

## اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره و پودر پوست سبز گردو بر اکسیداسیون روغن آفتابگردان

نوشین نوشیروانی<sup>1</sup>، هادی فصیحی<sup>2</sup>، علی مرادی پیام<sup>3</sup>

1- دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذایی، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد همدان، همدان، ایران  
پست الکترونیکی: nooshin\_noshirvani87@yahoo.com

2- دانشجوی دکتری بیوشیمی، دانشگاه علمی کاربردی جهاد کشاورزی، همدان، ایران

3- دانش آموخته کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشگاه علمی کاربردی جهاد کشاورزی، همدان، ایران

تاریخ دریافت: 93/8/30

تاریخ پذیرش: 93/12/5

### چکیده

**سابقه و هدف:** استفاده از آنتی‌اکسیدان یکی از راه‌های محافظت روغن از اکسیداسیون می‌باشد. از آنجایی که اکثر آنتی‌اکسیدان‌های مورد استفاده در صنایع غذایی، مصنوعی و برای سلامتی مضر می‌باشند، لذا تمایل به جایگزینی آن‌ها با ترکیبات طبیعی سالم، ضروری است. پوست گردو به دلیل دارا بودن اثرات آنتی‌اکسیدانی بالا، به عنوان یک گزینه مناسب به شمار می‌رود. لذا هدف از این پژوهش بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره و پودر پوست سبز گردو بر اکسیداسیون روغن آفتابگردان می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** عصاره پوست سبز گردو به دو روش خیساندن و سوکسله استخراج شده و میزان ترکیبات فنولیک و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن به ترتیب توسط روش‌های فولین-سیوکالتو و به دام اندازی رادیکال DPPH ارزیابی شد. اثرات آنتی‌اکسیدانی غلظت‌های مختلف عصاره (100، 250، 500 و 1000 پی پی ام) و پودر پوست سبز گردو (500 و 1000 پی پی ام) در مقایسه با نمونه شاهد و آنتی‌اکسیدان مصنوعی TBHQ در سطح حداکثر مجاز (200 پی پی ام) با ارزیابی شاخص‌های عدد اسیدی، عدد پراکسید و تیوباربتیوریک (TBA) در روزهای 0، 5، 10 و 15 روز در دمای نگهداری 70°C مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** میزان فنل کل برای روش خیساندن و سوکسله به ترتیب 17/81 و 89/07 بر حسب معادل اسید گالیک بر اساس میلی‌گرم بر گرم نمونه و میزان ترکیبات فلاونوئید برای دو روش به ترتیب 1/59 و 38/7 بر حسب کاتچین بر اساس میلی‌گرم بر گرم به دست آمد. میزان EC50 پوست سبز گردو 0/15 میلی‌لیتر به دست آمد. مشاهده داده‌های مربوط به عدد پراکسید و تیوباربتیوریک نشان داد در طول زمان میزان اکسیداسیون افزایش می‌یابد ولی نمونه‌های حاوی عصاره و پودر پوست سبز گردو در مقایسه با نمونه کنترل در اکثر غلظت‌ها اکسیداسیون کمتری را نشان می‌دهند. استفاده از غلظت‌های بالای عصاره پوست گردو باعث افزایش اکسیداسیون روغن شده و بهترین نتیجه برای غلظت عصاره 100 پی پی ام بوده به طوری که توانست به خوبی روند اکسیداسیون را کند نماید و از این نظر قابل رقابت با TBHQ در غلظت 200 پی پی ام می‌باشد.

**نتیجه‌گیری:** روش سوکسله باعث استخراج میزان بالاتری از پلی‌فنول نسبت به روش خیساندن می‌شود. غلظت‌های کمتر عصاره پوست سبز گردو در کاهش اکسیداسیون مؤثرتر از غلظت‌های بالا می‌باشد. استفاده از پوست سبز گردو به عنوان منبعی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالا و ارزان به عنوان جایگزین آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی معرفی می‌شود.

**واژگان کلیدی:** اکسیداسیون، روغن آفتابگردان، آنتی‌اکسیدان طبیعی، عصاره پوست سبز گردو

### • مقدمه

جلوگیری از اکسیداسیون لیپیدها و یا حفاظت در برابر آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها می‌باشد (1). آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی نظیر بوتیل‌تد هیدروکسی تولوئن (BHT)، سدیم بنزوات و بوتیل‌تد

اکسیداسیون روغن‌ها و چربی‌ها یکی از مهمترین عوامل فساد این ترکیبات هنگام نگهداری به شمار می‌رود که باعث ایجاد بوی تند، طعم نامطلوب و رنگ نامناسب شده و ارزش غذایی و ایمنی محصول را کاهش می‌دهد. یکی از راه‌های

