فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره پوسته گردو واریته تویسرکانی و مقایسه فعالیت ضدرادیکالی آن با آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی

سمیه رضایی ارمی[۱]، سید مهدی جعفری[۲*]، مرتضی خمیری[۳] و هومان بیات[۴]

تاریخ دریافت: ۹۰/۶/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱/۱٤

[۱] دانش‌آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذائی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
[۲] استادیار گروه مهندسی مواد و طراحی صنایع غذائی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
[۳] دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
[٤] دکترای داروسازی، شرکت داروسازی نیاک، گرگان
*مسئول مکاتبه: E-mail: Smjafari@gau.ac.ir

چکیده

هدف از این پژوهش استخراج ترکیبات فنولی پوسته سبز گردو رقم تویسرکانی با دو روش استخراج (غرقابی و مایکروویو) و حلال‌های (متانول ۸۰٪، اتانول ۵۰٪، آب) در زمان‌های مختلف بود. مقدار فنول کل توسط روش فولین‌سیوکالتو سنجش شد و سپس فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با آزمون‌های قدرت احیاکنندگی، مهار رادیکال DPPH و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل بررسی شد. نتایج نشان داد در روش غرقابی آب داغ و در روش استخراج مایکروویو متانول ۸۰ درصد به عنوان حلال بهینه استخراج شناخته شد. در استخراج غرقابی کمترین IC_{50} در آزمون مهار DPPH مربوط به عصاره آبی و در استخراج به کمک امواج مایکروویو مربوط به عصاره اتانولی بود. در نهایت اثر عصاره‌ها در ممانعت از اکسیداسیون روغن سویا بررسی شد. غلظت ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام عصاره متانولی به خوبی توانست اکسیداسیون را کنترل کند. نتایج این پژوهش نشان داد که پوسته گردو منبع غنی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: استخراج به کمک امواج مایکروویو، پوسته سبز گردو، روغن سویا، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل

Antioxidant activity of Toyserkani variety of walnut husk and comparison of its antiradical activity with synthetic antioxidants

S Rezai Erami[1], SM Jafari[2*], M Khomeiri[3] and H Bayat[4]

Received: September 21, 2011 Accepted: September 21, 2011

[1]MSc, Department of Food Science and Technology, University of Agriculture Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
[2]Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, University of Agriculture Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
[3]Associate Professor, Department of Food Science and Technology, University of Agriculture Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
[4]Pharmacy Doctorate, Niyak Company, Gorgan, Iran
*Corresponding author: E-mail:smjafari@gau.ac.ir

Abstract
The aim of this study was extraction of phenolic compounds from Touyserkani variety of walnut husks with two extraction methods (traditional method and with microwave assisted extraction (MAE)) and with solvents (methanol 80%, ethanol 50% and water) in different times. Total Phenolic contents were determined by Folin Ciocaltue assay. Then the antioxidant activity of extracts was assessed through reducing power assay, DPPH radical-scavenging activity and total antioxidant activity. The results showed boiling water in traditional method and methanol 80% in microwave assisted extraction were optimum solvents. Lowest IC_{50} in DPPH radical-scavenging activity in traditional method was water extract and it in MAE was ethanolic extract. Finally, effects of methanol extract in retarding the soy oil oxidation were examined. Methanol extract with the concentration of 1000 ppm could control oxidation. Result of this study showed that walnut husk is a potential source of natural antioxidants.

Keywords: Microwave assisted extraction, Soy oil, Total antioxidant activity, Walnut husk

مقدمه

امروزه به منظور حفظ و افزایش سلامت مصرف‌کنندگان و نیز دستیابی به منابع جدید و ارزان قیمت آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی، تحقیقات در این زمینه ضروری است. به همین دلیل در سال‌های اخیر توجه زیادی به ضایعات محصولات کشاورزی حاوی آنتی-اکسیدان‌های طبیعی معطوف گردیده است. یکی از این منابع پوسته سبز گردو است که حاوی ترکیبات آنتی-اکسیدانی می‌باشند. ۱۳ ترکیب فنولی شامل هیدروکسی سینامیک اسیدها (اسید کلروژنیک، اسید کافئیک، اسید فرولیک و اسید سیناپیک)، هیدروکسی بنزوئیک اسیدها (اسید گالیک، اسید الاژیک، اسید سیرینژیک و اسید وانیلیک)، فلاونوئیدها (کاتکین، اپی کاتکین، میرستین) و ژوگلون در گردو شناسایی شده است (استامپر و همکاران ۲۰۰۶). با اینکه ژوگلون به عنوان ترکیب سمی برای رشد بسیاری از گیاهان شناخته شده است اما سمیت آن برای انسان هنوز مشخص نشده است به گونه‌ای که از عصاره پوسته گردو حاوی جوگلون در بیماری‌های پوستی، دمل، عفونت چشم‌ها، در ترکیبات داروهای دیابتی‌ها، ورم معده، تصفیه خون و کم خونی مورد استفاده قرار می‌گیرد. با این حال ریسک خطر استفاده از جوگلون وجود دارد (بلومنتال ۱۹۹۸). بنابراین این تحقیق تنها مقدمه‌ای برای استفاده از این عصاره در صنایع غذایی بوده است و نیاز به تحقیقات تکمیلی و خالص سازی تمام ترکیبات فنولی و تاثیر جز به جز آن وجود دارد تا بتواند به عنوان نگهدارنده در

