



ارزیابی ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره اتانولی مغز گردوی سیاه (*Juglans nigra*) از طریق اسپکتروفتومتری مرئی - فرابنفش

صدیقه مرکباتی^۱، علیرضا متولی زاده کاخکی^{۲*}، امیرحسین اسماعیلی^۳، جمشید مهرزاد^۱، راحله ژبانی^۲

^۱گروه بیوشیمی، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران

^۲گروه شیمی، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران

^۳گروه علوم آزمایشگاهی، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران

تاریخ ثبت اولیه: ۱۴۰۴/۰۶/۱۲، تاریخ دریافت نسخه اصلاح شده: ۱۴۰۴/۰۹/۱۱، تاریخ پذیرش قطعی: ۱۴۰۴/۰۹/۱۵

چکیده

هیپوتیروئیدسم یکی از مهمترین بیماری های غدد درون ریز می باشد که منجر به اختلال عملکرد هورمون های تیروئیدی می گردد. هدف این مطالعه، بررسی توانایی آنتی اکسیدانی عصاره اتانولی مغز گردوی سیاه و ارزیابی مقدار کل آنتی اکسیدان ها با استفاده از روش های اسپکتروفتومتری UV-Vis است. عصاره اتانولی مغز گردوی سیاه به عنوان منبع بالقوه ترکیبات فنولی مطرح است. به منظور تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی، از معیارستی مانند DPPH• استفاده شد و IC_{50} یا کاهش ظرفیت کل مشخص گردید. پس از استخراج با اتانول ۷۰٪، تعیین میزان محتوای فنولی کل و فلاونوئیدها انجام شد و با روش های UV-Vis با دقت و صحت مناسب اندازه گیری شد. نتایج نشان دادند که عصاره مغز گردوی سیاه دارای توان آنتی اکسیدانی قابل توجه است که با افزایش مدت زمان تماس و غلظت ماده استخراجی، افزایش می یابد.

واژه های کلیدی: آنتی اکسیدانی، عصاره اتانولی، اسپکتروفتومتر UV-Vis، مغز گردوی سیاه، DPPH

۱. مقدمه

آنتی اکسیدان ها مولکول هایی هستند که در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از رادیکال های آزاد از سلول ها و بافت ها محافظت می کنند و نقش مهمی در پیشگیری از بیماری های مزمن همچون سرطان، بیماری های قلبی و دیابت ایفا می نمایند. در سال های اخیر،

*عهده دار مکاتبات: علیرضا متولی زاده کاخکی

نشانی: گروه شیمی، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران

پست الکترونیک: amotavalizadeh@iau.ir

تلفن: ۰۵۱۴۲۶۲۱۹۰۱

افزایش توجه به منابع طبیعی آنتی اکسیدانی به ویژه عصاره‌های گیاهی مانند مغز گردوی سیاه که دارای ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی قوی است، موجب گسترش مطالعات مختلف شده است. آنتی اکسیدان‌ها نقش مهمی در خنثی سازی گونه‌های فعال اکسیژن و حفاظت از سلول‌ها در برابر آسیب‌های اکسایشی ایفا می کنند. در میان منابع طبیعی، مغز گردوی سیاه (*Juglans nigra*) یا گونه‌های مرتبط) به خاطر محتوای بالای ترکیبات فنولی، پلی فنول‌ها و فلاونوئیدها شناخته شده است. استخراج و ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی این مواد از اهمیت بالایی برخوردار است، زیرا می تواند به تولید مکمل‌های غذایی، اسانس‌ها و ترکیبات دارویی با اثرات محافظتی کمک کند.