پوست سبز گردو یکی از مهمترین ضایعات حاصل از گردو پس از جدا کردن مغز بوده و در حال حاضر در داخل کشور بیشتر برای سوزاندن استفاده می‌شود (7). استفاده از این محصول فرعی به عنوان منبعی از آنتی‌اکسیدان‌ها باعث افزایش میزان ارزش افزوده تولید گردو می‌شود لذا می‌توان با ساماندهی و صنعتی کردن کاربرد آن مواد بسیار با ارزشی به دست آورد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی گردو توسط مطالعات متعددی به اثبات رسیده است. به عنوان مثال فعالیت آنتی‌اکسیدانی مغز گردو توسط Zhang و همکاران (8) نشان داده شده است. سایر مشتقات گردو نیز دارای ویژگی آنتی‌اکسیدانی بوده و استفاده از محصولات فرعی و ضایعات حاصل از آن کمک زیادی به اقتصاد و حفظ محیط زیست می‌نماید. پوست، مغز، شاخه و برگ گردو در صنایع آرایشی بهداشتی و داروسازی کاربرد دارد (9). برگ گردو به عنوان یک ماده قابض و ضد انگل در طب سنتی شناخته شده است همچنین به منظور درمان نارسایی‌های وریدی، بواسیر و غیره از قدیم مورد استفاده قرار می‌گرفته است (10). نتایج مطالعه Pereira و همکاران نشان داد برگ گردو به عنوان ترکیبی با ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی می‌تواند مطرح باشد (11). حضور ترکیباتی نظیر نفتاکینون، فلاوونوئیدها و ژاگلون از ترکیبات مهم آنتی‌اکسیدانی برگ گردو به شمار می‌روند. ژاگلون یکی از مهمترین ترکیبات فنولیک موجود در گردو دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی می‌باشد (12). Amaral و همکاران (10) حضور پلی فنول و فلاوونوئیدها در برگ گردو به ویژه اسید کافئیک و کوئرستین را نشان دادند. Sharafati و همکاران (13) اثرات ضد میکروبی عصاره اتانولی برگ گردو را بر چند باکتری مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد عصاره برگ گردو دارای اثرات ضد باکتری بوده و می‌تواند در دندان پزشکی به عنوان یک ترکیب آنتی باکتریال مورد استفاده قرار گیرد. Qa'dan و همکاران (12) نشان دادند عصاره برگ گردو دارای اثر ضد میکروبی بر روی ضایعات آکنه می‌باشد. آنها فعالیت ضد میکروبی برگ گردو را به دلیل وجود تانن‌ها، تری پنونیدها و فلاوونوئید گلوکوزیدها نسبت دادند. رضایی ارمی و همکاران (14) اثر عصاره برگ گردو بر اکسیداسیون روغن سویا را بررسی نموده و مشاهده کردند غلظت 1000 پی پی ام عصاره بالاترین اثر آنتی‌اکسیدانی را نشان می‌دهد.

به دلیل محدود بودن موارد مصرف پوسته سبز گردو تاکنون مطالعات محدودی روی ترکیبات فنولیک پوسته سبز گردو صورت گرفته است. ژاگلون (5 هیدروکسی 1 و 4 نفتاکینون) شناخته شده ترین ترکیب فنولیک موجود در برگ

هیدروکسی آنیزول (BHA) به طور گسترده‌ای در صنعت غذا مصرف می‌شوند. هر چند استفاده از آنها به دلیل خطرات احتمالی نظیر سرطان‌زایی و سمی بودن محدود شده است (2). لذا مصرف کنندگان تمایل به استفاده از افزودنی‌های طبیعی و سالم دارند (3). از آنجایی که آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی در مقایسه با گیاهی دارای ساختار پیچیده‌ای می‌باشند مدت زمان طولانی تری برای بازیافت و بازگشت آنها به طبیعت مورد نیاز است و بنابراین آلاینده محیط زیست به شمار می‌روند (4). همچنین اکثر آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی مورد استفاده نظیر BHA و BHT فرار بوده و به سادگی در دماهای بالا تجزیه می‌شوند (5). با توجه به موارد ذکر شده تلاش برای یافتن جایگزین مناسب برای این ترکیبات ضروری به نظر می‌رسد.

گردو یکی از مهمترین خشکباری است که به شکل گسترده در سراسر جهان کشت می‌شود. بر اساس اطلاعات سازمان جهانی خواربار و کشاورزی (FAO)، سطح زیر کشت گردو در جهان بیش از 580 هزار هکتار و میزان تولید آن حدود 700 تا 800 هزار تن برآورد شده است و در بین کشورهای جهان، چین مقام اول و آمریکا و ایران به ترتیب در مقام‌های دوم و سوم قرار دارند. سطح زیر کشت این محصول در کشور از 2627 هکتار در سال 1360 به بیش از 213 هزار هکتار در سال 1387 رسیده است که سطح زیر کشت بیش از 81 برابر افزایش داشته است. میزان تولید این محصول در سال 1360 به مقدار 12450 تن بوده در حالی که در سال 1387 به بیش از 379 هزار تن بالغ گردیده است که بیش از 30 برابر افزایش یافته است. با توجه به اینکه پوست سبز گردو حدود 64% وزن مرطوب میوه گردو را شامل می‌شود، سالانه رقمی معادل 240 هزار تن پوست سبز گردو به دست می‌آید. پوست سبز گردو به دلیل وجود مواد رنگی از سالیان گذشته برای تهیه جوهر و رنگ‌های طبیعی مورد استفاده قرار گرفته است. با توجه به این که بیشتر صنایع تهیه رنگ پرهزینه بوده و موجب آلودگی محیط زیست می‌شود، با استفاده از پوست سبز گردو به عنوان منبع ارزان قیمت در تهیه رنگ می‌توان از مزایای آن برای رنگرزی الیاف پشمی و پلی استری استفاده نمود. همچنین از پوست سبز گردو در تهیه کود سبز، استحصال تانن، صنایع دباغی پوست و داروسازی نیز استفاده می‌شود. پوست گردو به عنوان منبع مقرون به صرفه ای برای تهیه ژاگلون می‌باشد که ژاگلون می‌تواند پیش در آمدی برای تهیه ویتامین K باشد (6).