صنعت غذا به کار گرفته شود. مکانیسم اثر آنتی-اکسیدان‌ها به این ترتیب است که با دادن یک اتم هیدروژن به رادیکال آزاد تشکیل شده، از گسترش واکنش‌های زنجیره‌ای اکسیداسیون جلوگیری می‌کنند. دلیل عمده اهمیت ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، توانایی مهار رادیکال‌های آزاد می‌باشد که تاثیر بالقوه‌ای در سلامت بشر دارد (وانز و همکاران ۲۰۱۰). توانایی این ترکیبات در مهار رادیکال‌های آزاد، به دلیل وجود گروه هیدروکسیل در ساختار آنها می‌باشد (الماستس و همکاران ۲۰۰۷). برای استفاده از ترکیبات فنولی موجود در برگ و پوسته سبز گردو این ترکیبات باید استخراج گردند. از روش-های مختلفی برای استخراج ترکیبات فنولی استفاده می-شود. در گذشته استخراج سنتی با حلال متداول‌ترین روش استخراج بود. استخراج با امواج مایکروویو باعث افزایش بازده استخراج در زمان کمتر و با استفاده از حلال کمتر و آسیب کمتر به محیط‌زیست می‌گردد (مندال و همکاران ۲۰۰۷). ترکیبات دوقطبی مستقیما توسط اشعه‌دهی با مایکروویو گرم می‌شوند و با تخریب دیواره‌سلولی به درون حلالی با دمای پایین‌تر استخراج می‌گردند در نتیجه از تجزیه حرارتی ثانویه ترکیبات ممانعت به عمل می‌آید (اینو و همکاران ۲۰۱۰). لی و همکاران (۲۰۰۶) ترکیبات فنولی پوست پنج گونه مرکبات را با اتانول و آب استخراج کردند. نتایج حاکی از آن بود که پارامترهای اصلی تاثیردهنده روی بازده استخراج پلی‌فنول‌ها، شرایط پوست، دمای استخراج، غلظت حلال و گونه مرکبات بوده است. در مقایسه بین دو روش استخراج سنتی و مایکروویو اینو و همکاران (۲۰۱۰) هیسپریدین را از پوست میوه انشو استخراج کردند. نتایج حاکی از آن بود که بازده استخراج به کمک امواج مایکروویو با اتانول ۷۰٪، ۵۸/۶ میلی‌گرم بر گرم نمونه بوده است که قابل مقایسه با مقدار بدست آمده با حلال متانول: دی متیل سولفاید بعد از ۳۰ دقیقه در دمای اتاق بوده است. در مورد تاثیر عصاره‌ها در ممانعت از اکسیداسیون روغن، یعثوبی و همکاران (۲۰۰۶) با بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره پوست انار در روغن سویا در دمای ۶۰°C، گزارش کردند که عصاره استونی پوست انار در سطح غلظت ۰/۰۵ اثرات آنتی-اکسیدانی بالاتری نسبت به BHT و BHA در سطح غلظت ۰/۰۲ درصد دارد. هدف از انجام این پژوهش، استخراج و بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولی موجود در پوسته سبز گردوی تویسرکانی و مقایسه آن با انواع سنتزی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق پوسته گردو واریته تویسرکانی در مرداد ۸۸ از مرکز جهاد کشاورزی مازندران تهیه شد. پس از برداشت گردو، پوسته‌ها با چاقو جدا و در آون (ساخت شرکت ممرت آلمان مدل ۸۰۰-۱۰۰[1]) ۵۰ درجه سانتی‌گراد خشک شده و تا مش ۴۰ خرد شدند. سپس در کیسه‌های محافظ به رطوبت در دمای ۱۸°C- نگهداری شدند. تمام مواد شیمیایی و حلال‌ها از شرکت-های مرک و سیگما تهیه شدند.

استخراج ترکیبات فنولی

۱۰ گرم پوسته خشک شده گردو با نسبت ۱:۱۰ با حلال (متانول ۸۰٪، اتانول ۵۰٪، آب با دمای محیط وآب داغ) مخلوط شدند. بعد از طی زمان استخراج عصاره‌ها با کاغذ صافی واتمن شماره یک فیلتر شدند. عصاره‌های الکلی ابتدا در تبخیرکننده چرخشی (ساخت کشور آلمان مدل ای کا آ آوری ۱۰) تا خروج کامل حلال استخراجی تغلیظ و سپس با خشک‌کن انجمادی (ایران مدل اف‌دی‌بی ۵۵۰۳) خشک شدند. عصاره‌های آبی فقط با خشک‌کن انجمادی خشک شدند.

استخراج ترکیبات فنولی به کمک امواج مایکروویو

۵ گرم نمونه با نسبت ۱:۲۰ با حلال (متانول ۸۰٪، اتانول ۵۰٪ و آب) مخلوط و در یک مایکروفر استخراج شده در آزمایشگاه گروه مهندسی مواد و طراحی صنایع غذایی گرگان تحت اشعه‌دهی قرار گرفتند (قره‌خانی

1. Memert 100-800

۱۳۸۸). سپس عصاره‌ها با کاغذ واتمن شماره یک فیلتر شدند. عصاره‌های الکلی ابتدا توسط تبخیرکننده چرخشی تغلیظ و سپس با خشک‌کن انجمادی خشک شدند. عصاره‌های آبی فقط با خشک‌کن انجمادی خشک شدند .

اندازه گیری ترکیبات فنولی

میزان کل ترکیبات فنولی با روش رنگ‌سنجی فولین-سیوکالتو ارزیابی شد (عربشاهی و عروج ۲۰۰۷). جهت رسم منحنی از اسیدگالیک استفاده گشت و نتایج برحسب میلی‌گرم گالیک اسید در هر گرم عصاره خشک بیان شد.