آنتی اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که قابلیت مهار و خنثی کردن رادیکال‌های آزاد را دارند و از تخریب سلولی و آسیب‌های اکسیداتیو جلوگیری می کنند؛ بنابراین، شناسایی و ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی گیاهان دارویی و منابع طبیعی، به ویژه عصاره‌های گیاهی، از اهمیت بالایی برخوردار است. یکی از روش‌های پرکاربرد و دقیق برای سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی، استفاده از روش‌های اسپکتروفتومتری UV و UV-Vis است، که بر اساس اندازه گیری جذب نور توسط گونه‌های آنتی اکسیدانی صورت می گیرد و می تواند به صورت کمی تعیین کننده ظرفیت آنتی اکسیدانی باشد [۱]. روش‌های مختلفی مانند آزمون DPPH، FRAP، TEAC و ABTS با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Vis جهت بررسی توان آنتی اکسیدانی به کار می روند که هر یک مکانیزم‌های متفاوتی برای تعامل با رادیکال‌ها دارند و دارای مزایا و محدودیت‌های خاص خود هستند. عصاره اتانولی مغز گردوی سیاه، به دلیل ترکیبات فنولیک و فلاونوئیدی غنی، پتانسیل بالایی در مهار رادیکال‌های آزاد دارد که می توان با این روش‌ها به خوبی آن را مورد ارزیابی قرار داد [۲]. عصاره اتانولی مغز گردوی سیاه به دلیل ترکیبات پیچیده و غنی از پلی فنول‌ها، نه تنها فعالیت‌های آنتی اکسیدانی قوی دارد بلکه می تواند با انواع رادیکال‌های آزاد واکنش دهد و مانع از آسیب‌های اکسیداتیو شود. بررسی این فعالیت‌ها با استفاده از روش‌های اسپکتروفتومتری، امکان تعیین دقیق و مقایسه ظرفیت آنتی اکسیدانی این عصاره را فراهم می آورد که برای استفاده در صنایع دارویی، غذایی و آرایشی اهمیت دارد [۳ و ۴]. استفاده از اسپکتروفتومتر UV نه تنها به دلیل دقت و قابلیت سنجش سریع محبوب است، بلکه امکان بررسی میزان جذب در طول موج‌های خاص مرتبط با فعالیت آنتی اکسیدانی را فراهم می آورد، که منجر به نتایج قابل تکرار و معتبر برای تعیین ظرفیت کلی آنتی اکسیدانی عصاره‌ها می شود [۵]. علاوه بر این، پیشرفت‌های اخیر در حسگرها و نانوپروب‌های اپتیکی مبتنی بر اسپکتروفتومتری، حساسیت و انتخاب پذیری در اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی را افزایش داده‌اند و فرایند ارزیابی را سریع تر و دقیق تر کرده‌اند. این فناوری‌ها می توانند به عنوان مکمل روش‌های کلاسیک در بهبود کیفیت بررسی‌ها به کار روند [۶]. بنابراین، بهره گیری از روش‌های اسپکتروفتومتری UV برای ارزیابی توانایی آنتی اکسیدانی عصاره اتانولی مغز گردوی سیاه روشی علمی، معتبر و موثر است که در مطالعات مرتبط با خواص دارویی و تغذیه‌ای این ماده طبیعی کاربرد فراوان دارد.

ترکیبات فنلی موجود در گیاهان، مواد محافظ در برابر انواع تنش‌های متعددی هستند که می‌توانند در اثر شرایط محیطی، عوامل بیماری‌زا و صدمات ایجاد شوند. چنین تنش‌هایی به عنوان القا و تأثیر بر تولید ترکیبات فنلی شناخته شده‌اند. بنابراین، فنولیک‌ها نقش مهمی در مکانیسم‌های دفاعی گیاهان دارند. علاوه بر این، ترکیبات فیتوشیمیایی مانند فنولیک‌ها برای سلامتی (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 فنلی می‌توانند رادیکال‌های آزاد را از بین ببرند و علاوه بر فعالیت‌های ضد سرطانی توصیف شده، دارای خواص شلاته‌کننده فلزی هستند [۷]. ترکیبات فنلی دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی هستند که با جمع‌آوری و احیای گونه‌های فعال اکسیژن از اکسیداسیون مولکول‌های زیستی حیاتی سلول پیشگیری کرده و مانع بروز تنش اکسیداتیو و یا تخفیف اثرات آن در سلول‌های گیاه می‌شوند [۸]. ترکیبات فنلی به خصوص فلاونوئیدها علاوه بر اثر ضد میکروبی، به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی نیز بسیار مفید هستند. این مواد با بدام انداختن رادیکال‌های آزاد و کاهش استرس اکسیداتیو و همچنین مهار ماکرومولکول‌های اکسیداسیون خطر بیماری دژنراتیو را کم می‌کنند [۹].