آنتی‌اکسیدانی عصاره و پودر پوست سبز گردو بر روی اکسیداسیون روغن آفتابگردان انجام شد.

### • مواد و روش‌ها

**مواد مورد استفاده:** متانول، معرف فولین سیوکالتو، بی کربنات سدیم، کلرید آلومینیم، استات پتاسیم، اتانول، کلروفرم، فنل فتالین، هیدروکسید سدیم (سود)، اسید استیک، یدید پتاسیم، معرف نشاسته، تیوسولفات پتاسیم، بوتانول، 2- تیوباربیستوریک اسیداز شرکت مرک آلمان تهیه شد. معرف DPPH از نمایندگی شرکت سیگما آلدریج تهیه شد.

**روغن نباتی آفتابگردان:** روغن مورد نظر تصفیه و بوگیری شده و عاری از آنتی‌اکسیدان بوده و از شرکت روغن بهشهر خریداری شد.

**گردو:** 20 کیلوگرم گردو رقم جمال از مرکز تحقیقات کشاورزی همدان تاریخ 1391/7/1 برداشت شد. همه نمونه‌ها پیش از طلوع آفتاب برداشت شدند. در همه مراحل گردوهای کاملاً سالم، به صورت دست چین، بدون هیچ گونه آسیبی به پوست سبز و به صورت کاملاً تصادفی برداشت شدند. نمونه‌ها پس از برداشت در همان روز پوست گیری شد. پوست‌های سبز جدا شده در یک محیط دور از نور و در دمای محیط خشک شدند. پوست‌های سبز پس از خشک شدن کامل، به کمک یک آسیاب برقی به دقت آسیاب شدند و برای یکنواخت کردن اندازه ذرات، با الک مش 20 الک شد. پودر پوست سبز خشک شده گردو به دست آمده تا پایان آزمایش‌ها در ظرف شیشه‌ای قهوه ای رنگ و در دمای یخچال (حدود 4°C) نگهداری شد.

**تهیه عصاره پوست سبز گردو به روش سوکسله:** برای تهیه عصاره از حلال متانول استفاده شد زیرا نتایج پژوهش‌های پیشین (20، 19، 9) نشان داده است که متانول در مقایسه با سایر حلال‌ها نظیر آب، اتانول، استونیتریل، هگزان و اتیل استات در استخراج ترکیب‌های فنولی مؤثرتر می‌باشد. استخراج به روش سوکسله و طبق روش احمدوند و همکاران (7) و کمالی روستا و همکاران (21) انجام شد. در این روش 30 گرم از نمونه درون کارتوش قرار داده شده و به دستگاه سوکسله متصل گردید و پس از اضافه نمودن مقدار مناسب (حدود 400 میلی لیتر) حلال (متانول) به نمونه، استخراج طی 48 ساعت انجام شد. سپس حلال در دستگاه تبخیرکننده چرخان تحت خلأ، کاملاً تبخیر شد. عصاره به دست آمده تا پایان آزمایش‌ها در ظرف شیشه‌ای قهوه‌ای رنگ و در دمای یخچال (حدود 4°C) نگهداری شد.

و پوسته سبز گردو می‌باشد (15، 11). وجود ترکیبات دیگری نیز در پوست سبز گردو توسط Stamper و همکاران (16) شناسایی شده است که عبارتند از: کلروژنیک اسید، کافئیک اسید، فرولیک اسید، سیناپیک اسید، گالیک اسید، الچیک اسید، پروتوکاتچیک اسید، سیرینجیک اسید، وانیلیک اسید، کاتچین، اپی کاتچین، میریستین و ژاگلون. 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 گونه ای که از عصاره پوسته گردو حاوی ژوگلون در بیماری‌های پوستی، دمل، عفونت چشم‌ها در ترکیبات داروهای دیابتی، ورم معده، تصفیه خون و کم خونی مورد استفاده قرار می‌گیرد (17). احمدوند و همکاران (7) نشان دادند عصاره هیدوآلکی پوست گردو از اکسیداسیون LDL در دیواره رگ‌ها جلوگیری می‌نماید. اخیراً عصاره آبی پوست سبز گردو به عنوان منبع ارزان قیمتی از ترکیبات پلی فنولیک با فعالیت ضد اکسیداسیونی و ضد میکروبی معرفی شده است (4). نتایج به دست آمده توسط Oliveira و همکاران (4) و Carvalho و همکاران (18) و Fernandez-Agullo و همکاران (9) نشان داده است که این ماده ارزان قیمت منبع غنی از پلی فنول با خاصیت ضد اکسیداسیونی و ضد میکروبی می‌باشد. Oliveira و همکاران (4) میزان فنول کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی 5 واریته مختلف عصاره آبی پوست گردو را ارزیابی نموده و نشان دادند که پوست سبز گردو می‌تواند به عنوان منبع مهمی از ترکیبات محافظت کننده سلامتی و ضد میکروبی مورد توجه قرار گیرد. Carvalho و همکاران (18) اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره دانه، برگ و پوست گردو را بر روی توسعه سلول‌های سرطانی مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد این ترکیبات دارای اثرات آنتی همولیتیک و ضد توسعه سلول‌های سرطانی می‌باشند. اثرات پلی فنول‌های موجود در پوست سبز گردو بر رشد کپک آسپرژیلوس فلاووس و تولید آفلاتوکسین توسط Mahoney و همکاران (15) مورد بررسی قرار گرفت. اثرات این ترکیبات بر تولید آفلاتوکسین کاملاً وابسته به غلظت بوده و در غلظت‌های بالا رشد آسپرژیلوس فلاووس و یا بیوسنتز آفلاتوکسین کاهش یا به طور کامل از تولید آن جلوگیری شد. رضایی ارمی و همکاران (17) اثرات عصاره پوسته سبز گردو بر اکسیداسیون روغن سویا را مورد بررسی قرار داده و نشان دادند پوسته سبز گردو منبع غنی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی می‌باشد. لذا با توجه به رقم بالای تولید پوست گردو در کشور، این پژوهش باهدف بررسی اثر