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها

ابتدا غلظت‌های مختلف از عصاره تهیه و سپس توانایی مهار رادیکال آزاد ۲و۲ دی فنیل ۱-پیکروهیدرازیل (DPPH) (لی و همکاران ۲۰۰۵)، نیروی احیاکنندگی (عربشاهی و عروج ۲۰۰۷) و ظرفیت آنتی-اکسیدانی کل (پرییتو و همکاران ۱۹۹۹) مورد سنجش قرار گرفت.

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها در به تاخیر انداختن اکسیداسیون روغن سویا

عصاره‌های متانولی پوسته سبز گردو که به روش امواج مایکروویو استخراج شدند در سه سطح غلظت (۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام) و آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی BHA و BHT 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°C قرار داده شد. در طی این مدت زمان در روزهای صفر، چهار، هشت، دوازده و شانزده عدد پراکسید (AOAC 1990) و تیوباربیتوریک‌اسید (گلی و همکاران ۲۰۰۵) تعیین شد.

آنالیز آماری

مقایسه میانگین‌های به دست آمده از سه تکرار بر پایه‌ی طرح کاملاً تصادفی با آزمون دانکن (P<۰/۰۵) صورت گرفت. آنالیز آماری با نرم افزار SAS و نمودارها با Excel رسم شد.

نتایج و بحث

جدول ۱ تاثیر حلال و مدت زمان استخراج را روی میزان ترکیبات فنولی کل جاصل از استخراج سنتی نشان می‌دهد. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که تاثیر نوع حلال و زمان استخراج بر روی مقدار ترکیبات فنول کل معنی‌دار است (P<۰/۰۵). همان‌طور که مشاهده می‌شود حلال آب داغ در زمان بیشترین مقدار ترکیبات فنولی و متانول ۸۰٪ کمترین مقدار ترکیبات فنولی را استخراج کردند. زمان استخراج نیز تاثیر معنی‌داری روی میزان استخراج ترکیبات فنولی کل داشت. زیرا با گذشت زمان حلال فرصت پیدا می‌کند که به درون بافت گیاهی نفوذ کرده و همچنین ترکیبات فنولی نیز فرصت کافی برای جدا شدن از ماتریکس و ورود به حلال داشته باشند (اسپیگنو و همکاران ۲۰۰۷). میزان ترکیبات فنولی حلال آب داغ بعد از ۱۸ ساعت کاهش می‌یابد که ناشی از تجزیه ترکیبات حساس به حرارت می‌باشد. دما پایداری ترکیبات فنولی را به علت تجزیه آنزیمی یا تجزیه حرارتی تحت تاثیر قرار می‌دهد. درجه قطبیت حلال‌های مختلف میزان استخراج ترکیبات فنولی را تحت‌تاثیر قرار می‌دهد. ترکیبات فنولی عصاره‌های حاصل از حلال‌های مختلف از نظر مقدار ترکیبات فنولی کل، نوع ترکیبات استخراج شده و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی متفاوتند. علت بالا بودن مقدار فنول کل در آب داغ نسبت به آب با دمای محیط را می‌توان این‌گونه تفسیر کرد که آب داغ برخی از پلی‌ساکاریدهای پکتیکی را از دیواره سلولی استخراج می‌کند و موجب شکستن دیواره سلولی می-گردد (لی و همکاران ۲۰۰۶). آب به عنوان یک حلال قطبی به طور طبیعی ترکیبات قطبی را بهتر از انواع غیرقطبی استخراج می‌کند. دماهای بالا قطبیت حلال را کاهش داده و بنابراین توانایی حل کردن ترکیباتی با قطبیت کمتر بهبود می‌یابد. افزایش دما همچنین کشش سطحی و

ویسکوزیته حلال را کاهش داده و سرعت انتشار و سرعت انتقال جرم را در حین استخراج افزایش می‌دهد (راموز و همکاران ۲۰۰۲).

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 تویسرکانی

حلال	زمان (ساعت)			
	٦	١٢	١٨	٢٤
متانول ٨٠٪	٢٣/٩٧±٠/٨٩^{i}	٢٦/٠١±٠/٤٤^{hi}	٢٧/٤٨±٠/٠٨^{hg}	٢٧/٩٣±٠/٧٠^{hg}
اتانول ٥٠٪	٣٣/٣٥±٠/١٧^{f}	٤٠/٦٢±٠/٨٩^{e}	٤٤/٤١±٠/١٥^{dc}	٤٧/٢٨±٠/٨٦^{ab}
آب داغ	٤٦/٤٧±٠/٧٣^{bc}	٤٩/١١±٠/٦١^{ab}	٥٠/٠٧±٠/٤٦^{a}	٤٢/٩٥±٠/١٩^{de}
آب با دمای محیط	٢٧/١٣±٠/٣٣^{gh}	٢٨/٠٧±٠/٧١^{g}	٣٢/٢٤±٠/٢٤^{f}	٣٢/٩٧±٠/٣٧^{f}

حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی دار در سطح ٠/٠٥ است.