فلاونوئیدها در اکثر خانواده‌های گیاهی وجود دارند. گلیکوزیدهای فلاونوئیدی که اکثراً به شکل C- گلیکوزیدی هستند تا O- گلیکوزیدی، در آب و الکل محلول و در حلال‌های آلی نامحلول می‌باشند. قسمت غیرقندی یا ژنین این ترکیبات به مقدار ناچیز در آب حل می‌شود. گروهی از فلاونوئیدها به واسطه اثرات ضدالتهابی و ضد آلرژی دارای خصوصیات ضد لخته و محافظ عروقی، مهارکنندگی ایجاد تومور و اثر محافظتی مخاط روده و معده هستند. اثرات مزبور به تأثیر فلاونوئیدها روی متابولیسم اسید آراشیدونیک نسبت داده شده است. در جدول ۱ انواع گروه‌های فلاونوئیدی را مشاهده می‌کنید. از جمله اثرات دیگر فلاونوئیدها اثرات ضد اسپاسم، ضد تومور، ضد باکتری، و ضد قارچ و خاصیت ایجاد رنگ می‌باشد [۱۰]. مکانیسم عمل فلاونوئیدها برای بروز اثر آنتی‌اکسیدانی به صورت جمع‌آوری رادیکال‌های آزادی مثل سوپراکسید، آنیون‌ها، رادیکال‌های پراکسید چربی و رادیکال‌های هیدروکسیل می‌باشد. علاوه بر این توانایی به دام اندازی اکسیژن منفرد و شلاته کردن فلزات را نیز دارند. فلاونوئیدهایی که گروه هیدروکسیل آزاد بیشتری دارند عمل جمع‌آوری رادیکال را بهتر انجام می‌دهند [۱۱].

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱. مواد شیمیایی

این رساله از مواد شیمیایی شرکت سیگما آمریکا استفاده نموده و کلیه حلال‌های به کار رفته در مطالعه، از خلوص آزمایشگاهی برخوردار بوده و از شرکت مرک آلمان تهیه شده است.

۲-۲. جمع‌آوری و استخراج اسانس

در مرحله نخست، گردوی سیاه، با تأیید کارشناس سیستماتیک گیاه‌شناسی، از حومه شهرستان بهشهر در استان مازندران جمع‌آوری گردید.

جدول ۱- انواع گروه‌های فلاونوئیدی

نوع فلاونوئید	نام ترکیب	گسترش	ساختار شیمیایی
فلاون	آپی ژنین	جعفری- گل بابونه	
فلاونول	کوئرستین	برگ سنا- کلیه برگهای سبز و پیازها- توت فرنگی- انگور	
فلاوانول	کاتشین	کاکائو	
ایزوفلاون	ژنین تئین	گل میخک- دانه سویا	
چالکون‌ها	ایزومرهای ناپایدار فلاوانون	خانواده Rutaceae و شیرین بیان	
فلاوانون	نارینجین	مرکباتی مانند پرتقال و لیمو	
آنتوسیاتین‌ها	سیانیدین	گیلاس، تمشک وحشی، توت فرنگی	
اورون‌ها	—	Artemisia abrotanum	

ساختار پایه این ترکیبات شامل ۲ حلقه آروماتیک است که با یک زنجیره آلفاتیک ۳ کربنی که به شکل حلقه پیران یا فوران است به هم متصل شده‌اند.