سبز گردو و نیز آنتی‌اکسیدان سنتزی TBHQ در حلال متانول تهیه شد. 0/3 میلی‌لیتر از محلول‌های تهیه شده با 2/7 میلی‌لیتر محلول متانول حاوی معرف DPPH (غلظت 0/1 میلی مولار) مخلوط شد. مخلوط همزده شده و به مدت 60 دقیقه در تاریکی قرار داده شد. سپس جذب در 517 نانومتر اندازه‌گیری شد. فعالیت به دام اندازی رادیکالی توسط رابطه 1 محاسبه شد (23، 24):

رابطه 3

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

که در این رابطه  $A_C$  و  $A_S$  به ترتیب جذب کنترل و جذب نمونه می‌باشند.

**بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره و پودر پوست گردو حاصل از روش سوسکله در روغن آفتابگردان:** به منظور بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره پوست گردو بر اکسیداسیون روغن آفتابگردان عصاره پوست گردو در 4 سطح 100، 250، 500 و 1000 پی پی ام به روغن بوگیری شده فاقد آنتی‌اکسیدان استفاده شد. همچنین آنتی‌اکسیدان سنتزی TBHQ در سطح 200 پی پی ام به روغن آفتابگردان بدون آنتی‌اکسیدان اضافه شده و یک نمونه فاقد آنتی‌اکسیدان به عنوان نمونه شاهد انتخاب شد. همچنین به منظور بررسی اثر پودر پوست گردو، پودر نیز در 2 سطح 500 و 1000 پی پی ام به روغن اضافه شد. تیمارهای تهیه شده به مدت 15 روز در  $70^\circ\text{C}$  آون نگهداری شده و عدد اسیدی، عدد پراکسید و عدد اسید تیوباربتوریک روغن آفتابگردان در روزهای 0، 5، 10 و 15 در سه تکرار اندازه‌گیری شد (17، 25). انتخاب دمای  $70^\circ\text{C}$  مطابق پژوهش Adam Mariod و همکاران (20) به دلیل آن است که در دماهای بالاتر از  $70^\circ\text{C}$  پراکسیدها بسیار سریع تجزیه می‌شوند.

**اندازه‌گیری عدد اسیدی:** عدد اسیدی مطابق روش Serbetci و همکاران (26) اندازه‌گیری شده و مطابق رابطه 4 محاسبه شد.

$$\text{رابطه 4} \quad \text{عدد اسیدی} = \frac{aMN}{10P}$$

a: میلی‌لیتر محلول هیدروکسید پتاسیم بکار رفته، N: نرمالیتسه محلول هیدروکسید پتاسیم بکار رفته، M: وزن مولکولی هیدروکسید پتاسیم، P: وزن نمونه بر حسب گرم.

**تهیه عصاره پوست سبز گردو به روش خیساندن:** در این روش 20 گرم پودر سبز گردو با 120 میلی‌لیتر حلال (30 میلی‌لیتر آب مقطر و 90 میلی‌لیتر متانول) در داخل یک بالن ژوژه مخلوط شده و در ظرف را بعد از بستن توسط پارافیلیم مسدود نموده و به مدت یک ساعت توسط همزن مغناطیسی همزده شد. سپس نمونه را به مدت 72 ساعت در یخچال با دمای  $4^\circ\text{C}$  قرار داده و در طی این مدت هر روز به مدت 1-2 ساعت توسط همزن مغناطیسی همزده شد. سپس نمونه به مدت 10 دقیقه در سانتریفیوژ با دور 2500 دور در دقیقه قرار داده شد. در نهایت نمونه با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره 15 صاف شد. نمونه به دست آمده به داخل پتریدیش منتقل شده و در آون با دمای  $38^\circ\text{C}$  قرار داده شد. پس از گذشت 48 ساعت عصاره خشک از داخل پتریدیش‌ها جمع‌آوری نموده و تا پایان دوره آزمایش در ظرف شیشه‌ای قهوه‌ای رنگ و در دمای یخچال (حدود  $4^\circ\text{C}$ ) نگهداری شد.