مقدار فنول حاصل از استخراج به کمک امواج مایکروویو

جدول ۲ تاثیر حلال و مدت زمان استخراج روی میزان ترکیبات فنولی کل پوسته حاصل از استخراج مایکروویو را نشان می‌دهد. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که تاثیر حلال روی استخراج ترکیبات فنولی معنی‌دار بوده است ($P<0/05$). بهترین حلال استخراجی متانول ٨٠٪ بوده است. حلال‌هایی با ضریب دی‌الکتریک بالاتر مانند آب، مقادیر بیشتری از انرژی مایکروویو را جذب می‌کنند (وانگ و ولر ٢٠٠٦). در MAE قطبیت حلال بسیار مهم است. حلال‌های قطبی معمولاً بهتر از انواع غیرقطبی عمل می‌کنند. با در نظر گرفتن فاکتور اتلاف، هرچه این فاکتور بالاتر باشد گرما سریعتر در سرتاسر ماتریکس توزیع می‌گردد و گرما سریعتر به حلال انتقال می‌یابد. آب با اینکه بالاترین ضریب دی‌الکتریک را دارد ولی فاکتوراتلاف آن به طور معنی‌داری پایین‌تر از حلال-های دیگر است. این امر، موجب ایجاد پدیده‌ای تحت عنوان فوق داغ شدن می‌گردد. در نتیجه گرمادهی شدید منجر به تخریب ترکیبات حساس به حرارت می‌گردد. بنابراین بهتر است حلالی انتخاب گردد که علاوه بر داشتن ثابت دی‌الکتریک بالا، فاکتور اتلاف بالایی هم داشته باشد تا توزیع گرما در سرتاسر ماتریکس تسهیل گردد. اما متانول ضریب دی الکتریک بالا و فاکتور اتلاف مناسب‌تری نسبت به آب و اتانول دارد و بنابراین بهتر جواب داده است (پروئستوس و کوماتیس ٢٠٠٨). بالارد و همکاران (٢٠١٠) ترکیبات فنولی پوسته بادام زمینی را با اتانول ٣٠٪ و با استفاده از امواج مایکروویو استخراج کردند. مقدار فنول کل ١٤٣/٦ میلی‌گرم گالیک اسید بر هر گرم پوسته بوده است.

مقایسه مقدار فنول کل حاصل از استخراج سنتی و استخراج به کمک امواج مایکروویو

همان‌طور که از جداول ١ و ٢ مشهود است مقدار فنول کل در روش استخراج به کمک مایکروویو بیشتر از روش سنتی می‌باشد. زیرا در استخراج با کمک امواج مایکروویو امواج جذب شده توسط نمونه موجب تولید گرما می‌گردد که این گرما موجب تبخیر آب نمونه و اعمال فشار روی دیواره سلولی نمونه می‌گردد که منجر به تخریب دیواره و رهایی ترکیبات درون سلول می-گردد.

تاثیر انرژی مایکروویو به مقدار زیادی وابسته به ویژگی‌های دی‌الکتریک حلال و ماتریکس گیاهی می‌باشد (وانگ و ولر ٢٠٠٦).

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

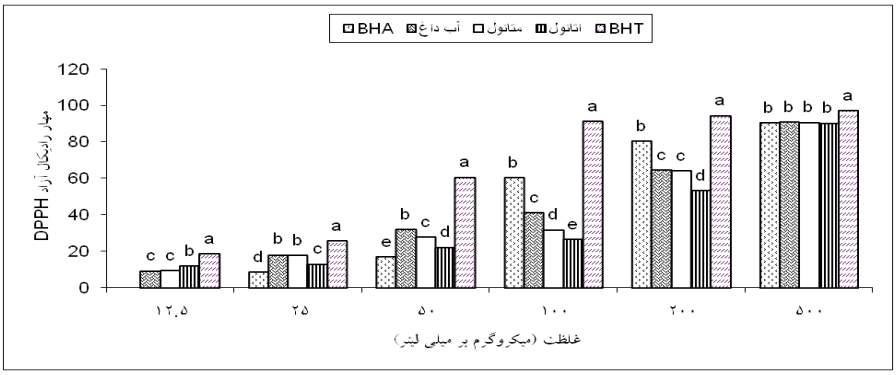
حلال	زمان (دقیقه)					
	۲	۳	٤	٦	۸	۹
متانول	٥٣/٠٦±٠/٦٢^{bc}	–	٥٤/٣٩±٠/٣٨^{bc}	٥٩/٧٧±٠/٨٤^{ab}	٦٧/٠٢±٠/٤١^{a}	–
اتانول	٤٨/٨٢±٠/٠٢^{cd}	–	٥١/٠٢±٠/٥^{bcd}	٥٢/١١±٠/٨^{bcd}	٥٤/٢٠±٠/٧٤^{bc}	–
آب	-	٤٢/٤٦±٠/٦٤^{d}	–	٤٦/١٦±٠/٤^{cd}	–	٥٢/٥٥±٠/٠٩^{bcd}

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

به منظور گرم شدن سریع تحت اشعه‌دهی با مایکروویو، حلال باید ثابت دی‌الکتریک بالا و ثابت افت دی‌الکتریک بالا داشته باشد. آب ثابت دی‌الکتریک بالایی دارد و افزودن آن به حلال‌های آلی که معمولا برای استخراج ترکیبات فعال زیستی گیاهی به‌کار می‌روند می‌تواند شاخص قطبیت این حلال‌ها را افزایش داده و باعث افزایش ثابت دی‌الکتریک مخلوط گردد (اسپیگنو و همکاران ۲۰۰۹). پن و همکاران (۲۰۰۸) فعالیت آنتی-اکسیدانی پوست لنگان را با اتانول ۹۵٪ و دو روش سنتی و مایکروویو استخراج کردند. در هر دو روش عصاره فعالیت آنتی‌اکسیدانی بهتری نسبت به BHT از خود نشان دادند. همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره حاصل از روش مایکروویو بهتر از روش سنتی بوده است. .همچنین مندال و همکاران (۲۰۰۷) مقدار فنول بالاتر بدست آمده با MAE را این‌گونه توضیح می‌دهند که دیواره سلولی مواد گیاهی که حاوی اندکی رطوبت هستند بعد از در معرض‌گیری با گرمای مایکروویو، انرژی مایکروویو را جذب کرده و رطوبت شروع به تبخیر می‌کند. تبخیر آب، موجب ایجاد فشار در دیواره سلولی گشته که نهایتاً موجب گسیختگی و پاره شدن سلول می‌گردد.