۲-۳. فرایند استخراج عصاره مغز گردوی سیاه

مغز گردوی سیاه با استفاده از دستگاه آسیاب (Disintegrator) به پودرهایی بسیار ریز و نرم تبدیل شد. پس از آن، مقدار ۱۰۰ گرم از پودر اندام گیاه با ۵۰۰ میلی لیتر مخلوط اتانول-آب نسبت ۵۰:۵۰ (وزن به حجم) مخلوط شد و به مدت ۲۴ ساعت به صورت ورتکس مخلوط گردید. در نهایت با فیلتر کاغذی واتمن صاف شد. این فرایند استخراج در سه بار تکرار شد. محلول صاف شده سپس به وسیله چرخاننده روتاری در فشار کم یا خلا و در دمای ۴۰ درجه سلسیوس به مدت ۴ ساعت تبخیر شد تا حلال بطور کامل تبخیر گردد و ماده‌ای چسبناک، روغنی و غلیظ به دست آید. از ترکیب استخراج شده می توان جهت آزمایشات آنتی

اکسیدانسی به صورت برون تن (InVivo) و یا تجویز به حیوانات آزمایشگاهی (داخل دهانی به صورت گاوآژ) جهت آزمایش درون تن (InVivo) استفاده گردد [۱۲].

۳. بحث و نتایج

۳-۱. روش‌های ارزیابی قابلیت آنتی اکسیدانی عصاره اتانولی مغز گردوی سیاه

برای بررسی هر ماده از نظر خصوصیات آنتی اکسیدانی، لازم است چندین آزمون شیمیایی و زیستی به کار گرفته شود. چنانچه ماده مورد نظر بتواند این آزمون‌ها را مطابق استانداردهای مربوط با نتیجه مطلوب پشت سر بگذارد، می‌توان ادعا کرد که دارای ویژگی آنتی اکسیدانی است. از جمله آزمون‌هایی که برای ارزیابی خاصیت آنتی اکسیدانی استفاده می‌شود می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: تعیین مقدار محتوای فنولی و فلاونوئیدی. این دو آزمایش با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل UV-2100، ساخت آمریکا، در آزمایشگاه پارک علم و فناوری ساری انجام شده است.

۳-۲. روش تعیین مقدار فنولیک کل در عصاره هیدروالکلی اندام گیاهی مغز گردوی سیاه

برای اندازه‌گیری ترکیبات فنولیک کل در عصاره هیدروالکلی اندام گیاه، از معرف فولین سیو کالتیو (FCR) استفاده شد [۱۳]. در این روش ۲۵۰ میکرولیتر از عصاره هیدروالکلی اندام گیاه با غلظت ۱۰ mg/mL که از فیلتر میکرونی ۰/۴۵ عبور داده شده بود، با ۱/۲۵ میلی‌لیتر از معرف فولین سیو کالتیو ترکیب شد و پس از ۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، حدود ۱ میلی‌لیتر از محلول (7/5 g/dL) Na_2CO_3 اضافه گردید. پس از دو ساعت انکوباسیون در دمای اتاق، جذب نمونه در مقابل بلانک با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۰ nm اندازه‌گیری شد.

محلول بلانک: برای تهیه محلول بلانک، همان روش فوق به کار گرفته شد اما به جای عصاره گیاهی از آب مقطر استفاده شد. محلول استاندارد: در این روش از غلظت‌های استاندارد یک فنولیک اسید مانند اسید گالیک در بازه‌های غلظتی ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۲۵۰ $\mu\text{g/mL}$ استفاده شد تا منحنی کالیبراسیون رسم شود.

محتوی فنولیک کل در استخراج هیدروالکلی اندام گیاه بر مبنای میکروگرم گالیک اسید بر گرم استخراج (μg of galic acid) (equivalents (GAE) per g of extract) با میانگین سه بار آزمایش گزارش شد.