**آزمون‌های صورت گرفته بر روی عصاره پوست سبز گردو**

**اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنولی:** اندازه‌گیری فنول‌ها توسط روش فولین سیوکالتو (22) و برای همه نمونه با 3 تکرار صورت گرفت. سپس توسط دستگاه اسپکتروفتومتر، جذب در طول موج 725 نانومتر خوانده شد. نتایج براساس میلی گرم اسید گالیک در 100 گرم نمونه خشک و طبق معادله 1 به دست آمد (21، 22).

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

$$\text{رابطه 1} \quad x = \frac{y+0.022}{0.0041}$$

**اندازه‌گیری میزان ترکیبات فلاونوئیدی:** اندازه‌گیری ترکیبات فلاونوئیدی توسط روش رنگ‌سنجی و دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج 415 نانومتر و برای همه نمونه با 3 تکرار صورت گرفت. نتایج براساس میلی گرم اسید گالیک در 100 گرم نمونه خشک شده و طبق رابطه 2 به دست آمد (21).

$$\text{رابطه 2} \quad x = \frac{y+0.0206}{0.0091}$$

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

میزان به دام اندازی رادیکال‌های آزاد DPPH: غلظت‌های مختلفی (1- 0/1 میلی گرم بر میلی لیتر) از عصاره پوست

**جدول 1.** مقایسه میانگین مقدار کل ترکیبات فنولیک پوست گردو در دو روش سوکسله و استخراج

| روش استخراج عصاره         |                          | نوع ترکیب  |
|---------------------------|--------------------------|--|
| سوکسله                    | خیساندن                  |  |
| 89/07 ± 0/22 <sup>a</sup> | 7/38 ± 0/15 <sup>a</sup> | مقدار ترکیبات فنولیک<br>(میلی گرم اسید گالیک بر گرم نمونه) |
| 17/81 ± 0/38 <sup>b</sup> | 1/59 ± 0/11 <sup>b</sup> | مقدار ترکیبات فلاونوئیدی<br>(میلی گرم کاتچین بر گرم نمونه) |

حروف غیر مشابه درون یک سطر بیانگر اختلاف معنی دار است (P<0/05)

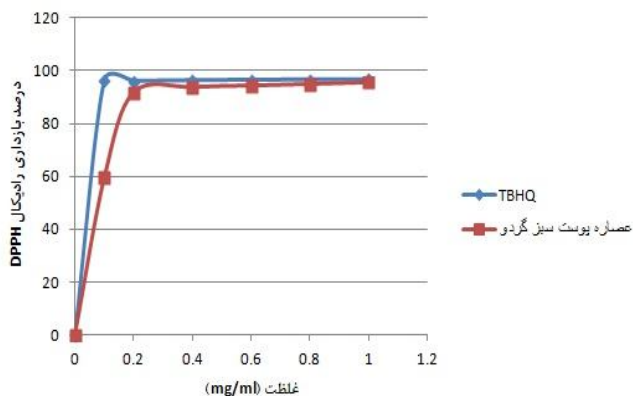
به دام اندازی رادیکال‌های آزاد DPPH: فعالیت جذب رادیکال آزاد توسط عصاره پوست سبز گردو طی آزمایش DPPH اندازه‌گیری شده و همان طور که در شکل 1 نشان داده شده است با افزایش غلظت عصاره به ویژه در غلظت‌های کمتر از 0/2 میلی گرم بر میلی لیتر، درصد بازدارندگی رادیکال DPPH شدت می‌یابد.

غلظت‌هایی از عصاره پوست سبز گردو و TBHQ که 50% بازداری (EC50) را نشان می‌دهند در جدول 2 آمده است. همان طور که مشاهده می‌شود میزان EC50 برای عصاره پوست گردو حاصل از روش سوکسله به طور معنی‌داری در سطح احتمال 0/05 بالاتر از TBHQ می‌باشد که نشان دهنده فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتر TBHQ نسبت به عصاره پوست سبز گردو می‌باشد.

**جدول 2.** میزان EC50 بر حسب DPPH

| نوع آنتی‌اکسیدان    | EC50            |
|---------------------|-----------------|
| عصاره پوست سبز گردو | 0/15 ± 0/0005 a |
| TBHQ                | 0/08 ± 0/0003b  |

حروف غیر مشابه درون یک سطر بیانگر اختلاف معنی دار است (P< 0/05)



**شکل 1.** اثر بازدارندگی رادیکال DPPH بر حسب غلظت‌های مختلف عصاره و TBHQ

**اندازه‌گیری عدد پراکسید:** عدد پراکسید به روش استاندارد AOCs Cd 8-53 (27) و در 3 تکرار صورت گرفت و با استفاده از رابطه 5 محاسبه شد.

$$\text{رابطه 5} \quad \text{عدد پروکسید} = \frac{(a-b)N 1000}{p}$$

a: میلی لیتر تیوسولفات سدیم مصرفی برای نمونه،  
b: میلی لیتر تیوسولفات سدیم مصرفی برای شاهد، N: نرمالیت تیوسولفات بکار رفته، P: وزن نمونه بر حسب گرم.

