

استخراج عصاره پوسته گردو وارسته شه‌میرزادی و تاثیر حلال و روش استخراج بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره حاصله

سمیه رضایی ارمی^{a*}، سید مهدی جعفری^b، مرتضی خمیری^c، هومان بیات^d

^a دانش‌آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گلستان، ایران
^b استادیار گروه مهندسی مواد و طراحی صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گلستان، ایران
^c دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گلستان، ایران
^d دکترای داروسازی، شرکت داروسازی نیاک، گرگان، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۹/۸

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۶/۱

چکیده

مقدمه: تردید در مورد ایمنی و سلامتی آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی منجر به علاقه فزاینده‌ای به سمت آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی و تحقیق در این زمینه شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی و الکی پوسته سبز گردو وارسته شه‌میرزادی حاصل از دو روش استخراج (غرقابی، استخراج میکروویو) به سه روش نیروی احیاکنندگی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل و مهار رادیکال DPPH (۲ و ۲ دی فنیل ۱-پیکرو هیدرازیل) بررسی شد و در نهایت تاثیر آن بر مهار اکسیداسیون روغن سویا با اندازه‌گیری دو اندیس پراکسید و تیوباربیستوریک اسید ارزیابی شد. ترکیبات فنولی عصاره‌ها با حلال متانول (۸۰٪)، اتانول (۵۰٪) و آب استخراج و میزان ترکیبات فنولی آنها با روش فولین سیوکالتو اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد بیشترین مقدار فنول کل مربوط به عصاره متانولی حاصل از استخراج میکروویو بود. کمترین EC₅₀ در آزمون DPPH و نیروی احیاکنندگی مربوط به عصاره اتانولی و در آزمون ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل مربوط به عصاره متانولی بود که در همه این موارد نتایج بهتر از آنتی‌اکسیدان سنتزی BHA بوده و در آزمون ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل نتیجه بهتری از BHT بدست آمد. همچنین عصاره‌ها توانایی به تاخیر انداختن اکسیداسیون را داشتند. با افزایش غلظت عصاره، فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش یافت. غلظت ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام عصاره‌ها به خوبی اکسیداسیون روغن را مهار کرد.

نتیجه‌گیری: با توجه به مطالب ذکر شده می‌توان پوسته سبز گردو را به عنوان منبع قابل توجهی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مطرح نمود و پس از آزمایشات تکمیلی به عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی به روغن خوراکی افزود.

واژه‌های کلیدی: امواج میکروویو، روغن سویا، مهار رادیکال آزاد DPPH، نیروی احیاکنندگی

مقدمه

آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی ترکیبات فنولی هستند که در همه بخش‌های یک گیاه وجود دارد و از انواع متابولیت‌های ثانویه هستند که گیاهان در مواجهه با گونه‌های فعال اکسیژن آن‌ها را تولید می‌کنند (Hagen *et al.*, 2007). فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولی اساساً به دلیل خصوصیات اکسایشی و کاهش‌دهنده آنهاست که این امکان را به آنها می‌دهد که به عنوان یک عامل احیاکننده، دهنده هیدروژن و خنثی‌کننده اکسیژن یگانه عمل کنند. به‌علاوه آنها توانایی شلاته کردن فلزات را نیز دارند (Wijngaard *et al.*, 2009). این ترکیبات واکنش‌های اکسایشی روغن‌ها، چربی‌ها و ترکیبات محلول در چربی را به تأخیر می‌اندازند و بنابراین از توسعه عطر و طعم و بوهای نامطبوع در اثراکسایش ممانعت به عمل می‌آورند. آنتی‌اکسیدان‌ها به طور طبیعی در اکثر منابع غذایی موجود هستند. فراوری ممکن است باعث تخریب یا حذف این ترکیبات گردد. بنابراین افزودن ترکیبات آنتی‌اکسیدانی برای حفظ کیفیت برخی محصولات موردنیاز است. خصوصاً روغن‌ها، چربی‌ها و محصولات با محتوی چربی بالا، مستعد اکسیداسیون هستند و نیاز به افزودن آنتی‌اکسیدان در این محصولات وجود دارد. آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی فرار و حساس به گرما هستند و برای ثبات و پایداری مواد غذایی مطلوب نیستند. از طرفی استفاده از آن‌ها سلامتی انسان را تهدید می‌کند. بنابراین استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. پوسته سبز گردو به عنوان محصولی جانبی و منبعی از ترکیبات فیتوشیمیایی ارزش تولید گردو را بالا می‌برد. برای استفاده از ترکیبات فنولی موجود در پوسته گردو این ترکیبات باید استخراج گردد. از روش‌های مختلفی برای استخراج ترکیبات فنولی استفاده می‌شود. یکی از این روش‌های نوین، استخراج به کمک امواج میکروویو می‌باشد. کاهش زمان استخراج، عملکرد و خلوص بالا، امکان اتوماسیون، حرارت دهی یکنواخت و مصرف کم حلال از مزایای استخراج با امواج میکروویو می‌باشند (Mandal *et al.*, 2007). تاکنون گزارشی مبنی بر استخراج ترکیبات فنولی پوسته سبز گردو با کمک امواج

استخراج عصاره پوسته گردو و بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن

میکروویو و کاربرد در مهار اکسیداسیون روغن سویا وجود ندارد. Li و همکاران (۲۰۰۶) ترکیبات فنولی پوست پنج گونه مرکبات را با اتانول و آب استخراج کردند. نتایج حاکی از آن بود که پارامترهای اصلی تأثیردهنده روی بازده استخراج پلی‌فنول‌ها، شرایط پوست (منظور از شرایط پوست یعنی نحوه آماده سازی، خشک کردن، میزان رطوبت، تیمارهای به کار رفته روی آن، نوع گونه گردویی که پوسته آن جدا شده است و بسیاری از عوامل دیگر است)، دمای استخراج، غلظت حلال و گونه مرکبات بوده است.

Pan و همکاران (۲۰۰۸) فعالیت آنتی‌اکسیدانی پوست لنگان^۱ را با اتانول ۹۵٪ و دو روش غرقابی و میکروویو استخراج کردند. در هر دو روش عصاره فعالیت آنتی‌اکسیدانی بهتری نسبت به BHT از خود نشان دادند. همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره حاصل از روش میکروویو بهتر از روش غرقابی بوده است.

Ballard و همکاران (۲۰۱۰) ترکیبات فنولی پوسته بادام زمینی را با اتانول ۳۰٪ تحت توان، زمان و مقادیر مختلف مواد اولیه با استفاده از امواج میکروویو استخراج کردند. در شرایط بهینه که شامل توان ۹۰٪، زمان ۳۰ ثانیه، ۱/۵ گرم نمونه و ۳۷/۵ میلی‌لیتر اتانول ۳۰٪ بود، مقدار فنول کل ۱۴۳/۶ میلی‌گرم گالیک اسید بر هر گرم پوسته بوده است. Goli و همکاران (۲۰۰۵) اثر ترکیبات فنولی پوست سبز پسته را بر روغن سویا بررسی کردند. نتایج نشان داد که با افزایش میزان ترکیبات فنولی افزوده شده به روغن، اثر آنتی‌اکسیدانی آن افزایش یافت. همچنین تیمار ۶۰۰ پی‌پی‌ام عصاره قابل مقایسه با غلظت ۲۰۰ پی‌پی‌ام آنتی‌اکسیدان سنتزی (BHT و BHA) می‌باشد. پس ترکیبات آنتی‌اکسیدانی که در منابع گیاهی وجود دارند با کاهش سرعت اکسیداسیون چربی‌ها موجب بهبود ارزش تغذیه‌ای مواد غذایی می‌شوند. از آنجا که استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی به دلیل سمیت و خطراتی که برای بدن موجودات زنده دارند باید محدودتر گردد. بنابراین گرایش به سمت استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی موجود در منابع طبیعی ایجاد شده است.

در کشور ما به دلیل وجود باغات متعدد گردو، توجه به صنایع تبدیلی این محصول کشاورزی از جایگاه ویژه‌ای

¹ Longan

خانی و همکاران، ۱۳۸۸). توان میکروویو ۲۷۰ وات و مدت زمان پرتودهی برای حلال‌های آلی ۲، ۴، ۶ و ۸ دقیقه و برای آب ۳، ۶ و ۹ دقیقه بود که این زمان‌ها به کمک روش آزمون و خطا حاصل گشت. سپس عصاره‌ها با کاغذ صافی واتمن شماره یک فیلتر شدند. عصاره‌های حاصل از حلال‌های آلی ابتدا توسط تبخیرکننده چرخشی و سپس با خشک‌کن انجمادی و عصاره‌های آبی فقط با خشک‌کن انجمادی خشک شدند.

