب Hezarjerib	220.87 ± 1.72[c]	245.08 ± 0.46[a]	232.46 ± 3.86[b]
دماوند Damavand	170.49 ± 7.4[f]	198 ± 1.01[d]	187.56 ± 3.04[e]

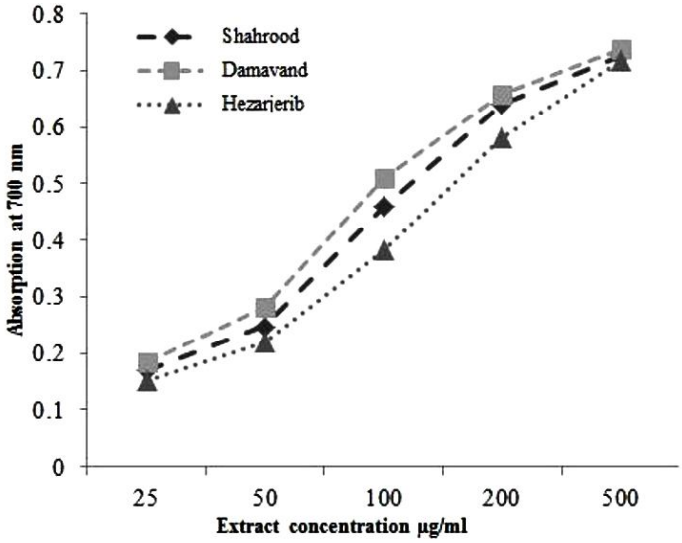
*حروف غیر مشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی دار در سطح 0/05 می‌باشد.
Different letters at each column show significant difference in 95% of confidence level (p<0.05).

خنثی سازی رادیکال‌های آزاد را داشته و می‌توانند به‌عنوان دهنده الکترون یا هیدروژن عمل کنند [4]. باریرا و همکاران فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی گل، برگ، پوسته خارجی، پوسته داخلی و میوه بلوط را بررسی کرده و گزارش کردند که همه عصاره‌ها به جز عصاره میوه دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی خوبی بودند [30]. نمونه‌های داری مقادیر پلی‌فنلی بالاتر مقادیر EC_{50} کم‌تری را نشان دادند. این امر ثابت می‌کند که احتمالا فنل‌ها در فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره نقش دارند. نتایج به‌دست آمده از آزمون مهار رادیکال آزاد نشان می‌دهد که عصاره می‌تواند به‌وسیله دادن هیدروژن و الکترون رادیکال‌های آزاد را خنثی کنند و احتمالا مانع از تاثیر آن‌ها روی بیوملکول‌هایی مثل لیپوپروتئین‌ها، اسیدهای چرب غیراشباع، DNA، آمینواسیدها، پروتئین‌ها و قندها در سیستم‌های حساس بیولوژیکی و غذایی شوند [31].

نتایج آنالیز واریانس و مقایسه میانگین نشان داد که تاثیر منطقه و غلظت روی نیروی احیا کنندگی و مهار رادیکال آزاد

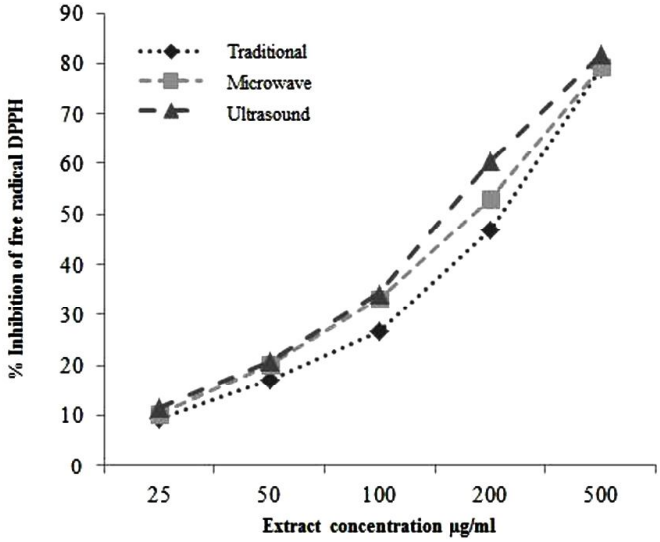


شکل (1) تاثیر مناطق مختلف روی درصد مهار رادیکال آزادDPPH عصاره های حاصل از برگ گردو
Fig. 1 Effect of geographical region on the percentage of inhibition of free radical DPPH of extracts of walnut leaves