**اندازه‌گیری عدد اسید تیوباربتوریک:** عدد تیوباربتوریک اسید توسط روش استاندارد AOCs Cd 19-90 (28) اندازه‌گیری شده و براساس رابطه 6 به دست می‌آید:

$$\text{رابطه 6} \quad \text{TBA} = \frac{50(A-B)}{m}$$

A: میزان جذب محلول آزمایش، B: میزان جذب محلول شاهد و m: وزن نمونه روغن.

**تجزیه و تحلیل آماری:** در این تحقیق تأثیر تیمارها (عصاره و پودر سبز گردو) بر مقدار ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در قالب طرح کاملاً تصادفی و در 3 تکرار انجام شد. در بخش مربوط به ارزیابی اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها در روغن آفتابگردان، بررسی اثر تیمارهای مختلف شامل 8 تیمار (نمونه شاهد (روغن فاقد آنتی‌اکسیدان) (T0)، روغن حاوی 200 پی پی ام TBHQ (TS)، روغن حاوی 100 (TE100)، 250 (TE250)، 500 (TE500) و 1000 (TE1000) پی پی ام عصاره پوست سبز گردو، روغن حاوی 500 (TP500) و 1000 (TP1000) پی پی ام پودر پوست سبز گردو) و 4 زمان (0، 5، 10 و 15 روز) با استفاده از روش اندازه‌گیری‌های تکرار شده در زمان در قالب طرح اسپلیت پلات در زمان با 3 تکرار اجرا گردید. تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (V9.1) انجام شد و برای مقایسه میانگین تیمارها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال (p<0/05) استفاده شد.

## • یافته‌ها

**تأثیر روش استخراج بر میزان ترکیبات فنولی عصاره پوست سبز گردو:** به منظور بررسی اثر روش استخراج بر میزان ترکیبات فنولی موجود در پوست سبز گردو، از روش‌های سوکسله و خیساندن استفاده شد و نتایج در جدول 1 آورده شده است. میزان ترکیبات فنولیک پوسته سبز گردو در روش سوکسله و خیساندن به ترتیب 89/07 و 38/7 میلی گرم بر گرم بر حسب اسید گالیک و میزان ترکیبات فلاونوئیدی 17/81 و 1/59 میلی گرم بر گرم بر حسب کاتچین به دست آمد.

هم اختلاف معنی‌دار ندارند، بقیه تیمارها دارای اختلاف معنی‌دار بوده و بالاترین مقدار عدد اسیدی مربوط به تیمار TE1000 با مقدار 0/213 می‌باشد (جدول 4). پس از نمونه کنترل نمونه TE 100 کمترین عدد اسیدی را نشان می‌دهد. همان طور که مشاهده می‌شود با افزایش غلظت عصاره عدد اسیدی افزایش یافته به طوری که نمونه حاوی 1000 پی پی ام عصاره بیشترین عدد اسیدی را در سطح سطح احتمال 0/05 نشان می‌دهد. بنابراین، مشخص می‌شود که افزودن عصاره و پودر گردو، تاثیر بازدارنده بر تغییر اندیس اسیدی نداشته است.

**تغییرات عدد اسیدی:** تغییرات عدد اسیدی در طول دوره 15 روزه برای تیمارهای مختلف اندازه گیری شده و نتایج آن در جدول 4 آورده شده است. نتایج تجزیه واریانس نشان می‌دهد که اثر زمان، تیمارهای اعمال شده و اثر متقابل زمان در تیمار روی تغییرات عدد اسیدی در سطح 1 درصد معنی‌دار می‌باشد (جدول 3). مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن نشان می‌دهد که بین هر 4 زمان مورد بررسی از نظر عدد اسیدی اختلاف معنی‌دار وجود داشته (جدول 4) و بالاترین مقدار عدد اسیدی (0/352) مربوط به طول دوره 15 روزه می‌باشد. گروه بندی دانکن بین تیمارهای مورد بررسی نشان می‌دهد که به جزء تیمارهای TP1000 و TE100 که با

**جدول 3.** جدول آنالیز واریانس اثر ترکیبات مختلف بر عدد اسیدی، عدد پراکسید و عدد اسید تیوباربتوریک اسید روغن آفتابگردان

| میانگین مربعات |              |           | درجه آزادی | منابع تغییر       |
|----------------|--------------|-----------|------------|-------------------|
| تیوباربتوریک   | پراکسید      | عدد اسیدی |            |                   |
| 1/100          | 0/3073       | 0/0000097 | 2          | R                 |
| 642233/02 **   | 113650/47 ** | 0/5567 ** | 3          | Day               |
| 0/5207         | 0/7785       | 0/0000076 | 6          | R*Day             |
| 73806/62 **    | 7573/78 **   | 0/0303 ** | 7          | T                 |
| 6193/91**      | 2295/26 **   | 0/0215 ** | 21         | Day*T             |
| 0/3364         | 1/127        | 0/0000275 | 14         | R*T               |
| 0/5026         | 0/7166       | 0/000188  | 42         | Error             |
| 0/27           | 0/67         | 1/62      |            | درصد ضریب تغییرات |