- اندازه گیری ترکیبات فنولی

میزان کل ترکیبات فنولی با روش رنگ‌سنجی فولین سیوکالتو در طول موج ۷۶۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت (Arabshahi-Delouee & Urooj, 2007). اسیدگالیک به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون به کار رفت و میزان آن براساس معادل گالیک‌اسید در گرم وزن خشک بیان شد.

- ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی با روش‌های مختلف
ارزیابی فعالیت مهار رادیکال آزاد دی پی پی اچ^۱: ابتدا ۳ میلی‌لیتر عصاره در متانول ۸۰٪ با ۱ میلی‌لیتر از محلول متانولی یک میلی‌مولار DPPH مخلوط شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در مکانی تاریک نگهداری و در نهایت جذب آن در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد (Li et al., 2005).

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها به روش قدرت احیا کنندگی^۲: یک میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره با ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات و ۲/۵ میلی‌لیتر فری‌سیانیدپتاسیم مخلوط و به مدت نیم ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. سپس ۲/۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید اضافه و نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه (۱۷۰۰g) سانتی‌فریوژ (ساخت سنتوریون کانادا مدل کا ۲۰۴۲) گردید. پس از آن، ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول رویی با ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر کلرید آهن (III) مخلوط گردید و جذب آن در طول موج ۷۰۰ نانومتر خوانده شد (Arabshahi-Delouee & Urooj, 2007).

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها به روش

برخوردار بوده و باید در تولید محصولات جدید از گردو گام برداشت. پوسته سبز گردو ماده خام ارزان قیمتی می‌باشد که می‌تواند به عنوان منبع مفیدی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به کار رود. هدف از این تحقیق بررسی قدرت آنتی‌اکسیدانی پوسته گردو می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق پوسته گردو واریته شه‌میرزادی در مرداد ۸۸ از مرکز جهاد کشاورزی مازندران تهیه شد. پس از برداشت گردو، پوسته‌ها با چاقو جدا گردید و در آون (ساخت شرکت ممرت آلمان مدل ۸۰۰-۱۰۰) ۵۰ درجه سانتی‌گراد خشک شده و با آسیاب ساخت شرکت ایران خودساز تا مش ۴۰ خرد و سپس در کیسه‌های محافظ به رطوبت در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

- استخراج ترکیبات فنولی

استخراج غرقابی: ۱۰ گرم پوسته خشک شده گردو با نسبت ۱۰:۱ با حلال (متانول ۸۰٪، اتانول ۵۰٪، آب با دمای محیط و آب داغ (درون آون با دمای ثابت ۹۵ درجه)) مخلوط شدند. بعد از طی مدت زمان استخراج (۶، ۱۲، ۱۸ و ۲۴ ساعت) عصاره‌ها با کاغذ صافی واتمن شماره یک فیلتر شدند. عصاره‌های الکلی ابتدا توسط تبخیرکننده چرخشی (ساخت کشور آلمان مدل‌ای کا آوری ۱۰) در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تا خروج کامل حلال استخراجی تغلیظ شده و سپس با خشک‌کن انجمادی (اپران مدل اف دی بی ۵۵۰۳) خشک شدند. عصاره‌های آبی فقط با خشک‌کن انجمادی خشک و برای آزمایشات بعدی در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج ترکیبات فنولی به کمک امواج میکروویو: در

این روش ۵ گرم نمونه با نسبت ۲۰:۱ با حلال (متانول ۸۰٪، اتانول ۵۰٪ و آب) مخلوط شده و در فلاسک مخصوص قرار گرفته و در یک میکروفر خانگی که اصلاحاتی روی آن انجام شده بود تحت پرتودهی قرار گرفتند. این اصلاحات شامل اضافه کردن یک همزن مغناطیسی با قابلیت تنظیم دورچرخش، کندانسور آب، سنسور دما و کنترل زمان بر روی میکروویو بوده است (قره

¹ 2, 2'- Diphenyl 1-2- Picryl Hydrazyl

² Reducing Power Activity

استخراج عصاره پوسته گردو و بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی آن

استفاده شد.

یافته‌ها

- بررسی مقادیر ترکیبات فنولی

جدول ۱ تاثیر مدت زمان استخراج و نوع حلال را بر میزان ترکیبات فنولی کل عصاره حاصل از استخراج سنتی نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود آب داغ بیشترین مقدار ترکیبات فنولی را استخراج کرد. زمان استخراج نیز تاثیر معنی‌داری روی میزان استخراج ترکیبات فنولی کل داشت. در آب داغ بعد از زمان ۱۸ ساعت کاهش در مقدار ترکیبات فنولی مشاهده شده است. دلیل آن را می‌توان این‌گونه توجیه کرد که دما پایداری ترکیبات فنولی را به علت تجزیه آنزیمی یا تجزیه حرارتی تحت تاثیر قرار می‌دهد یا در اثر تبخیر مقدار ترکیبات فنولی کاهش می‌یابد. ظاهراً تجزیه حرارتی مهم‌ترین مکانیسم در کاهش مقدار پلی‌فنول‌ها محسوب می‌گردد.

جدول ۲ تاثیر مدت زمان استخراج و نوع حلال را بر میزان ترکیبات فنولی کل پوسته حاصل از استخراج میکروویو را نشان می‌دهد. با افزایش زمان پرتودهی مقدار ترکیبات فنولی افزایش یافته است که در برخی موارد معنی‌دار بوده است. در استخراج میکروویو در میان حلال‌ها، متانول ۸۰٪ بهترین حلال و آب ضعیف‌ترین آن بوده است. مقدار فنول کل در روش استخراج به کمک میکروویو بیشتر از روش غرقابی است. زمان‌های آورده شده در جدول ۲ که مربوط به استخراج به کمک میکروویو است براساس آزمون و خطا بدست آمده است. بنابراین زمان‌های مختلفی برای حلال‌های آلی و آب آورده شده است.

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل^۱: یک‌دهم میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره در حلال‌های استخراجی و ۱ میلی‌لیتر از معرف (مخلوطی از اسیدسولفوریک ۰/۶ مولار، فسفات سدیم ۲۸ میلی‌مولار و مولیدات آمونیوم ۴ میلی‌مولار) را در لوله اپندروف ریخته و به مدت ۹۰ دقیقه در بن‌ماری (ساخت شرکت فن آزما گستر ایران) ۹۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری و جذب در طول موج ۶۹۵ نانومتر در برابر یک نمونه بلانک قرائت گردید. نمونه بلانک حاوی ۱ میلی‌لیتر محلول معرف و ۰/۱ میلی‌لیتر حلال استفاده شده بود (Prieto *et al.*, 1995).

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها در به تاخیر انداختن اکسیداسیون روغن سویا: عصاره‌های متانولی پوسته گردو که به روش امواج میکروویو استخراج شدند در سه سطح غلظت (۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام) و آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی BHT و BHA در دو سطح غلظت (۱۰۰ و ۲۰۰ پی‌پی‌ام) به روغن سویای تصفیه شده و بدون آنتی‌اکسیدان و اسیدسیتریک اضافه و به مدت ۱۶ روز در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و در روزهای صفر، چهار، هشت، دوازده و شانزده عدد پراکسید (AOAC., 1990) و تیوباربیتوریک‌اسید (Goli *et al.*, 2007) آن تعیین شد.