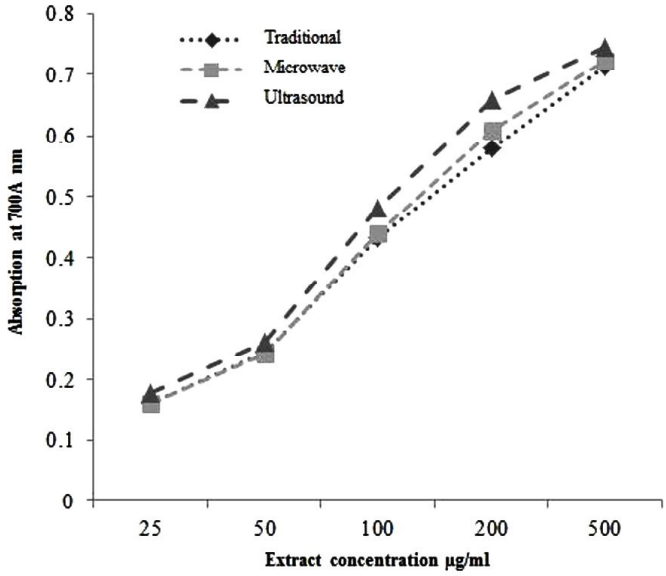
شکل (2) تاثیر مناطق مختلف روی قدرت احیاکنندگی عصاره های حاصل از برگ گردو
Fig. 2 Effect of geographical region on the reducing power of extracts of walnut leaves

DPPH عصاره‌ها و در نتیجه فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها معنی‌دار است ($p<0/05$). در عصاره‌های حاصل از مناطق مختلف فعالیت مهار رادیکال آزاد و هم چنین قدرت احیا کنندگی با افزایش غلظت عصاره افزایش می‌یابد و در هر دو آزمون منطقه دماوند بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را داشته است (شکل 1 و 2). در بررسی اثر روش استخراج و غلظت روی فعالیت آنتی‌اکسیدان مشخص شد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با افزایش غلظت عصاره افزایش می‌یابد. بیش‌ترین میزان مهار رادیکال آزاد DPPH و قدرت احیا کنندگی مربوط به روش اولتراسوند بوده است (شکل 3 و 4). ویژگی‌های احیاکنندگی با حضور ترکیبات اهداکننده الکترون همراه است. با افزایش میزان ترکیبات فنلی موجود در عصاره، قدرت احیاکنندگی آن‌ها افزایش می‌یابد. ظرفیت کاهندگی به‌عنوان شاخص برای نشان دادن قدرت آنتی‌اکسیدانی نوع دوم مطرح است. اثر آنتی‌اکسیدانی ترکیبات به میزان کاهش آن‌ها یا به عبارت دیگر به میزان توانایی آن‌ها در دادن هیدروژن به رادیکال آزاد



شکل (3) تاثیر روش‌های مختلف استخراج روی درصد مهار رادیکال آزادDPPH عصاره های حاصل از برگ گردو

Fig. 3 Effect of different methods of extraction on the percentage of inhibition of free radical DPPH of extracts of walnut leaves



شکل (4) تاثیر روش‌های مختلف استخراج روی قدرت احیاکنندگی عصاره های حاصل از برگ گردو

Fig. 4 Effect of different methods of extraction on the reducing power of extracts of walnut leaves

و خنثی کردن آن بستگی دارد. از این رو هر چقدر میزان قدرت کاهندگی ترکیبات بیش‌تر باشد فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها بالاتر است [32، 33]. در بررسی اثر غلظت عصاره روی قدرت کاهندگی عصاره‌ها تحقیقات زیادی انجام گرفته است [4، 36-34]. آن‌ها نشان دادند که با افزایش غلظت عصاره فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن افزایش می یابد.

رادیکال آزاد DPPH در محیط الکلی دارای حداکثر جذب در 517نانومتر است و ایجاد رنگ ارغوانی می‌کند. در صورت خنثی شدن این رادیکال، از شدت رنگ ارغوانی کاسته شده و به زرد کم رنگ تغییر می‌یابد. بنابراین کاهش جذب نور متناسب با توانایی خنثی سازی رادیکال DPPH توسط عصاره‌ها و به عبارت دیگر قدرت آنتی‌اکسیدانی نمونه مورد نظر خواهد بود [37]. پریرا و همکاران فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی شش رقم برگ گردو را بررسی کردند و گزارش کردند که فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH در غلظت‌های کم‌تر از 0/5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر وابسته به غلظت بوده [4] که با نتایج این مطالعه مطابقت داشت.