۳-۳. روش تعیین محتوی فلاونوئید کل در استخراج مغز گردوی سیاه

میزان محتوای فلاونوئید تام عصاره گیاهی به کمک معرف آلومینیوم کلرید (AlCl_3) از طریق رنگ‌سنجی بصورت زیر ارزیابی شد [۱۳]. حدود ۲۵۰ μL از استخراج هیدروالکلی اندام گیاه با غلظت ۱۰ mg/mL که از فیلتر میلی‌پور ۰/۴۵ μm عبور داده شده با ۷۵۰ μL از متانول، ۵۰ μL از محلول AlCl_3 (۱۰٪) در اتانول؛ ۵۰ μL از استات پتاسیم ۱M به همراه ۱/۴ mL از آب دوبار تقطیر با هم مخلوط

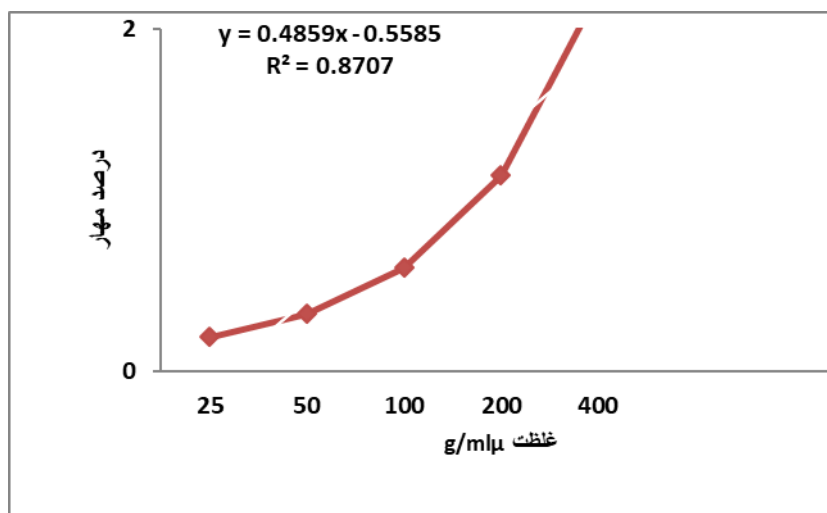
نموده و بعد از ۳۰ دقیقه آنکوباسیون در دمای محیط، جذب مخلوط واکنش در مقابل بلانک در طول موج ۴۱۰nm به کمک روش اسپکتروفتومتری قرائت شد.

محل بلانک: جهت تهیه محلول بلانک طبق روش فوق عمل شده اما به جای استخراج گیاهی از آب مقطر استفاده شده است. محلول استاندارد: غلظت‌های استاندارد کوئرستین در رنج غلظتی ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵، ۱۵/۶۲ جهت رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شدند.

محتوی فلاونوئید کل در عصاره‌های حاصل از استخراج بر مبنای میکروگرم کوئرستین بر گرم استخراج (μg of quercetin equivalents (QUE) per g of extract) با میانگین سه بار آزمایش گزارش گردیده است.

۳-۴. میزان محتوای تام فنولی و فلاونوئیدی

جهت ارزیابی میزان محتوای تام فنولی موجود در عصاره اتانولی مغز گردوی سیاه از روش فولین سیو کالتو استفاده شد. استاندارد مورد نظر گالیک اسید است که بر اساس آن منحنی کالیبراسیون رسم شد (نمودار ۱).



نمودار ۱. منحنی استاندارد گالیک اسید جهت تعیین محتوای تام فنولی در عصاره اتانولی مغز گردوی سیاه

میزان محتوای تام فلاونوئیدی موجود در عصاره طبق روش رنگ‌سنجی ارزیابی شد. معرف رنگی در این روش آلومینیوم کلرید می‌باشد. استاندارد مورد نظر کوئرستین است که بر اساس آن منحنی کالیبراسیون رسم شد (جدول ۲).

جدول ۲. میزان محتوای تام فنولی و فلاونوئیدی

متغیر	Mean ±SD
محتوای تام فنولی (μg/ml)	۱۵۰ ± ۸
محتوای تام فلاونوئیدی (μg/ml)	۸۳/۳ ± ۵/۵

میانگین ذکر شده حاصل از سه بار تکرار آزمایش می‌باشد.