توانایی مهار رادیکال DPPH عصاره‌ها (استخراج سنتی)

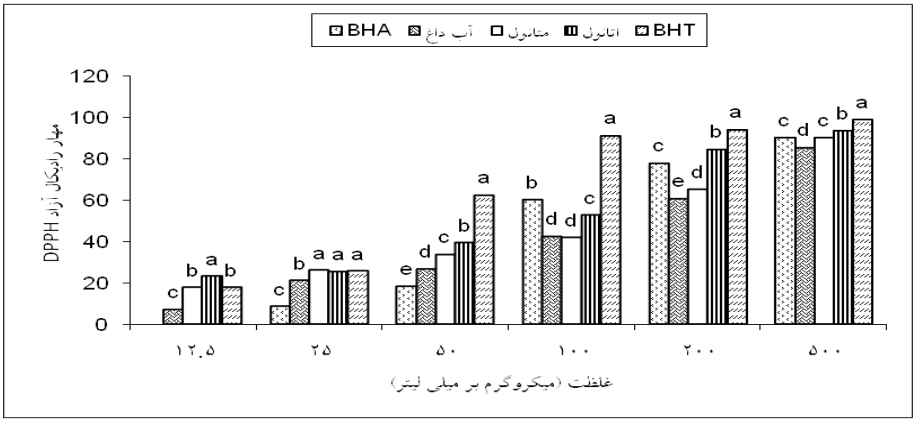
شکل ۱ میزان کاهش جذب محلول DPPH را در حضور غلظت‌های مختلف عصاره حاصل از استخراج سنتی نشان می‌دهد.نتایج آنالیز واریانس نشان داد که نوع و غلظت عصاره‌ها تاثیر معنی‌داری روی مهار رادیکال آزاد DPPH دارد ($P<0/05$). فعالیت آنتی-رادیکالی در هر سه عصاره وابسته به غلظت بود.



شکل ۱- مقایسه میانگین درصد مهار DPPH در غلظت‌های مختلف عصاره‌های حاصل از استخراج سنتی از پوسته گردو واریته تویسرکانی و آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی

توانایی مهار رادیکال DPPH (استخراج مایکروویو)

شکل ۲ میزان کاهش جذب محلول DPPH را در حضور غلظت‌های مختلف عصاره پوسته تویسرکانی حاصل از استخراج به کمک امواج مایکروویو نشان می‌دهد. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که نوع و غلظت عصاره‌ها تاثیر معنی‌داری روی مهار رادیکال آزاد دارد ($P<۰/۰۵$). فعالیت آنتی‌رادیکالی در هر سه عصاره وابسته به غلظت بود. عصاره اتانولی دراکثر غلظت‌ها فعالیت مهاری بهتری نسبت به BHA داشت. در غلظت‌های پایین فعالیت مهار رادیکال آزاد عصاره متانولی و آبی بهتر از BHA است. معمولاً برای مقایسه فعالیت ضدرادیکالی عصاره‌های مختلف از فاکتوری تحت عنوان EC_{50} استفاده می‌گردد. طبق تعریف EC_{50} 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 بالاترست. در جدول شماره ۳ مقادیر EC_{50} مربوط به عصاره‌ها آورده شده است. در استخراج سنتی همه عصاره‌ها EC_{50} بیشتری از آنتی-اکسیدان‌های سنتزی نشان دادند که بیانگر فعالیت آنتی-رادیکالی ضعیف‌تر عصاره‌ها نسبت به آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی می‌باشد. در استخراج مایکروویو عصاره اتانولی قادر به رقابت با BHA بوده است. آنتی‌اکسیدان‌ها با DPPH که یک رادیکال آزاد پایدار است واکنش داده و آن را به α و α دی‌فنیل β پیکروهیدرازین تبدیل می‌کنند. درجه بی‌رنگ شدن نشان‌دهنده پتانسیل مهاری آنتی‌اکسیدان‌ها است (نایدو و همکاران ۲۰۰۸). عصاره پوسته سبز گردو سرشار از ترکیبات فنولی می‌باشد. این ترکیبات به دلیل داشتن گروه‌های هیدروکسیل، توانایی خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد را داشته و می‌توانند به عنوان دهنده الکترون یا هیدروژن عمل کنند. همبستگی منفی بین مقدار فنول کل و مقادیر EC_{50} در آزمون مهار رادیکال آزاد DPPH نشان‌دهنده شرکت مستقیم فنول‌ها در این فعالیت می‌باشد. تفاوت در فعالیت آنتی‌رادیکالی عصاره‌های مختلف را به دلایل مختلف می‌توان نسبت داد. اما به دلیل ساختار پیچیده عصاره‌ها بیان همبستگی میان فعالیت آنتی‌رادیکالی و ترکیبات موجود در عصاره‌ها به آسانی امکان‌پذیر نیست که می‌توان به تفاوت در نوع و مقدار ترکیبات موثر موجود در آنها نسبت داد. فعالیت آنتی-اکسیدانی عصاره‌های طبیعی معمولا به توانایی آنها برای دادن هیدروژن نسبت داده می‌شود. اطلاعات بدست آمده روشن کرد که عمل عصاره‌ها به عنوان مهارکننده رادیکال آزاد می‌باشد و عصاره‌ها حاوی آنتی‌اکسیدان-های اولیه هستند که با رادیکال‌های آزاد واکنش می‌دهند.