4- نتیجه گیری

تاثیر منطقه جغرافیایی و روش استخراج روی میزان استخراج ترکیبات فنلی قابل ملاحظه است. نتایج نشان می‌دهد که استخراج به کمک اولتراسوند بالاترین بازده استخراج ترکیبات فنلی را دارا می‌باشد. در مورد فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز عصاره‌های حاصل از منطقه دماوند کم‌ترین میزان EC_{50} یعنی بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را دارا می‌باشند.

منابع

[1] وحدتی، ک. (1382). احداث خزانه و پیوند گردو. انتشارات خانیزان، 113.

[2] Stampar, F., Solar, A., Hudina, M., Veberic, R., Colaric, M. (2006). Traditional walnut liqueur–cocktail of phenolics. *Food Chem*., 95, 627–630.

[3] Almeida, I. F., Fernandez, E., Lima, J. L. F. C., Costa, P. C., Bahia, M. F., (2008). Walnut (*Juglans regia*) leaf extracts are strong scavenger of pro-oxidant reactive species. *Food Chem*., 106, 1014–1020.

[4] Pereira, J. A., Oliveira, I., Sousa, A., Valentao, 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, antimicrobial activity and antioxidant potential of different cultivars. *Food Chem. Toxicol*., 45, 2287–2295.

[5] Kornsteiner, M., Wagner, K. H., Elmadfa, I. (2006). Tocopherols and total phenolics in 10 different nut types. *Food Chem*., 98, 381–387.

[6] Maqsood, S., Benjakul, S. (2010). Comparative studies of four different phenolic compounds on in vitro antioxidant activity and the preventive effect on lipid oxidation of fish oil emulsion and fish mince. *Food Chem*., 119, 123–132.

[7] Ahmadi, F., Kadivar, M., Shahedi, M. (2007). Antioxidant activity of Kelussia odoratissima Moza.model and food systems. *Food Chem*., 105, 57-64.

[8] Fukuda, T., Ito, H., Yoshida, T. (2003). Antioxidant polyphenols from walnuts (*Juglans regia L.). Phytochemistry*, 63, 795–801.

[9] Li, L., Tsao, R., Yang, R., Liu, C. M., Zhu, H. H., Young, J. C. (2006). Polyphenolic profiles and antioxidant activities of heartnut (*Juglans ailanthifolia var. cordiformis*) and Persian walnut (*Juglans regia L*.). *J. Agric. Food Chem*., 54, 8033–8040.

[10] Zhang, Z., Liao, L., Moore, J., Wua, J., Wang, Z. (2009). Antioxidant phenolic compounds from walnut kernels (*Juglans regia L.*). *Food Chem*., 113, 160–165.

[11] Mandal, .V, Mohan, Y., Hemalatha, S. (2007). Mi-

crowave assisted extraction, an innovative & promising extraction tool for medicinal plant research. *Pharmacogn. Rev.*, 1, 8-14.

[12] Wang, L., Weller, C. L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci. Technol.*, 17, 300-312.

[13] رضایی ارمی، س.؛ جعفری، م.؛ خمیری، م.؛ بیات، ه. (1392). استخراج عصاره برگ گردوی بومی ایران با امواج مایکروویو و بررسی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی ترکیب‌های فنولی حاصل. *تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران*، جلد29، شماره 4، ص 879-898.

[14] Almeida, L. F., Fernandes, E., Lima, J. L. F. C., Costa, P. C.F., Ernanda Bahia, M. (2008). walnut (*Juglans regia*) leaf extracts are strong scavengers of pro-Oxidant reactive species. *Food Chem.*, 106, 1014-1020.

[15] Amaral, J. S., Seabra, R. M., Andrade, P. B., Valentao, P. I., Pereira, J. A., Ferreres, F. (2004). Phenolic profile in the quality control of walnut (*Juglans regia L.*) leaves. *Food Chem.*, 88: 373–379.

[16] قره خانی، م.؛ قربانی، م.؛ ابراهیم زاده، م. ع.؛ جعفری،س. م.؛ صادقی ماهونک، ع. (1389). مقایسه روش‌های مختلف استخراج ترکیب های فنولی و فلاونوئیدی از گیاه گزنه (*Urtica dioica L.*). فصلنامهٔ علمی-پژوهشی *تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران*، جلد 26، شماره 3، ص 389-405.

[17] روحانی، ر.؛ عین افشار، س.؛ احمدزاده، ر. (1394). استخراج ترکیبات آنتوسیانینی و آنتی‌اکسیدانی پرچم گل زعفران به کمک فناوری امواج فراصوت. نشریه *پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران*، جلد 11، شماره 2، ص 161-170.