۳-۵. مقایسه و مروری بر مطالعات انجام شده

در سال ۲۰۲۲، ژو و همکارانش دریافتند که ترکیبات فنول روغن گردو سبب بازدارندگی رشد قارچ *C. gloeosporioides* می‌شود که نشان‌دهنده‌ی فعالیت ضدقارچی این روغن است [۱۴]. در تحقیق حاضر آنالیز جی-سی-مس روغن گروی سیاه دو نوع مشتق از سینامیک اسید شامل ۲-اتیل‌هگزیل ترانس-۴-متوکسی سینامات و هیدروکسی سینامیک اسید و دو ترکیب فنولی ۲-۴-دی-ترشری-بوتیل فنول و ۴-ترشری-اکتیل فنول را شناسایی کرد. ترکیبات موجود در ۲/۶٪ از محتویات روغن گردوی سیاه توسط آنالیز جی-سی-مس قابل شناسایی نبود. پیشتر، طی پژوهشی ۲-۴-دی-ترشری-بوتیل فنول (۴۲/۹٪) و ۲-۶-دی-ترشری-بوتیل فنول (۱-۶۸٪) از گردوی ترکیه‌ای استخراج شد [۱۵]. در سال ۲۰۱۸، پرسیکو همکارانش شانزده ترکیب فنول را از مغز گردوی تازه استخراج کردند که از میان آنها، هیدروسینامیک اسید و کوئینیک اسید غالب بودند [۱۶]. سینامیک اسید و مشتقاتش ترکیبات طبیعی فعال بیولوژیکی هستند که خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد سرطان، ضدباکتری و ضد التهاب نشان می‌دهند [۱۷ و ۱۸].

در مطالعه فلاحی و حسینی در سال ۲۰۲۰ دریافتند که عصاره برگ گردو در موش‌های دیابتی شده، باعث افزایش میزان HDL و کاهش میزان تری‌گلیسرید، کلسترول و LDL در خون شد [۱۹].

در مطالعه آسی و همکاران (۲۰۲۲) نشان داد که از مغز گردو برای افزایش لیپوپروتئین با وزن مولکولی بالا و کاهش لیپوپروتئین با وزن مولکولی پایین استفاده می‌شود [۲۰].

در مطالعه Cakina و همکاران (۲۰۲۲) دریافتند که سطح فعالیت PON 1 در سرم بیماران باردار مبتلا به کم کاری تیروئید به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بود. غلظت سرمی MPO در گروه بیماران به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل بود. نسبت MPO/PON-1 در بیماران باردار مبتلا به کم کاری تیروئید بیشتر از گروه کنترل بود و در نهایت به این نتیجه رسیدند که کاهش سطح PON1 با افزایش سطح MPO در بیماران باردار مبتلا به کم کاری تیروئید نشان‌دهنده نقش حیاتی استرس اکسیداتیو در کم کاری تیروئید در دوران بارداری است [۲۱]. در تحقیق حاضر، عصاره هیدروالکلی گردوی سیاه باعث کاهش غلظت آنزیم پارکسوناز ۱ (PON-1) در رت‌های گروه با تنش متی‌مازول در مقایسه با گروه کنترل، شد ($p > 0.05$).

۴. نتیجه گیری

موضوع رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن و اثرات آنها بر سیستم بیولوژیک، یکی از مباحث مهم مطرح در پزشکی است. این عوامل می‌توانند به‌طور برگشت‌پذیر به مولکول‌های حیاتی نظیر اسید نوکلئیک، پروتئین‌ها و لیپوپروتئین‌ها آسیب وارد نمایند. آنتی‌اکسیدان‌ها قادرند از سیستم‌های بیولوژیک در برابر این عوامل محافظت کنند در نتیجه باتوجه به اهمیت گیاهان دارویی لزوم بررسی آنها بسیار ضروری می‌باشد. نتایج نشان داد که عصاره مغز گردوی سیاه دارای توان آنتی‌اکسیدانی قابل توجه است که با افزایش مدت زمان تماس و غلظت ماده استخراجی، افزایش می‌یابد.