شکل ۲- مقایسه میانگین درصد مهار DPPH در غلظت‌های مختلف عصاره‌های حاصل از استخراج به کمک امواج مایکروویو از پوسته گردو واریته تویسرکانی و آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی

بررسی نیروی احیاکنندگی عصاره‌ها (استخراج سنتی و مایکروویو)

معمولا برای مقایسه نیروی احیاکنندگی عصاره‌های مختلف از فاکتوری تحت عنوان EC_{50} استفاده می‌گردد که در جدول ۳ آورده شده است. طبق تعریف EC_{50} به غلظتی از عصاره اطلاق می‌گردد که در طول موج ۷۰۰ نانومتر جذبی معادل ۰/۵ داشته باشد. بنابراین هر چه این غلظت کمتر باشد نشان‌دهنده فعالیت آنتی‌اکسیدانی بهتر عصاره‌هاست که به‌دلیل وجود ترکیبات فنولی می‌باشد. در استخراج سنتی در بین عصاره‌ها کمترین مقدار EC_{50} مربوط به عصاره اتانولی بود و عصاره متانولی و آبی در رده‌های بعدی قرار داشتند. در استخراج مایکروویو بالاترین نیروی احیاکنندگی مربوط به عصاره اتانولی بود که اختلاف معنی‌داری با BHA نداشت. نیروی احیاکنندگی عصاره به علت توانایی آنها در دادن هیدروژن می باشد. بنابراین می‌توانند با رادیکال‌های آزاد واکنش داده تا پایدار گردند و واکنش-های زنجیری پایان یابد (یانگ و همکاران ۲۰۰۲). در بررسی انجام شده توسط لی و همکاران (۲۰۰۵) ارتباط بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و نیروی احیاکنندگی عصاره-های حاصل از ۵ واریته عناب چینی مشخص شده است. نیروی احیاکنندگی سه عصاره بالاتر از α توکوفرول بود با افزایش غلظت افزایش یافت. نتایج حاکی از آن بود که نیروی احیاکنندگی عصاره‌ها مرتبط با فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. نتایج حاصل از این تحقیق با نتایج این پژوهش مطابقت داشت. روش احیا فری سیانید برای سنجش توانایی ترکیبات فنولی برای مهار رادیکال‌ها از طریق دادن الکترون می‌باشد. آنتی‌اکسیدان-ها کمپلکس فری سیانید/یون فریک را به فرم فروس احیا می‌کنند. از آنجا که آنتی‌اکسیدان‌ها از طریق مکانیسم‌های مختلف عمل می‌کنند. بنابراین این روش به تنهایی برای ارزیابی کامل ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کافی نیست.

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

		عصاره			آنتی‌اکسیدان سنتزی	
IC50	استخراج	عصاره متانولی	عصاره اتانولی	عصاره آبی	BHA	BHT
مهار رادیکال DPPH	غرقابی	۱۵۷/۵۲^{b}	۱۹۰/۸۳^{a}	۱۳۷/۳۸^{c}	۸۵/۷۳^{d}	۳۵/۸۷^{e}
	مایکروویو	۱۳۱/۲۲^{b}	۸۴/۸۳^{c}	۱۴۰/۶۹^{a}	۸۵/۷۳^{c}	۳۵/۸۷^{d}
نیروی احیاکنندگی	غرقابی	۴۴۶/۶۶^{b}	۲۵۷/۷۵^{c}	۵۱۷/۹۶^{a}	۱۶۸/۶۶^{d}	۵۴/۶۳^{e}
	مایکروویو	۳۳۶/۰۰^{b}	۱۸۰/۷۶^{c}	۴۸۵/۳۲^{a}	۱۶۸/۶۶^{c}	۵۴/۶۳^{d}
ظرفیت آنتی-اکسیدانی کل	غرقابی	۱۵۴/۵۳^{d}	۲۷۲/۴۶^{b}	۳۸۲/۴۹^{a}	۱۵۸/۲۳^{c}	۹۹/۱۹^{e}
	مایکروویو	۷۹/۵۲^{c}	۱۳۴/۵۷^{e}	۱۹۱/۳۶^{a}	۱۵۸/۲۳^{b}	۹۹/۱۹^{d}

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

بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره ها

معمولاً برای مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره‌های مختلف از فاکتوری تحت عنوان EC_{50} استفاده می‌گردد که در جدول ۳ آورده شده است. طبق تعریف EC_{50} به غلظتی از عصاره اطلاق می‌گردد که در طول موج ۶۹۵ نانومتر جذبی معادل ۰/۵ داشته باشد. بنابراین هرچه این غلظت کمتر باشد نشان‌دهنده فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتر عصاره‌هاست. در استخراج سنتی کمترین مقدار EC_{50} و در نتیجه ظرفیت آنتی‌اکسیدانی