- تجزیه و تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل نتایج از طرح کاملاً تصادفی و تجزیه واریانس (ANOVA) استفاده شد. برای مقایسه میانگین‌ها آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد مورد استفاده قرار گرفت. آنالیز آماری با نرم افزار SAS (۲۰۰۱) و برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel

جدول ۱- مقایسه میانگین مقادیر مختلف فنول کل (میلی‌گرم گالیک اسید در هر گرم وزن خشک) حاصل از استخراج سنتی در زمان‌ها و حلال‌های مختلف در پوسته رقم شه‌میرزادی*

حلال	زمان (ساعت)			
	۶	۱۲	۱۸	۲۴
متانول ۸۰٪	۲۶/۳۳±۰/۶۳ ⁱ	۲۷/۶۸±۰/۲۳ ^{ij}	۳۲/۱۹±۰/۳۱ ^{hi}	۳۵/۴۴±۰/۲۱ ^{gh}
اتانول ۵۰٪	۳۹/۳۸±۰/۶۶ ^{fg}	۴۴/۲۲±۰/۷۶ ^{de}	۴۷/۷۹±۰/۸۸ ^{cd}	۴۹/۶۳±۰/۶۳ ^{bc}
آب داغ (۹۵ °C)	۴۶/۱۰±۰/۴۴ ^{cd}	۵۲/۵۱±۰/۳۲ ^{ab}	۵۵/۶۲±۰/۸۵ ^a	۴۲/۶۱±۰/۴۶ ^{ef}
آب محیط (۳۰ °C)	۳۷/۷۶±۰/۴۷ ^{ij}	۲۸/۳۵±۰/۶ ^j	۳۲/۱۸±۰/۴ ^{ih}	۳۵/۴۷±۰/۱۴ ^{hg}

* حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

¹ Total Antioxidant Activity

جدول ۲- مقایسه میانگین مقادیر مختلف فنول کل (میلی گرم گالیک اسید در هر گرم وزن خشک) حاصل از استخراج به کمک امواج مایکروویو در زمان‌ها و حلال‌های مختلف در پوسته واریته شه‌میرزادی*

حلال	زمان (دقیقه)					
	۹	۸	۶	۴	۳	۲
متانول ۸۰٪	-	78/14 ± 0/86 ^a	76/76 ± 0/87 ^a	68/15 ± 0/61 ^b	-	57/39 ± 1/01 ^{cd}
اتانول ۵۰٪	-	58/05 ± 0/79 ^c	57/47 ± 0/7 ^c	56/47 ± 0/26 ^c	-	48/37 ± 0/95 ^d
آب	56/59 ± 0/7 ^{cd}	-	53/38 ± 0/61 ^{cd}	-	51/12 ± 0/5 ^{cd}	-

*حروف غیر مشابه بیانگر اختلاف معنی دار در سطح ۰/۰۵ است.

آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT، در همه غلظت‌ها فعالیت آنتی‌رادیکالی بالاتری نسبت به عصاره‌ها داشت و آنتی‌اکسیدان سنتزی BHA در غلظت‌های پایین فعالیت آنتی‌رادیکالی پایینی داشت (نمودار ۱). در استخراج مایکروویو در بین عصاره‌ها عصاره اتانولی بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی داشت. در غلظت‌های پایین فعالیت مهارکنندگی عصاره‌ها بیشتر از BHA بود اما در عصاره اتانولی در اکثر غلظت‌ها فعالیت بالاتری از BHA مشاهده شد. در عصاره اتانولی در غلظت‌های پایین فعالیت مهاری بهتری از BHT مشاهده شد (نمودار ۲). معمولاً برای مقایسه فعالیت ضدرادیکالی عصاره‌های مختلف از فاکتوری تحت عنوان EC₅₀ استفاده می‌گردد. طبق تعریف EC₅₀ به غلظتی از عصاره اطلاق می‌گردد که در آن ۵۰٪ از رادیکال‌های آزاد DPPH موجود در محیط واکنش مهار شوند. بنابراین هرچه این غلظت کمتر باشد نشان‌دهنده فعالیت آنتی‌رادیکالی بالاتر عصاره‌هاست. این نتایج در جدول ۳ آورده شده است.

در استخراج سنتی کمترین میزان EC₅₀ و در نتیجه فعالیت آنتی‌رادیکالی بالاتر در بین عصاره‌ها مربوط به عصاره آبی می‌باشد که بیانگر بالا بودن مقدار فنول کل آن می‌باشد. عصاره آبی مقدار EC₅₀ معادل BHA و بیشتر از BHT داشت. در استخراج با کمک امواج مایکروویو عصاره اتانولی در بین عصاره‌ها دارای کمترین مقدار EC₅₀ می‌باشد و این عصاره از آنتی‌اکسیدان سنتزی BHA بهتر عمل کرده است.

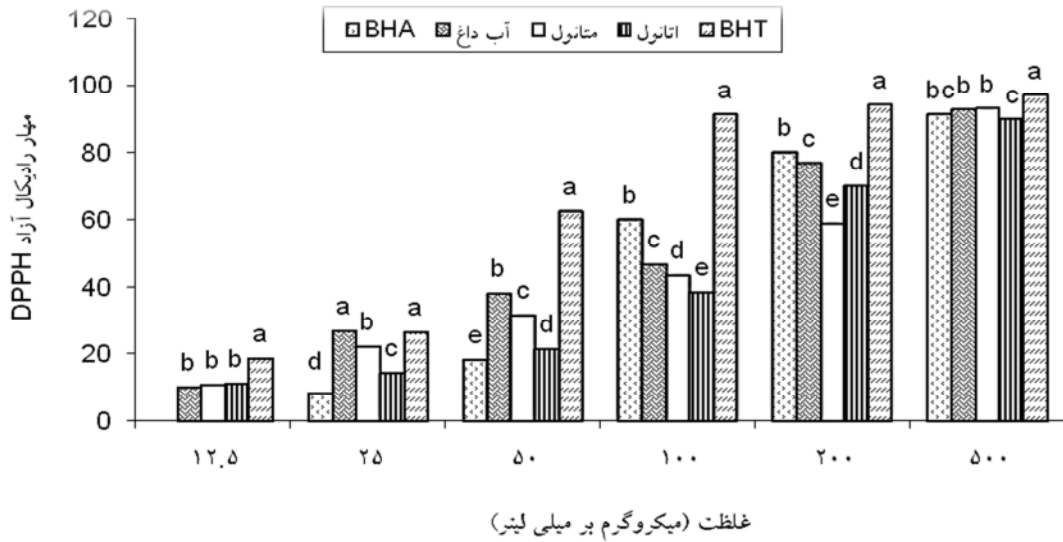
بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های حاصل از پوسته سبز گردو

همانطور که در بالا شرح داده شده است استخراج عصاره‌ها در زمان‌های مختلف انجام و میزان ترکیبات فنولی آنها سنجش شده است. حال برای بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های استخراج شده در زمان‌های مختلف، عصاره‌ای انتخاب می‌گردد که در آن زمان بالاترین مقدار ترکیبات فنولی استخراج شده است و به عنوان عصاره برتر برای بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی مورد سنجش قرار می‌گیرد. در استخراج غرقابی برای حلال‌های آلی از عصاره‌ای که در مدت زمان ۲۴ ساعت استخراج شده است برای بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی استفاده شده است ولی برای عصاره آب داغ از عصاره‌ای که در مدت ۱۸ ساعت تحت استخراج بوده استفاده شد. در استخراج به کمک امواج مایکروویو نیز در مورد عصاره‌های حاصل از حلال‌های آلی از عصاره حاصل از زمان ۸ دقیقه و برای عصاره آبی از عصاره حاصل از ۹ دقیقه استخراج استفاده شده است.

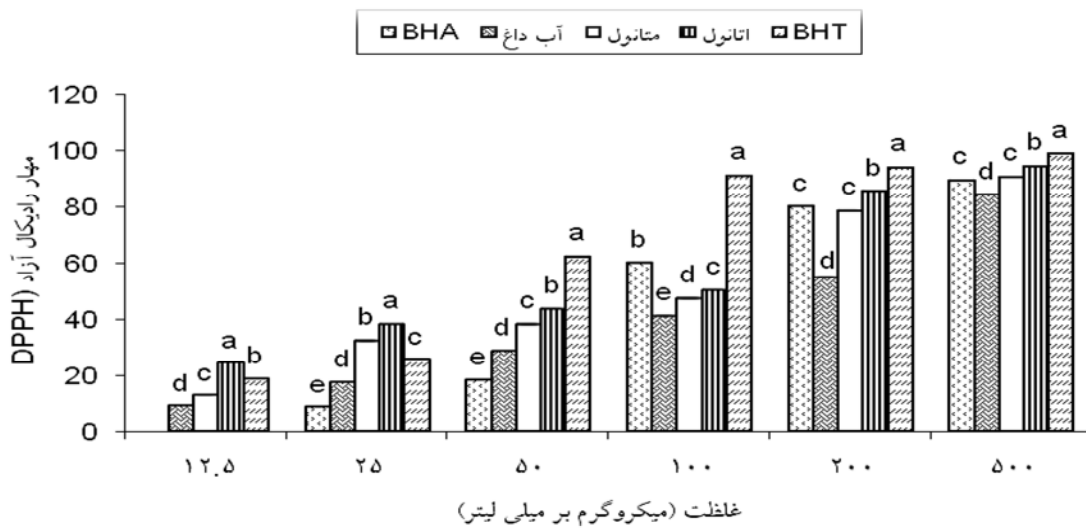
بررسی توانایی مهار رادیکال آزاد DPPH

نمودارهای ۱ و ۲ میزان کاهش جذب محلول DPPH را در حضور غلظت‌های مختلف عصاره نشان می‌دهد. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که نوع و غلظت عصاره‌ها تاثیر معنی‌داری روی مهار رادیکال آزاد DPPH در سطح ۰/۰۵ دارد (p < 0/05). فعالیت آنتی‌رادیکالی در هر سه عصاره و در هر دو روش وابسته به غلظت بود. در استخراج غرقابی