\*\* معنی‌دار در سطح احتمال 1 درصد

**جدول 4.** تغییرات عدد اسیدی برای تیمارهای مختلف در طول زمان

| روز    | تیمارها               | صفر                | پنجم              | دهم                | پانزدهم            | میانگین ** اعداد اسیدی |
|--------|-----------------------|--------------------|-------------------|--------------------|--------------------|------------------------|
| TE0    |                       | 0/037 ± 0/0014     | 0/052 ± 0/0014    | 0/068 ± 0/0002     | 0/086 ± 0/0005     | 0/006 <sup>e</sup>     |
| TS     |                       | 0/017 ± 0/0032     | 0/019 ± 0/0014    | 0/111 ± 0/0003     | 0/311 ± 0/0005     | 0/114 <sup>e</sup>     |
| TE100  |                       | 0/018 ± 0/0032     | 0/043 ± 0/0013    | 0/072 ± 0/0004     | 0/228 ± 0/0005     | 0/09 <sup>f</sup>      |
| TE250  |                       | 0/031 ± 0/0004     | 0/05 ± 0/0012     | 0/092 ± 0/0003     | 0/441 ± 0/0005     | 0/153 <sup>c</sup>     |
| TE500  |                       | 0/021 ± 0/0004     | 0/052 ± 0/0011    | 0/105 ± 0/0003     | 0/522 ± 0/001      | 0/175 <sup>b</sup>     |
| TE1000 |                       | 0/03 ± 0/0004      | 0/59 ± 0/001      | 0/141 ± 0/0003     | 0/623 ± 0/0015     | 0/213 <sup>a</sup>     |
| TP500  |                       | 0/024 ± 0/0028     | 0/028 ± 0/0009    | 0/12 ± 0/0003      | 0/386 ± 0/0005     | 0/139 <sup>d</sup>     |
| TP1000 |                       | 0/017 ± 0/0037     | 0/019 ± 0/0009    | 0/106 ± 0/0002     | 0/225 ± 0/0005     | 0/091 <sup>f</sup>     |
|        | میانگین * اعداد اسیدی | 0/024 <sup>d</sup> | 0/04 <sup>c</sup> | 0/101 <sup>b</sup> | 0/352 <sup>a</sup> |                        |

\* میانگین اعداد اسیدی در مجموع هشت تیمار (نمونه شاهد (روغن عاری از آنتی‌اکسیدان) (T0)، روغن حاوی 200 پی پی ام TBHQ (TS)، روغن حاوی 100 (TE100)، 250 (TE250)، 500 (TE500) و 1000 (TE1000) پی پی ام عصاره پوست سبز گردو، روغن حاوی 500 (TP500) و 1000 (TP1000) پی پی ام پودر پوست سبز گردو، برای هر روز در سه تکرار (حروف غیر مشابه در ردیف بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال 0/05 می‌باشند).

\*\* میانگین اعداد اسیدی در مجموع روزهای صفر، پنجم، دهم و پانزدهم برای هر تیمار در سه تکرار (حروف غیر مشابه در ستون بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال 0/05 می‌باشند).

داد که بین هر 4 زمان اختلاف معنی‌دار وجود دارد. (جدول 5). مقایسه میانگین اعداد پراکسید نشان می‌دهد که تیمار TE1000 با متوسط 173/71 میلی اکی‌والان اکسیژن بر کیلوگرم روغن بالاترین مقدار عدد پراکسید را دارا بوده و کمترین مقدار عدد پراکسید مربوط به تیمار TP1000 می‌باشد.

**تغییرات عدد پراکسید:** نمونه‌ها در آن 70°C نگهداشته شده و عدد پراکسید در طول دوره 15 روزه اندازه‌گیری شد. جدول 5 مقایسه میانگین اعداد پراکسید در روزهای 0، 5، 10 و 15 را نشان می‌دهد. نتایج تجزیه واریانس نشان می‌دهد که اثر زمان، تیمارهای اعمال شده و اثر متقابل زمان در تیمار روی تغییرات عدد پراکسید در سطح 1 درصد معنی‌دار می‌باشد (جدول 3). مقایسه میانگین بین زمان‌های مورد بررسی نشان

**جدول 5.** تغییرات عدد پراکسید برای تیمارهای مختلف در طول زمان

| تیمارها               | روز | صفر                | پنجم                | دهم                 | پانزدهم             | میانگین اعداد پراکسید |
|-----------------------|-----|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|
| TE0                   |     | 43/99 ± 0/36       | 150/73 ± 0/49       | 197/26 ± 4/1        | 93/74 ± 0/185       | 121/43 <sup>d</sup>   |
| TS                    |     | 21/63 ± 0/8        | 146/5 ± 0/309       | 151/09 ± 0/36       | 150/85 ± 0/27       | 117/51 <sup>c</sup>   |
| TE100                 |     | 20/58 ± 0/883      | 84/35 ± 1/173       | 195/72 ± 0/427      | 95/4 ± 0/17         | 99/01 <sup>f</sup>    |
| TE250                 |     | 38/92 ± 0/494      | 95/4 ± 0/784        | 224/29 ± 0/415      | 112/11 ± 0/2        | 117/68 <sup>e</sup>   |
| TE500                 |     | 53/68 ± 0/407      | 120/8 ± 0/34        | 262/95 ± 0/505      | 138/05 ± 0/255      | 143/87 <sup>b</sup>   |
| TE1000                |     | 71/04 ± 0/543      | 159/77 ± 0/772      | 302/32 ± 0/585      | 161/73 ± 0/32       | 173/715 <sup>a</sup>  |
| TP500                 |     | 56/12 ± 0/671      | 118/44 ± 0/33       | 189/92 ± 0/37       | 165/41 ± 0/31       | 132/47 <sup>c</sup>   |
| TP1000                |     | 19/35 ± 1/016      | 90/62 ± 0/249       | 148/12 ± 0/355      | 126/38 ± 0/235      | 96/11 <sup>g</sup>    |
| میانگین اعداد پراکسید |     | 40/66 <sup>d</sup> | 120/82 <sup>e</sup> | 208/95 <sup>a</sup> | 130/45 <sup>b</sup> |                       |