بالاتر مربوط به عصاره متانولی بود. این عصاره EC_{50} کمتری از BHA و بیشتری از BHT داشت. در روش مایکروویو نیز عصاره متانولی کمترین EC_{50} را دارا بود. همچنین عصاره‌های اتانولی و متانولی EC_{50} کمتری نسبت به BHA داشتند. عربشاهی و عروج (۲۰۰۷) مقدار ترکیبات فنولی و ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های مختلف برگ شاه‌توت را بررسی کردند. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های متانولی، استونی، آبی و BHT به‌ترتیب ۱/۳۹۳، ۱/۳۸٦، ۰/٦٦ و ۳/۹۲۱ معادل میکرومول آلفا توکوفرول در گرم عصاره بود. در تحقیقی که توسط الماستس و همکاران (۲۰۰۷) انجام گرفت فنول کل هفت واریته قارچ خوراکی وحشی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاکی از آن بود که با افزایش غلظت عصاره‌ها، فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل افزایش یافت. پن و همکاران (۲۰۰۸) فعالیت آنتی‌اکسیدانی پوست لنگان را با اتانول ۹۵٪ و دو روش سنتی و مایکروویو استخراج کردند. در هر دو روش عصاره فعالیت آنتی-اکسیدانی بهتری نسبت به BHT از خود نشان دادند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره حاصل از MAE بالاتر از عصاره حاصل از روش سنتی بوده است. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی از ترکیبات فنولی و پلی‌فنولی ناشی می‌شود. بنابراین باید ارتباط و همبستگی نزدیکی بین مقدار ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی وجود داشته باشد.

جدول ۴ -مقایسه میانگین اعداد پراکسید و تیوباربیتوریک‌اسید در مجموع روزهای چهارم، هشتم، دوازدهم و شانزدهم در سه تکرار

تیمار	عدد پراکسید	عدد تیوباربیتوریک اسید
نمونه کنترل	۱۰٦/۱۳[a]	۰/۲۸۹[a]
غلظت ۲۵۰	۷۰/۳٤[c]	۰/۲۰۳[b]
غلظت ۵۰۰	۵۷/۷۲[d]	۰/۱۷۵[c]
غلظت ۱۰۰۰	۵٤/٦۵[e]	۰/۱٦۲[d]
BHA-100	۷۳/۸۳[b]	۰/۱۸۵[c]
BHA-200	۵۳/۰٤[ef]	۰/۱٦۳[d]
BHT-100	۵۱/٦۷[f]	۰/۱۵۳[d]
BHT-200	۳۹/٤۷[g]	۰/۱۳۷[e]

حروف غیرمشابه در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها در ممانعت از اکسیداسیون روغن`

جدول شماره ٤ مقایسه میانگین‌های اعداد پراکسید و تیوباربیتوریک اسید را در مجموع روزهای ٤، ۸، ۱۲، ۱٦ نشان می‌دهد. در بررسی میانگین اعداد پراکسید در مجموع روزها مشخص شد که نمونه شاهد دارای بالاترین مقدار اعداد پراکسید بوده است و تفاوت معنی-داری با همه تیمارهای دیگر داشت. همچنین تمامی عصاره‌ها بهتر از BHA-100 توانستند از اکسیداسیون ممانعت کنند. همچنین با افزایش غلظت عصاره‌ها مهار اکسیداسیون بهتر صورت گرفته است. با افزایش زمان نگهداری نمونه‌ها در شرایط اکسیداسیون، اعداد پراکسید افزایش یافته است. با توجه به مقادیر اندیس تیوباربیتوریک‌اسید ارائه شده در جدول ٤ نیز مشخص شد که نمونه شاهد دارای بالاترین مقدار این اندیس بوده است که اختلاف معنی‌داری با همه تیمارها داشته است غلظت ۵۰۰ عصاره اختلاف معنی داری با BHA-100 نداشت. غلظت ۱۰۰۰ عصاره بهتر از BHA-100 و

BHA-200 عمل کرده است و اختلاف معنی داری با BHT-200 نداشت. در واقع عدد پراکسید بیانگر اکسیداسیون اولیه است. در حالیکه اندیس تیوباربیتوریک بیانگر مراحل ثانویه اکسیداسیون می‌باشد. با افزایش زمان نگهداری نمونه‌های روغن در شرایط اکسیداسیون، میزان عدد پراکسید افزایش یافته است. نمونه شاهد که حاوی هیچ آنتی‌اکسیدانی نبوده است بیشترین مقدار عدد پراکسید را در همه روزها دارا بوده است. تمامی نمونه-های از نظر عدد پراکسید و تیوباربیتوریک اختلاف معنی-داری با نمونه شاهد داشتند. آنتی‌اکسیدان‌ها طی مدت زمان خاصی فعال باقی مانده و با گذشت زمان به تدریج ازدرجه تاثیر آنها کاسته می‌شود که دلیل آن می‌تواند نگهداشتن نمونه‌ها در شرایط اکسیداسیون و حرارت باشد.. بنابراین در روزهای آغازی اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف نبود. اما در روزهای پایانی شاهد بالا رفتن واکنش‌های اکسیداسیون هستیم و تفاوت بین نمونه-ها مشهود است. میزان عدد پراکسید همواره در حال افزایش نمی‌باشد بلکه تا مدتی افزایش یافته و بعد از این‌که به سطح مشخصی رسید شکسته شده و ترکیبات جانبی ایجاد می‌گردد. تشکیل مالون‌دی‌آلدهید نیز در همه نمونه‌ها با گذشت زمان افزایش یافت. همچنین از آنجا که مالون-آلدهید از تجزیه هیدروپراکسیدها حاصل می‌گردد بنابراین در روزهای ابتدایی مقدار تیوباربیتوریک‌اسید 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. این شاخص نیز با افزایش غلظت عصاره‌ها کاهش می‌یابد. این اثر آنتی-اکسیدانی را به محتوی فنولی عصاره‌ها نسبت می‌دهند. در واقع با افزایش غلظت، مقدار ترکیبات فنولی افزایش یافته که منجر به افزایش گروه‌های فعال برای مهار رادیکال آزاد می‌گردد. این ترکیبات به دلیل داشتن گروه هیدروکسیل توانایی خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد را دارند. به طور کل عصاره پوسته سبز گردو به عنوان منبعی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی، توانایی واکنش با رادیکال‌های حاصل از اکسیداسیون لیپیدها را دارد. پژوهشی در مورد تاثیر عصاره پوسته گردو در ممانعت از اکسیداسیون روغن وجود ندارد. عماد (۲۰۰۶) با افزودن عصاره پوست و دانه انگور به روغن آفتابگردان گزارش کرد که به دلیل وجود ترکیبات فنولی بالاتر در پوست، توانایی پوست در ممانعت از اکسیداسیون بالاتر از دانه می‌باشد. گلی و همکاران (۲۰۰۵) در بررسی اثر ترکیبات فنولی پوست سبز پسته بر روغن سویا گزارش کردند با افزایش میزان ترکیبات فنولی، اثر آنتی‌اکسیدانی آن افزایش یافت. همچنین تیمار ۶۰۰ پی‌پی‌ام عصاره قابل مقایسه با غلظت ۲۰۰ پی‌پی‌ام آنتی‌اکسیدان سنتزی (BHA و BHT) می‌باشد.