استخراج عصاره پوسته گردو و بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی آن



نمودار ۱- مقایسه میانگین درصد مهار DPPH در غلظت‌های مختلف عصاره (استخراج غرقابی) و آنتی اکسیدان‌های سنتزی



نمودار ۲- مقایسه میانگین درصد مهار DPPH در غلظت‌های مختلف عصاره (استخراج مایکروویو) و آنتی اکسیدان‌های سنتزی

جدول ۳- مقایسه میانگین مقادیر مختلف EC₅₀ (میکروگرم در هر میلی لیتر) عصاره پوسته شهمیرزادی حاصل از استخراج غرقابی و مایکروویو در آزمون‌های مختلف

BHT	BHA	عصاره آب داغ	عصاره اتانولی	عصاره متانولی	استخراج	EC ₅₀
۳۵/۸۷ ^c	۸۵/۷۳ ^b	۸۴/۷۷ ^b	۱۰۱/۴۹ ^a	۹۶/۵۴ ^a	غرقابی	مهار رادیکال DPPH
۳۵/۸۷ ^d	۸۵/۷۳ ^c	۱۶۵/۲۸ ^a	۸۱/۴۳ ^c	۱۰۷/۹۱ ^b	مایکروویو	نیروی
۵۴/۶۳ ^e	۱۶۸/۶۶ ^d	۵۱۷/۷۰ ^a	۲۱۳/۷۶ ^c	۲۹۲/۴۶ ^b	غرقابی	احیاکنندگی
۵۴/۶۳ ^d	۱۶۸/۶۶ ^c	۴۷۸/۰۰ ^a	۱۵۹/۱۶ ^c	۳۲۵/۶۶ ^b	مایکروویو	ظرفیت آنتی-
۹۹/۱۹ ^e	۱۵۸/۲۳ ^c	۲۶۵/۸۸ ^a	۱۸۵/۸۱ ^b	۱۴۸/۹۹ ^d	غرقابی	اکسیدانی کل
۹۹/۱۹ ^b	۱۵۸/۲۳ ^a	۹۵/۵۶ ^c	۸۰/۴۹ ^d	۷۱/۲۶ ^e	مایکروویو	

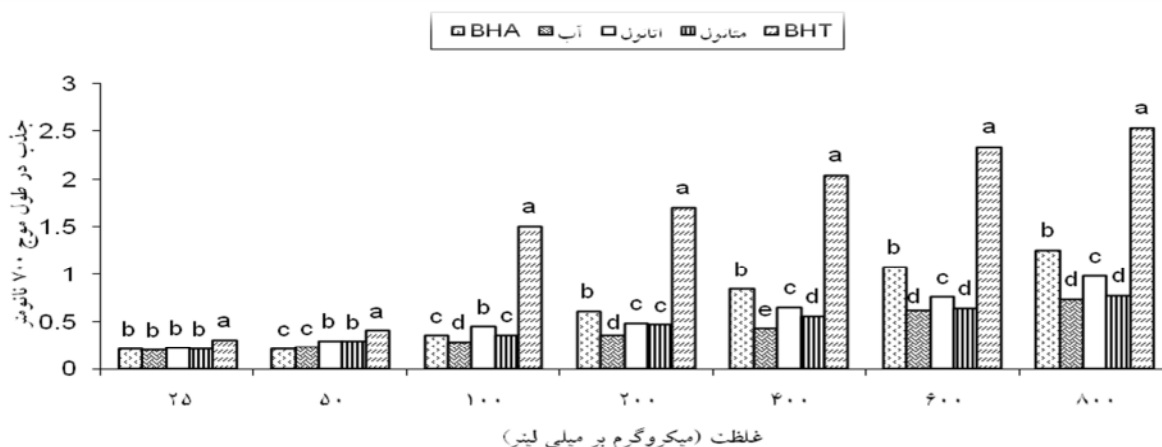
حروف غیرمشابه در هر سطر بیانگر اختلاف معنی دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.

بررسی نیروی احیاکنندگی

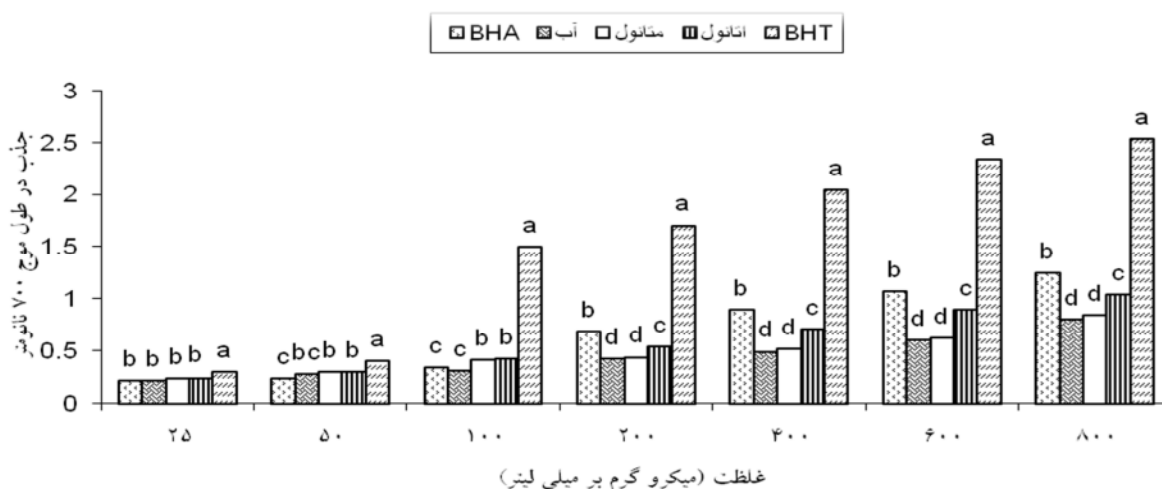
نمودارهای ۳ و ۴ مقایسه میانگین نیروی احیاکنندگی از غلظت های مختلف عصاره آبی و الکلی را نشان می دهد. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که تاثیر نوع حلال و غلظت روی نیروی احیاکنندگی عصاره ها و در نتیجه فعالیت آنتی اکسیدانی آنها معنی دار است ($p < 0.05$). در روش غرقابی در هر سه عصاره با افزایش غلظت، نیروی احیاکنندگی عصاره ها افزایش یافت. در میان عصاره ها، عصاره اتانولی بالاترین نیروی احیاکنندگی را دارا بود. عصاره اتانولی در غلظت های پایین نیروی احیاکنندگی بالاتری نسبت به BHA داشتند (نمودار ۳). در استخراج مایکروویو عصاره اتانولی بالاترین نیروی احیاکنندگی را دارا بود. در غلظت های پایین نیروی احیاکنندگی عصاره های

اتانولی و متانولی و آبی بهتر از BHA بوده است (نمودار ۴).

معمولا برای مقایسه نیروی احیاکنندگی عصاره های مختلف از فاکتوری تحت عنوان EC_{50} استفاده می گردد. طبق تعریف EC_{50} به غلظتی از عصاره اطلاق می گردد که در طول موج ۷۰۰ نانومتر جذبی معادل ۰/۵ داشته باشد. بنابراین هر چه این غلظت کمتر باشد نشان دهنده نیروی احیاکنندگی بالاتر عصاره ها و در نتیجه فعالیت آنتی اکسیدانی بهتر آنهاست که به دلیل وجود ترکیبات فنولی می باشد. در استخراج سستی در بین عصاره ها کمترین مقدار EC_{50} مربوط به عصاره اتانولی بود. در استخراج با مایکروویو بالاترین نیروی احیاکنندگی مربوط به عصاره اتانولی بود که اختلاف معنی داری با BHA نداشت.