[18] Kamran Khan, M., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A. S., Dangles, O., Chemat, F. (2010). Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis L.*) peel. *Food Chem.*, 119, 851–858.

[19] Vongsak, B., Sithisarn, P., Mangmool, S., Thongpraditchote, S., Wongkrajang, Y., Gritsanapan, W. (2013). Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of Moringa oleifera leaf extract by the appropriate extraction method. *Ind. Crops . Prod.*, 44, 566– 571.

[20] Yao, X., Zhang, D., Zu, Y., Fu, Y., Luo, M., Gu, C., Li, C. M. F., Efferth, T. (2013). Free radical scavenging capability, antioxidant activity and chemical constituents of Pyrola incarnata Fisch. *Leaves. Ind. Crops Prod.*, 49, 247– 255.

[21] Prior. R., Wu, X., Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. J. Agric. *Food Chem.*, 53, 4290–4302.

[22] Albu, S., Joyce, E., Paniwnyk, L., Lorimer, J. P., Mason, T. J. (2004). Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from Rosmarinus officinalis for the food and pharmaceutical industry. *Ultrason. Sonochem.*, 11, 261–265.

[23] Paniwnyk, L., Beaufoy, E., Lorimer, J. P., Mason, T. J. (2001). The extraction of rutin from flower buds of Sophora japonica. *Ultrason. Sonochem.*, 8, 299–301.

[24] Thompson, L. H., Doraiswamy, L. K. (1999). Sonochemistry: science and engineering. Ind. Eng. Chem. Res., 38, 1215-1249.

[25] Rodriguez-Rojo, S., Visentin, A., Maestri, D., Cocero, M. J. (2012). Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents. *J. Food Eng.*, 109, 98–103.

[26] Goli, A. H., Barzegar, M., Sahari, M. A. (2005). Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (Pistachia Vera) hull extracts. *Food Chem.*, 92, 521-525.

[27] Proestos, C., Komatis, M. (2008). Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compound. *LWT-Food Sci. Technol.*, 41(4), 652-659.

[36] دولت‌آبادی، م.؛ رفتنی‌امیری، ز.؛ اسماعیل‌زاده‌کناری، ر. (1393). مقایسه فنل کل و خواص آنی‌اکسیدانی پوست سبز گردوی سه منطقه از شمال ایران (شاهرود، بندرگز و هزارجریب). فصلنامه *علوم و صنایع غذایی ایران*، جلد 11، شماره 45، ص 193-182.

[37] زربان، ا.؛ ملکانه، م.؛ بقراطی، م. (1386). خواص آنتی‌اکسیدانی آب انار و توانایی آن در خنثی سازی رادیکال‌های آزاد، *مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند*، جلد 14، شماره 3، ص 27-19.

[28] Le, J., Zu, G., Fu, Y. J., Yang, Y. C., Li, S. M., Li, Z. N., Wink, M. (2010). Optimization of microwave-assisted extraction of triterpene saponins from defated residue of yellow horn (*Xantoceras sorbifolia Bunge.*) kernel and evaluation of its antioxidant activity. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol*., 11(4), 637-643.

[29] Rumbaoa, R. G. O., Cornago, D. F., Geronimo, I. M. (2009). Phenolic content and antioxidant capacity of Philipine sweet potato (Impomoea batatas) varieties. *Food Chem*., 113, 1133-1138.

[30] Barreira, G. C. M., Ferreira, I. C. F. R., Oliveira, M. B. P. P., Pereira, J. A. (2008). Antioxidant activity of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and fruit. *Food Chem*., 107, 1106-1113.

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

[32] Kanatt, S. R., Chander, R., Sharma, A. (2007). Antioxidant potential of mint (*Mentha spicata L.*) in radiation-processed lamb meat. *Food Chem.*, 100, 451–458.

[33] Koduvayur Habeebullah, S. F., Nielsen, N. S., Jacobsen, C. (2010). Antioxidant activity of potato peel extracts in a fish-rapeseed oil mixture and in oil-in-water emulsions. J. Am. Oil Chem. Soc., 87, 1319–1332.

[34] Oliveira, I., Sousa, A., Valentao, P., Andrade, P., Ferreira, F., Bento, A., Seabra, R., Estevinho, L., Pereira, J. A. (2007). Hazel (*Corylus avellana L.*) leaves as source of antimicrobial and antioxidant compound. *Food Chem*., 105, 1018-1025.

[35] Oliveira, I., Sousa, A., Ferreira, I. C. F. R., Bento, A., Estevinho, L., Pereira, J. A. (2008). Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia L.*) green husks. *Food Chem. Toxicol*., 46, 2326–2331.