نتیجه‌گیری

ترکیبات آنتی‌اکسیدانی به طور قابل توجهی در منابع گیاهی یافت می‌شوند. در این تحقیق پوسته سبز گردو به دلیل داشتن مقادیر فراوان ترکیبات فنولی مورد بررسی قرار گرفت و تاثیر حلال، زمان، دما و روش استخراج بر روی مقدار ترکیبات فنولی مطالعه شد. استخراج با امواج مایکروویو کاراتر از روش استخراج سنتی بود. این تحقیق نشان می‌دهد که عصاره پوسته سبز گردو دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. اما برای استفاده عملی باید تحقیقات بیشتری انجام گیرد و امکان استفاده از این عصاره در صنعت روغن بررسی گردد.

منابع مورد استفاده

قره‌خانی م، رفیعی ز، قربانی م و جعفری س م، ۱۳۸۸. سیستم مایکروویو محفظه باز برای استخراج ترکیبات موثره از گیاهان دارویی، ۵۹۳۲۱.

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

Arabshahi-Delouee S and Urooj A, 2007. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (Morus indica L.) leaves. Food Chemistry 102: 1233-1240.

Blumenthal M., ed, 1998. Walnut hull. The Complete German Commission E Monographs. Austin, TX, American Botanical Council p. 381.

Chemat S, Aït-Amar H, Lagha A and Esveld DC, 2005. Microwave-assisted extraction kinetics of terpenes from caraway seeds. Chemical Engineering and Processing 44: 1320-1326.

Elmastas M, Isildak O, Turkekul I and Temur N, 2007. Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. Journal of Food Composition and Analysis 20: 337-345.

Emad S, 2006. Antioxidant effect of extracts from red grape seed and peel on lipid oxidation in oils of sunflower. LWT - Food Science and Technology 39: 883-92.

Goli AH, Barzegar M, Sahari MA, 2005. Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (Pistachia vera) hull extracts. Food Chemistry 92: 521-5.

Inoue T, Tsubaki S, Ogawa K, Onishi K and Azuma J-I, 2010. Isolation of hesperidin from peels of thinned Citrus unshiu fruits by microwave-assisted extraction. Food Chemistry 123: 542-547.

Li BB, Smith B and Hossain MM, 2006. Extraction of phenolics from citrus peels: I. Solvent extraction method. Separation and Purification Technology 48: 182-188.

Li JW, Ding SD and Ding XL, 2005. Comparison of antioxidant capacities of extracts from five cultivars of Chinese jujube. Process Biochemistry 40: 3607-3613.

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

Naidu MM, Sulochannamma G, Sampathu SR and Srinivas P, 2008. Studies on extraction and antioxidant potential of green coffee. Food Chemistry 107: 377-384.

Pan Y, Wang K, Huang S, Wang H, Mu X, He C, Ji X, Zhang J and Huang F, 2008. Antioxidant activity of microwave-assisted extract of longan (Dimocarpus Longan Lour.) peel. Food Chemistry 106: 1264-1270

Prieto P, Pineda M and Aguilar M, 1999. 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 and Komaitis M, 2008. Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds. LWT - Food Science and Technology 41: 652-659.

Ramos L, Kristenson EM and Brinkman UAT, 2002. Current use of pressurised liquid extraction and subcritical water extraction in environmental analysis. Journal of Chromatography A 975: 3-29.

Spigno G and De Faveri DM, 2009. Microwave-assisted extraction of tea phenols: A phenomenological study. Journal of Food Engineering 93: 210-217.

Spigno G, Tramelli L and De Faveri DM, 2007. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. Journal of Food Engineering 81: 200-208.

Stampar F, Solar A, Hudina M, Veberic R and Colaric M, 2006. Traditional walnut liqueur - cocktail of phenolics. Food Chemistry 95: 627-631.

Yang JH, Lin HC and Mau JL, 2002. Antioxidant properties of several commercial mushrooms. Food Chemistry 77: 229-235.

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

Wang L and Weller CL, 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. Trends in Food Science and Technology 17: 300-312.

Wannes WA, Mhamdi B, Sriti J, Jemia MB, Ouchikh O, Hamdaoui G, Kchouk ME and Marzouk B, 2010. Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (Myrtus communis var. italica L.) leaf, stem and flower. Food and Chemical Toxicology 48: 1362-137 0.