نمودار ۳- مقایسه میانگین نیروی احیاکنندگی از غلظت های مختلف عصاره آبی و الکلی (غرقابی) و آنتی اکسیدان های سنتزی



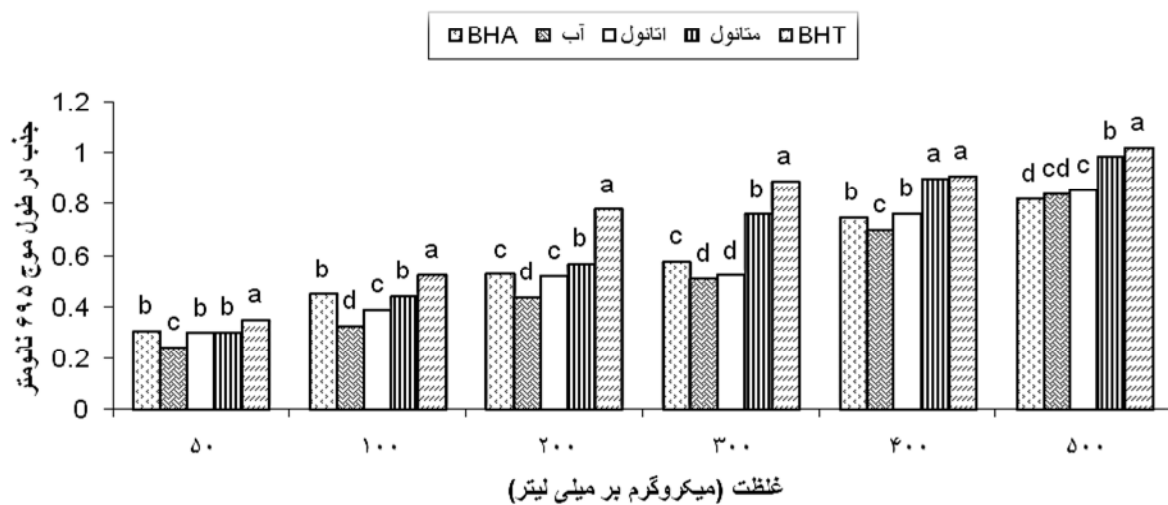
نمودار ۴- مقایسه میانگین نیروی احیاکنندگی از غلظت های مختلف عصاره آبی و الکلی (مایکروویو) و آنتی اکسیدان های سنتزی

استخراج عصاره پوسته گردو و بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی آن

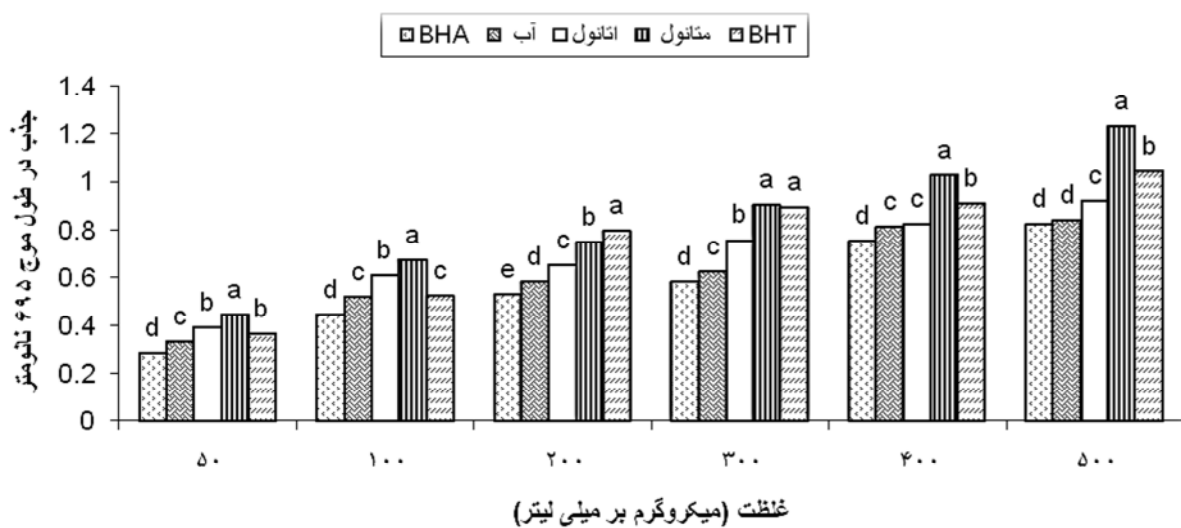
- بررسی ظرفیت آنتی اکسیدانی کل

همانطور که در نمودارهای ۵ و ۶ مشاهده می شود نتایج آنالیز واریانس نشان داد که اختلاف معنی داری بین ظرفیت آنتی اکسیدانی وجود دارد ($p < 0.05$). هر سه عصاره ظرفیت آنتی اکسیدانی وابسته به غلظت را نشان دادند. در هر دو روش عصاره متانولی بالاترین ظرفیت آنتی اکسیدانی کل را داشت. در روش میکروویو آنتی اکسیدان سنتزی BHA کمترین ظرفیت آنتی اکسیدانی کل را دارا بود که قابل رقابت با عصاره ها نبود. در روش میکروویو عصاره متانولی در اکثر غلظت ها فعالیت بالاتری از BHT داشت.

معمولاً برای مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانی کل عصاره های مختلف از فاکتوری تحت عنوان EC_{50} استفاده می گردد. هرچه این غلظت کمتر باشد نشان دهنده فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتر عصاره ها است که در جدول ۳ آورده شده است. در استخراج سنتی کمترین مقدار EC_{50} و در نتیجه ظرفیت آنتی اکسیدانی بالاتر مربوط به عصاره متانولی بود. این عصاره EC_{50} کمتری از BHA و بیشتری از BHT داشت. در استخراج به کمک امواج میکروویو عصاره متانولی کمترین EC_{50} را دارا بود. همچنین تمامی عصاره ها EC_{50} کمتری نسبت به BHA داشتند.



نمودار ۵- مقایسه میانگین ظرفیت آنتی اکسیدانی کل غلظت های مختلف عصاره (استخراج غرقابی) و آنتی اکسیدان های سنتزی



نمودار ۶- مقایسه میانگین ظرفیت آنتی اکسیدانی کل غلظت های مختلف عصاره (استخراج میکروویو) و آنتی اکسیدان های سنتزی

اندیس اسید تیوباریتوریک

با توجه به مقادیر اندیس تیوباریتوریک اسید ارائه شده در جدول ۴ نیز مشخص شد که نمونه شاهد دارای بالاترین مقدار این اندیس بود که اختلاف معنی داری با همه تیمارها داشته است. غلظت ۲۵۰ عصاره تفاوت معنی داری با BHA-100 نداشته است. غلظت ۵۰۰ بهتر از BHA-100 عمل کرده و تفاوت معنی داری با BHA-200 و BHT-100 نداشته است. غلظت ۱۰۰۰ عصاره بهتر از BHA در هر دو غلظت عمل کرده است و تفاوت معنی داری با BHT-100 و BHT-200 نداشته است. با افزایش زمان نگهداری نمونه‌های روغن در شرایط اکسیداسیون، میزان عدد پراکسید و تیوباریتوریک اسید افزایش یافته است (نمودارهای ۷ و ۸).

- بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی در به

تاخیر انداختن اکسیداسیون روغن سویا

اندیس پراکسید

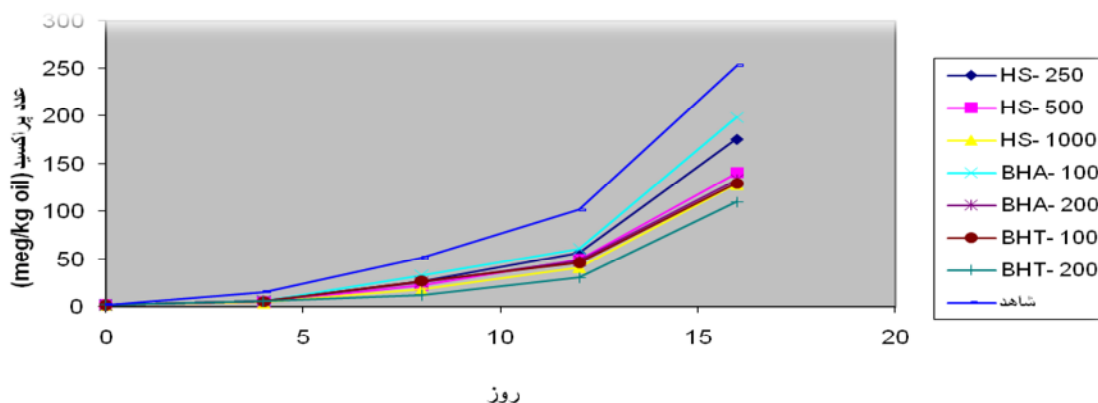
با توجه به جدول ۴ در بررسی میانگین اعداد پراکسید در مجموع روزهای مورد مطالعه (که به طور معمول برای بررسی میزان اکسیداسیون روغن در روزهای مختلف استفاده می‌شود) مشخص شد که نمونه شاهد دارای بالاترین مقدار اعداد پراکسید بوده است. همه آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی بهتر از آنتی‌اکسیدان سنتزی BHA (در غلظت ۱۰۰ پی‌پی‌ام) توانستند از اکسیداسیون جلوگیری کنند. غلظت ۱۰۰۰ عصاره بهتر از این دو آنتی‌اکسیدان عمل کرده است. مقدار پراکسید روغن اولیه بسیار ناچیز بوده و صفر در نظر گرفته شده است.

جدول ۴- مقایسه میانگین اعداد پراکسید و تیوباریتوریک اسید در مجموع روزهای چهارم، هشتم، دوازدهم و شانزدهم برای

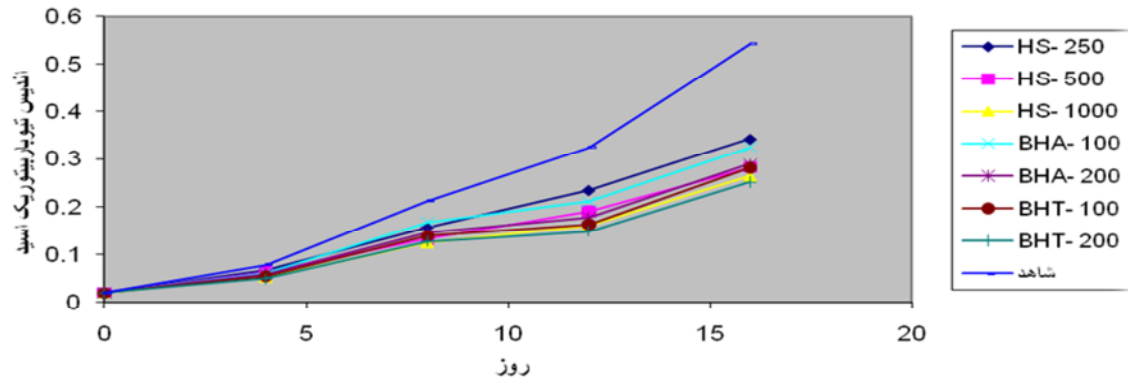
هر تیمار در سه تکرار

تیمار	عدد پراکسید (میلی اکی والان در ۱۰۰۰ گرم روغن)	عدد تیوباریتوریک اسید
نمونه کنترل	۱۰۶/۱۳ ^a	۰/۲۸۹ ^a
غلظت ۲۵۰	۶۵/۷۹ ^c	۰/۱۹۴ ^b
غلظت ۵۰۰	۵۴/۲۸ ^d	۰/۱۶۲ ^c
غلظت ۱۰۰۰	۴۷/۷۷ ^e	۰/۱۴۵ ^{de}
BHA-100	۷۳/۸۳ ^b	۰/۱۸۵ ^b
BHA-200	۵۳/۰۴ ^d	۰/۱۶۳ ^c
BHT-100	۵۱/۶۷ ^d	۰/۱۵۳ ^{cd}
BHT-200	۳۹/۴۷ ^f	۰/۱۳۷ ^e

حروف غیرمشابه در هر ستون بیانگر اختلاف معنی دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشد



شکل ۷- مقایسه میانگین اعداد پراکسید روغن‌های حاوی عصاره در روزهای مختلف و همچنین مقایسه آنها با روغن‌های حاوی آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی و نمونه شاهد



نمودار ۸- مقایسه میانگین اندیس تیوباربیتریک اسید (میلی گرم مالون آلدهید در هر کیلوگرم روغن) روغن های حاوی عصاره

بحث

- مقادیر ترکیبات فنولی

همان طور که مشاهده می شود با روش غرقابی استخراج حلال آب داغ بیشترین مقدار ترکیبات فنولی را استخراج کرد در واقع درجه قطبیت حلال های مختلف میزان استخراج ترکیبات فنولی را تحت تاثیر قرار می دهد. ترکیبات فنولی عصاره های حاصل از حلال های مختلف از نظر مقدار ترکیبات فنولی کل، نوع ترکیبات استخراج شده و میزان فعالیت آنتی اکسیدانی متفاوتند. مقدار فنول کل در آب داغ نسبت به آب با دمای محیط بالاتر بوده است که دلیل آن را می توان این گونه تفسیر کرد که دمای بالا موجب نفوذ بهتر حلال به درون ماتریکس و حلالیت بالاتر ترکیبات فنولی در حلال می گردد (Sutivisedsak et al., 2010). در واقع آب داغ برخی از پلی ساکاریدهای پکتیکی را از دیواره سلولی استخراج می کند و موجب شکستن دیواره سلولی می گردد. در نتیجه حلال آب در تماس با مواد فنولی قرار می گیرد و بازایی ترکیبات فنولی بهبود می یابد (Li et al., 2006). افزایش دما همچنین کشش سطحی و ویسکوزیته حلال را کاهش داده و سرعت انتشار و سرعت انتقال جرم را در حین استخراج افزایش می دهد (Ramos et al., 2002). همان طور که مطرح شد زمان استخراج نیز تاثیر معنی داری روی میزان استخراج ترکیبات فنولی کل داشت. زیرا با گذشت زمان حلال فرصت پیدا می کند که به درون بافت گیاهی نفوذ کرده و ترکیبات فنولی نیز فرصت کافی برای جدا شدن از ماتریکس و ورود به حلال داشته باشند (Spigno et al., 2007). با افزایش زمان استخراج میزان ترکیبات فنولی در عصاره های الکلی و

عصاره آبی با دمای محیط افزایش می یابد. اما این روند افزایشی در مورد عصاره آب داغ تا زمان ۱۸ ساعت مشاهده شد و بعد از آن یک روند کاهشی را شاهد بودیم. دلیل آن را می توان این گونه توجیه کرد که دما پایداری ترکیبات فنولی را به علت تجزیه آنزیمی یا تجزیه حرارتی تحت تاثیر قرار می دهد یا در اثر تبخیر مقدار ترکیبات فنولی کاهش می یابد. همچنین دلیل آن را می توان این گونه توجیه کرد که دما پایداری ترکیبات فنولی را به علت تجزیه آنزیمی یا تجزیه حرارتی تحت تاثیر قرار می دهد یا در اثر تبخیر مقدار ترکیبات فنولی کاهش می یابد. ظاهراً تجزیه حرارتی مهم ترین مکانیسم در کاهش مقدار پلی فنول ها محسوب می گردد. Zhang و همکاران (۲۰۱۰) ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره اتانولی بافت های مختلف (پوست، دانه، پالپ) عنب چینی را بررسی کردند. نتایج نشان داد که در همه رقم ها پوست دارای بالاترین میزان فعالیت آنتی-اکسیدانی و در نتیجه بالاترین مقدار ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و آنتوسیانین می باشد.

در استخراج به کمک امواج میکروویو قطبیت حلال بسیار مهم است. حلال های قطبی معمولاً بهتر از انواع غیرقطبی عمل می کنند. بهتر است حلالی انتخاب گردد که علاوه بر داشتن ثابت دی الکتریک بالا، فاکتور اتلاف بالایی هم داشته باشد تا توزیع گرما در سرتاسر ماتریکس تسهیل گردد. متانول ضریب دی الکتریک بالا و فاکتور اتلاف مناسب تری نسبت به آب و اتانول دارد و بنابراین بهتر از اتانول و آب جواب داده است (Proestos & Komaitis, 2008).