۵. مراجع

- [1] Christodoulou, M. C., Orellana Palacios, J. C., Hesami, G., Jafarzadeh, S., Lorenzo, J. M., Domínguez, R., Moreno, A., & Hadidi, M. (2022). Spectrophotometric methods for measurement of antioxidant activity in food and pharmaceuticals. *Antioxidants*, 11(11), 2213.
- [2] Sochor, J., Ryvolova, M., Krystofova, O., Salas, P., Hubalek, J., Adam, V., Trnkova, L., Havel, L., Beklova, M., Zehnalek, J., & Provaznik, I., & Kizek, R. (2010). Fully automated spectrometric protocols for determination of antioxidant activity: Advantages and disadvantages. *Molecules*, 15(12), 8618–8640.
- [3] Liu, X., Wang, Y., Ge, W., Cai, G., Guo, Y., & Gong, J. (2022). Spectrum–effect relationship between ultra-high-performance liquid chromatography fingerprints and antioxidant activities of *Lophatherum gracile* Brongn. *Food Science & Nutrition*, 10, 1592–1601.
- [4] Apak, Reşat., Demirci Çekiç, S., Üzer, A., Esin Çelik, S., Bener, M., Bekdeşer, B., Can, Z., Sağlam, Ş., Önem, A. N., & Erçağ, E. (2018). Novel spectroscopic and electrochemical sensors and nanoprobe for the characterization of food and biological antioxidants. *Sensors (Basel)*, 18(1), 186.
- [5] Bekdeşer, B., & Apak, Reşat. (2024). Colorimetric sensing of antioxidant capacity via auric acid reduction coupled to ABTS oxidation. *ACS Omega*, 9(10), 11738–11746.
- [6] Swain, S., Lin, T.-Y., Chou, I.-H., Liu, S.-C., Mallick, B. C., Lin, H.-Y., Huang, C.-H. (2024). Photoactive nanocatalysts as DTT-assisted BSA-AuNCs with enhanced oxidase-mimicking ability for sensitive fluorometric detection of antioxidants. *Journal of Nanobiotechnology*, 22, 585.
- [7] Jahanban-Esfahlan, A., Ostadrahimi, A., Tabibiazar, M., & Amarowicz, R. (2019). A Comparative Review on the Extraction, Antioxidant Content and Antioxidant Potential of Different Parts of Walnut (*Juglans regia* L.) Fruit and Tree. 2133,(11) 24.
- [8] بارنده ف.، کاوسی ح. (۱۳۹۵). اثر کادمیوم بر تغییرات برخی اجزای سیستم دفاع آنتی اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی در گیاهچه‌های عدس. نشریه پژوهش‌های حبوبات ایران. ۷(۲)، ۱۳۷–۱۲۵.
- [9] اقبال ح.، موذن زاده خیاوی ا.، ابراهیمی آ.، امیرزاده ث.، نوتاراج آلودگی ر. (۱۳۹۷). شناسایی ترکیبات فنلی عصاره برگ گردو (*Juglans regia* L.) موجود در اسپری ژوگلون به کمک کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) و اندازه‌گیری قدرت آنتی اکسیدانی، ضد قارچی و ضد میکروبی آن. فصلنامه کاربرد شیمی در محیط زیست. ۹(۳۵)، ۱۹–۱.
- [10] Trease, G. E., & Evans, W. C. (2002). *Pharmacognosy* (15th ed.). London: Saunders.
- [11] Pokorny, J., Yanishlieva, N., & Gordon, M. (2001). *Antioxidants in food: Practical applications*. Woodhead Publishing.
- [12] اسماعیلی، ا.، هاشمی، م. (۱۳۹۳). آنتی اکسیدانت‌ها و روش‌های ارزیابی آنها در نمونه‌های بیولوژیک. آمل: نشر فکر سبز. ص ۱۲۰.
- [13] Uribe, E., Marín, D., Vega-Gálvez, A., Quispe-Fuentes, I., & Rodríguez, A. (2016). Assessment of vacuum-dried peppermint (*Mentha piperita* L.) as a source of natural antioxidants. *Food Chemistry*, 190, 559–565.
- [14] Xu, H., Wang, G., Zhang, J., Zhang, M., Fu, M., Xiang, K., et al. (2022). Identification of phenolic compounds and active antifungal ingredients of walnut in response to anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*). *Postharvest Biology and Technology*, 192, 112019.
- [15] Şirin, N., Coşkun, N. C., & Adem, Ş. (2024). Effects of Walnut Septum on the Enzyme Pathways Associated with Plasma Cholesterol Level. *Konuralp Medical Journal*, 16(2), 140-147.
- [16] Persic, M., Mikulic-Petkovsek, M., Slatnar, A., Solar, A., & Veberic, R. (2018). Changes in phenolic profiles of red-colored pellicle walnut and hazelnut kernel during ripening. *Food Chemistry*, 252, 349-355.
- [17] Rocha, L. D., Monteiro, M. C., & Teodoro, A. J. (2012). Anticancer properties of hydroxycinnamic acids—a review. *Cancer Clinical Oncology*, 1(2), 109–121.
- [18] Coman, V., & Vodnar, D. C. (2020). Hydroxycinnamic acids and human health: Recent advances. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(2), 483-499.