- بررسی توانایی مهار رادیکال آزاد DPPH

در آزمون DPPH، رادیکال‌های DPPH با آنتی‌اکسیدان‌ها یا دیگر گونه‌های رادیکالی واکنش داده و مقدار آنها کاهش می‌یابد. گروه‌های هیدروکسیل با دادن هیدروژن، رادیکال‌های DPPH را از رنگ بنفش تیره به زرد روشن تبدیل می‌کنند. عصاره پوسته گردو سرشار از ترکیبات فنولی می‌باشد. این ترکیبات به دلیل داشتن گروه‌های هیدروکسیل، توانایی خنثی سازی رادیکال‌های آزاد را دارند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولی به تعداد گروه هیدروکسیل در حلقه آروماتیک آنها بستگی دارد (Zhang *et al.*, 2009). تغییر در قطبیت حلال، توانایی آن حلال را در حل کردن یک گروه خاص از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی تغییر می‌دهد و ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی را تحت تاثیر قرار می‌دهد. همبستگی منفی بین مقدار فنول کل و مقادیر EC₅₀ در آزمون مهار رادیکال آزاد DPPH نشان‌دهنده شرکت مستقیم فنول‌ها در این فعالیت می‌باشد. فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH در غلظت‌های بالا به حالت اشباع‌شدگی می‌رسد (Rumbaoa *et al.*, 2009). تفاوت در فعالیت آنتی‌رادیکالی عصاره‌های مختلف را به دلایل مختلف می‌توان نسبت داد. موقعیت گروه‌های هیدروکسیل فنولی، حضور گروه‌های عاملی دیگر در ملکول کامل مانند پیوندهای دوگانه و ترکیب گروه‌های هیدروکسیل و گروه‌های کتون نقش مهمی در فعالیت آنتی‌اکسیدانی ایفا می‌کند. همچنین تفاوت در نوع و مقدار ترکیبات موثر موجود در آنها نیز در فعالیت آنتی‌اکسیدانی موثر است. اطلاعات بدست آمده روشن کرد که عمل عصاره‌ها به عنوان مهار کننده رادیکال آزاد می‌باشد.

- بررسی نیروی احیاکنندگی

ویژگی احیاکنندگی در ارتباط با حضور احیا کننده‌ها می‌باشد که نشان می‌دهد فعالیت آنتی‌اکسیدانی این عصاره‌ها در نتیجه شکست زنجیره‌ای رادیکال آزاد توسط دادن یک اتم هیدروژن می‌باشد (et al., 2008). Barreira). نیروی احیاکنندگی شامل انتقال الکترون تنها توسط آنتی‌اکسیدان‌ها به عنوان یک عامل احیاکننده در واکنش اکسایش کاهش مرتبط با روش رنگ‌سنجی می‌باشد (Yang *et al.*, 2002). وجود ردکتون‌ها کلید

مقدار فنول کل در روش استخراج به کمک مایکروویو بیشتر از روش غرقابی است. زیرا دیواره سلولی مواد گیاهی که حاوی اندکی رطوبت هستند بعد از در معرض‌گیری با گرمای مایکروویو، انرژی مایکروویو را جذب کرده و نهایتاً تبدیل به حرارت می‌گردند و رطوبت شروع به تبخیر می‌کند. تبخیر آب، موجب ایجاد فشار در دیواره سلولی گشته که نهایتاً موجب گسیختگی و پاره شدن سلول می‌گردد و ترکیبات فعال به درون حلال احاطه کننده وارد می‌شود و بازده استخراج بهبود می‌یابد (Mandal *et al.*, 2007). همچنین در استخراج به کمک امواج مایکروویو انرژی مایکروویو از طریق برهم‌کنش ملکولی با میدان الکترومغناطیسی انتقال می‌یابد و بنابراین یک فرایند انتقال سریع انرژی به حلال استخراج و مواد خام گیاهی می‌باشد. به‌علاوه برهم‌کنش مستقیم امواج مایکروویو با حلال منجر به شکافت سلول‌های گیاهی و رهایی سریع محصولات درون‌سلولی به حلال می‌گردد (Lay-Keow & Michel, 2003). ملکول‌های قطبی (مانند پلی‌فنول‌ها) و محلول‌های یونی انرژی مایکروویو را به شدت جذب می‌کنند. زیرا آنها یک گشتاور دوقطبی ثابت دارند. این امر موجب افزایش سریع دما و تکمیل سریع واکنش می‌گردد (Proestos & Komaitis, 2008). در مقایسه بین این دو روش، نوع حلال مصرفی بسیار مهم است. در استخراج غرقابی، قابلیت استخراج حلال‌های مختلف اساساً بستگی به محلولیت ترکیب موردنظر در حلال، سینتیک انتقال جرم محصول و قدرت برهم‌کنش ماتریکس و ماده حل‌شونده دارد. در حالیکه در روش استخراج به کمک امواج مایکروویو شدت گرمادهی نقش مهمی در کارایی استخراج دارد. به منظور گرم شدن سریع تحت اشعه‌دهی با مایکروویو، حلال باید ثابت دی‌الکتریک و افت دی‌الکتریک بالا داشته باشد (Spigno & De Faveri, 2009). بنابراین حلال بهینه در دو روش استخراج با یکدیگر تفاوت دارد. در تحقیقی که توسط De Faveri و Spigno (۲۰۰۹) روی استخراج پلی‌فنول‌ها از چای سیاه به کمک امواج مایکروویو صورت گرفت نشان داده شده است که غلظت فنول‌ها بعد از ۹۰ ثانیه پرتودهی، ۴۳/۷٪ بالاتر از مقدار بدست آمده بعد از ۲۱۰ ثانیه خیساندن غرقابی بوده است.

مختلف هستند بنابراین در هر روش انوعی از آنها مورد شناسایی قرار می گیرد. تفاوت در فعالیت آنتی اکسیدانی در روش های مختلف (روش فولین سیوکالتیو، سنجش مهار DPPH، سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی کل و نیروی احیاکنندگی) به مقدار زیادی به طبیعت آب دوست و آب گریز فنول های موجود و نسبت آنها وابسته می باشد. سنجش DPPH به طور اساسی فعالیت آنتی اکسیدانی فنول های محلول در آب را سنجش می کند. بنابراین وقتی دو عصاره در روش DPPH نتایج مشابهی دادند نشان دهنده این است که مقدار مولکول های آب دوست مشابه دارند. روش نیروی احیاکنندگی در واقع ترکیبات احیاکننده ای را قدرت احیاکنندگی دارند را نشان می دهد. بنابراین به علت ماهیت متنوع ترکیبات آنتی اکسیدانی، فعالیت آنتی اکسیدانی با روش های مختلف بررسی شده است.

- تاثیر عصاره ها در ممانعت از اکسیداسیون روغن

از آنجاکه عصاره متانولی در روش های دیگر سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی مقدار فعالیت بالاتری نشان داده بود به عنوان نمونه برتر برگزیده روی روغن تست شد. دلیل ارائه نتایج هم به صورت جدول و هم به صورت نمودار بدین علت است که در نمودار روند افزایش عدد پراکسید را در طول دوره زمانی از روز اول تا روز ۱۶ بود. اما در جدول میانگین عدد پراکسید را برای هر تیمار نشان داده است تا نشان دهد کدام تیمار بهتر عمل کرده است و مقادیر میانگین است و با نمودار متفاوت است. با افزایش غلظت عصاره ها مهار اکسیداسیون بهتر صورت گرفته است و اعداد پراکسید و تیوباریتوریک کاهش یافته است. این اثر آنتی اکسیدانی را به محتوی فنولی عصاره ها نسبت می دهند. در واقع با افزایش غلظت، مقدار ترکیبات فنولی افزایش یافته که منجر به افزایش گروه های فعال برای مهار رادیکال آزاد می گردد. نمونه شاهد که حاوی هیچ آنتی اکسیدانی نبوده است بیشترین مقدار عدد پراکسید و تیوباریتوریک اسید را در همه روزها دارا بوده است. آنتی اکسیدان ها طی مدت زمان خاصی فعال باقی مانده و با گذشت زمان به تدریج از درجه تاثیر آنها کاسته می شود که دلیل آن می تواند نگهداشتن نمونه ها در شرایط اکسیداسیون و حرارت باشد تا زمانی که کلاً بی اثر شوند. همچنین از آنجا که مالون آلدهید از تجزیه هیدروپراکسیدها حاصل می گردد

اصلی نیروی احیاکنندگی است که فعالیت آنتی اکسیدانی را از طریق شکستن واکنش زنجیری رادیکال آزاد توسط دادن یک اتم هیدروژن انجام می دهند (Arabshahi-Delouee & Urooj, 2007). همکاران (۲۰۰۹) فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره متانولی چهار وارینه برآمدگی زیر زمینی سیب زمینی شیرین (بنگوتتا، گانزا، ایگورتا و ۱۲۵۴۱۱/۲) را بررسی کردند. در بررسی فعالیت احیاکنندگی، EC₅₀ عصاره ها به ترتیب ۷۲/۴، ۷۸/۷، ۶۹/۲ و ۶۶/۲ میلی گرم بر میلی لیتر بوده است (Rumbaoa et al., 2009).

- بررسی ظرفیت آنتی اکسیدانی کل

ظرفیت آنتی اکسیدانی کل بر مبنای کاهش مولیدن (VI) به مولیدن (V) توسط عصاره ها و تشکیل کمپلکس فسفات/ مولیدن (V) سبز رنگ در pH اسیدی می باشد. مقادیر بالاتر جذب نشان دهنده فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتر است. همانطور که مشاهده می شود این اثر با افزایش زمان واکنش و افزایش غلظت افزایش می یابد. فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره های گیاهی از ترکیبات فنولی و پلی فنولی ناشی می شود. بنابراین باید ارتباط و همبستگی نزدیکی بین مقدار ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی اکسیدانی وجود داشته باشد. Erkan و همکاران (۲۰۰۸) در بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی رزماری گزارش کردند که حلال استخراجی نیز در فعالیت آنتی اکسیدانی مهم است. مقدار فنول کل دارای همبستگی و ارتباط مستقیم با فعالیت آنتی اکسیدانی می باشد. بنابراین فعالیت آنتی اکسیدانی منعکس کننده مقدار ترکیبات فنولی است (Erkan et al., 2008). Pan و همکاران (۲۰۰۸) فعالیت آنتی اکسیدانی پوست لنگان را با اتانول ۹۵٪ و دو روش غرقابی و مایکروویو استخراج کردند. در هر دو روش عصاره فعالیت آنتی اکسیدانی بهتری نسبت به BHT از خود نشان دادند. فعالیت آنتی اکسیدانی کل در هر دو روش با افزایش زمان و افزایش غلظت افزایش یافت. همچنین فعالیت آنتی اکسیدانی کل عصاره حاصل از استخراج به کمک امواج مایکروویو بالاتر از عصاره حاصل از روش غرقابی بوده است (Pan et al., 2008).

اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی به روش های مختلف انجام گرفته است. چون عصاره ها دارای مواد فنولی از انواع

AOAC. (1990). Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists, 15th ed. Washington, DC, USA.

Ballard, T. S., Mallikarjunan, P., Zhou, K. & O'Keefe, S. (2010). Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidant compounds from peanut skins. *Food Chemistry*, 120(4), 1185-1192.

Barreira, J. C. M., Ferreira, I. C. F. R., Oliveira, 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.

Erkan, N., Ayranci, G. & Ayranci, E. (2008). Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chemistry*, 110, 76-8.

Goli, A. H., Barzegar, M. & Sahari, M. A. (2005). Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. *Food Chemistry*, 92, 521-5.

Hagen, S. F., Borge, G. I. A., Bengtsson, G. B., Bilger, W., Berge, A., Haffner, K. & Solhaug, K. A. (2007). Phenolic contents and other health and sensory related properties of apple fruit (*Malus domestica* Borkh., cv. Aroma): Effect of postharvest UV-B irradiation. *Postharvest Biology and Technology*, 45(1), 1-10.

Lay-Keow, N. & Michel, H. (2003). Effects of moisture content in cigar tobacco on nicotine extraction similarity between Soxhlet and focused open-vessel microwave-assisted techniques. *Journal of Chromatography A*, 1011, 213-219.

Li, B. B., Smith, B. & Hossain, M. M. (2006). Extraction of phenolics from citrus peels: I. Solvent extraction method. *Separation and Purification Technology*, 48(2), 182-188.

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.

Mandal, V., Mohan, Y. & Hemalatha, S. (2007). Microwave Assisted extraction- An innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Food Chemistry*, 92, 144-151.

Pan, Y., Wang, K., Huang, S., Wang, H., Mu, X., He, C., Ji, X., Zhang, J. & Huang, F. (2008). Antioxidant activity of microwave-assisted extract of longan (*Dimocarpus Longan*

بنابراین در روزهای ابتدایی مقدار تیوباربتوریک اسید پایین است. اما بعد از گذشت زمان که مقدار محصولات اولیه اکسیداسیون افزایش یافته است و شروع به تجزیه شدن کردند مقدار این اندیس افزایش می‌یابد. به طور کل عصاره پوسته سبز گردو به عنوان منبعی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی، توانایی واکنش با رادیکال‌های حاصل از اکسیداسیون لیپیدها را داشته و موجب قطع واکنش‌های زنجیری و افزایش زمان اکسیداسیون کند و کاهش سرعت اکسیداسیون خودبخودی می‌شود. Yasoubi و همکاران (۲۰۰۷) فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره پوست انار را روی روغن سویا بررسی کردند. نتایج نشان داد که عصاره استونی پوست انار در غلظت ۰/۰۵٪ اثرات آنتی‌اکسیدانی بالاتری در مقایسه با BHA و BHT در غلظت ۰/۰۲٪ داشت (Yasoubi *et al.*, 2007).

نتیجه‌گیری

این تحقیق نشان داد که پوسته سبز گردوی شه‌میرزادی دارای ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی می‌باشد. میزان ترکیبات فنولی تحت‌تاثیر حلال به کار برده شده، زمان، دما و روش استخراج می‌باشد. با افزایش زمان استخراج در اکثر موارد میزان ترکیبات فنولی افزایش یافته است. در استخراج با کمک امواج مایکروویو حلال متانول به عنوان حلال بهینه شناخته شده است. بدیهی است با استخراج ترکیبات مؤثره با کمک روش‌های بهینه استخراج مانند استخراج با کمک امواج مایکروویو می‌توان میزان ترکیبات فنولی استخراج شده را بهبود بخشید و از این ترکیبات در تولید محصولات با ارزش افزوده بالا بهره برد. از آنجا که پوسته سبز گردو از ضایعات کشاورزی و حاوی ترکیبات فنولی فراوان می‌باشد می‌تواند به عنوان منبع غنی و ارزان قیمت از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی معرفی شود.

منابع

- قره‌خانی، م.، رفیعی، ز.، قربانی، م. و جعفری، س. م. (۱۳۸۸). سیستم مایکروویو محفظه باز برای استخراج ترکیبات مؤثره از گیاهان دارویی، ۵۹۳۲۱.
- Arabshahi-Delouee, S. & Urooj, A. (2007). Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. *Food Chemistry*, 102(4), 1233-1240.

Lour.) peel. Food Chemistry, 106(3), 1264-1270.

Prieto, P., Pineda, M. & Aguilar, M. (1995). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. Analytical Biochemistry, 269, 337-341.

Proestos, C. & Komaitis, M. (2008). Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds. LWT--Food Science and Technology, 41(4), 652-659.

Ramos, L., Kristenson, E. M. & Brinkman, U. A. T. (2002). Current use of pressurised liquid extraction and subcritical water extraction in environmental analysis. Journal of Chromatography A, 975, 3-29.

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.

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

Spigno, G. & De Faveri, D. M. (2009). Microwave-assisted extraction of tea phenols:

A phenomenological study. Journal of Food Engineering, 93(2), 210-217.

Sutivisedsak, N., Cheng, H. N., Willett, J. L., Lesch, W. C., Tangsrud, R. R. & Biswas, A. (2010). Microwave-assisted extraction of phenolics from bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Food Research International, 43(2), 516-519.

Wijngaard, H. H., Rle, C. & Brunton, N. A. (2009). Survey of Irish fruit and vegetable waste and by-products as a source of polyphenolic antioxidants. Food Chemistry, 116(1), 202-207.

Yang, J. H., Lin, H. C. & Mau, J. L. (2002). Antioxidant properties of several commercial mushrooms. Food Chemistry, 77(2), 229-235.

Yasoubi, P., Barzegar, M., Sahari, M. A. & Aziz, M. A. (2007). Total phenolic content and antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract. Journal of Agricultural Science and Technology, 9, 35-42.

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.

Zhang, Z., Liao, L., Moore, J., Wu, T. & Wang, Z. (2009). Antioxidant phenolic compounds from walnut kernels (*Juglans regia* L.). Food Chemistry, 113(1), 160-165.