- [19] Fallahi, M., & Hosseini, S. E. (2020). Effects of walnut leaves' extract with stress caused by forced swimming on lipid profile and body weight in adult male rats. *Journal of Sabzevar University of Medical Sciences*, 27(3), 348-353.
- [20] Assi, M. A., Mohammed, M. H., & Abdulkahaleq, L. A. (2022). Evaluate the effect of alcoholic extraction of walnut on gonadal hormones of treated rats. *Caspian Journal of Environmental Sciences*, 20(1), 145-153.
- [21] Cakina, S., Pek, E., Ozkavak, O., Kocyigit, D., & Beyazit, F. (2022). The role of paraoxonase and myeloperoxidase as oxidative stress markers in pregnant women with hypothyroidism. *Gynecology and Endocrinology*, 38(10), 840-843.

Evaluation of the antioxidant capacity of ethanolic extract of black walnut kernels (*Juglans nigra*) by UV-Vis spectrophotometry

Sedighe Morakabati¹, Alireza Motavalizadehkakhky^{2*}, Amirhossein Esmacili³, Jamshid Mehrzad¹, Rahele Zhiani²

¹ Department of Biochemistry, Ne.C., Islamic Azad University, Neyshabur, Iran

² Department of Chemistry, Ne.C., Islamic Azad University, Neyshabur, Iran

³ Department of Laboratory Science, Bab.C., Islamic Azad University, Babol, Iran

Submitted: 03 September 2025, Revised: 02 December 2025, Accepted: 06 December 2025

Abstract

Hypothyroidism is one of the most important endocrine diseases that leads to dysfunction of thyroid hormones. The aim of this study was to investigate the antioxidant capacity of ethanolic extract of black walnut kernels and evaluate the total amount of antioxidants using UV-Vis spectrophotometric methods. Ethanolic extract of black walnut kernels is considered as a potential source of phenolic compounds. In order to determine the antioxidant activity, a traditional criterion such as •DPPH was used and IC₅₀ or reduction of total capacity was determined. After extraction with 70% ethanol, the total phenolic content and flavonoids were determined and measured with appropriate accuracy and precision by UV-Vis methods. The results showed that black walnut kernel extract has a significant antioxidant capacity that increases with increasing contact time and concentration of the extractant.

Keywords: Antioxidant, Ethanol Extract, UV Spectrophotometer, Black Walnut Kernel, DPPH

*Corresponding author : Alireza Motavalizadehkakhky

Address: Department of Chemistry, Ne.C., Islamic Azad University, Neyshabur, Iran

Tel: 05142621901

E-mail: amotavalizadeh@iau.ir