\* میانگین اعداد پراکسید در مجموع هشت تیمار (نمونه شاهد (روغن عاری از آنتی‌اکسیدان) (T0)، روغن حاوی 200 پی پی ام TBHQ (TS)، روغن حاوی 100 (TE100)، 250 (TE250)، 500 (TE500) و 1000 (TE1000) پی پی ام عصاره پوست سبز گردو، روغن حاوی 500 (TP500) و 1000 (TP1000) پی پی ام پودر پوست سبز گردو، برای هر روز در سه تکرار (حروف غیر مشابه در ردیف بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال 0/05 می‌باشند).

\*\* میانگین اعداد پراکسید در مجموع روزهای صفر، پنجم، دهم و پانزدهم برای هر تیمار در سه تکرار (حروف غیر مشابه در ستون بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال 0/05 می‌باشند).

متوسط 446/01 میلی‌گرم مالون آلدهید بر کیلوگرم روغن بالاترین مقدار اسیدتیوباربیتوریک را دارا می‌باشد (جدول 6). نتایج آزمون دانکن نشان می‌دهد بین همه تیمارهای اعمال شده از نظر اسید تیوباربیتوریک اختلاف معنی‌دار وجود دارد. میزان عدد TBA بعد از گذشت 15 روز برای نمونه‌های حاوی آنتی‌اکسیدان بین 338/69 - 556/94 mg/kg به دست آمد همچنین برای نمونه کنترل 632/11 mg/kg گزارش شد که بالاتر از سایر تیمارها می‌باشد. بنابراین مشاهده می‌شود که استفاده از عصاره و پودر پوست گردو در تمام سطوح میزان عدد تیوباربیتوریک را نسبت به نمونه کنترل کاهش می‌دهد.

**تغییرات عدد اسید تیوباربیتوریک:** در جدول 6 مقایسه میانگین‌های مقادیر عدد اسید تیوباربیتوریک را در روزهای 0، 5، 10 و 15 آورده شده است. نتایج تجزیه واریانس نشان می‌دهد که اثر زمان، تیمارهای اعمال شده و اثر متقابل زمان در تیمار روی تغییرات عدد اسید تیوباربیتوریک در سطح 1 درصد معنی‌دار می‌باشد.

مقایسه میانگین‌ها با بهره‌گیری از آزمون دانکن نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین 4 زمان مورد بررسی می‌باشد و با افزایش زمان نگهداری، مقدار اندیس تیوباربیتوریک اسید نمونه‌ها افزایش می‌یابد. به طوری که طول دوره 15 روزه با

جدول 6. تغییرات عدد اسید تیوباربتوریک برای تیمارهای مختلف در طول زمان

| تیمارها | روز                               | صفر                | پنجم                | دهم                 | پانزدهم             | میانگین ** اعداد تیوباربتوریک اسید |
|---------|-----------------------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|------------------------------------|
| TE0     |                                   | 0                  | 385/47 ± 1/09       | 504/44 ± 0/56       | 632/11 ± 0/265      | 509/006 <sup>a</sup>               |
| TS      |                                   | 64/16 ± 0/835      | 132/21 ± 0/555      | 256/45 ± 0/357      | 338/69 ± 0/317      | 197/87 <sup>e</sup>                |
| TE100   |                                   | 38/05 ± 1/273      | 108/75 ± 0/005      | 181/24 ± 0/415      | 363/78 ± 0/265      | 172/95 <sup>h</sup>                |
| TE250   |                                   | 66/18 ± 1/088      | 130/36 ± 0/849      | 312/91 ± 0/357      | 385/55 ± 0/479      | 223/75 <sup>c</sup>                |
| TE500   |                                   | 111/04 ± 0/363     | 158/51 ± 0/849      | 369/99 ± 0/555      | 427/94 ± 0/59       | 266/87 <sup>d</sup>                |
| TE1000  |                                   | 125/92 ± 0/845     | 178/58 ± 0/59       | 388/18 ± 0/47       | 451/27 ± 0/219      | 285/98 <sup>c</sup>                |
| TP500   |                                   | 90/75 ± 0/57       | 185/33 ± 0/289      | 431/246 ± 0/625     | 556/94 ± 0/75       | 316/06 <sup>b</sup>                |
| TP1000  |                                   | 61/18 ± 1/088      | 72/56 ± 0/585       | 332/49 ± 0/835      | 411/81 ± 0/45       | 219/51 <sup>f</sup>                |
|         | میانگین * اعداد تیوباربتوریک اسید | 69/66 <sup>d</sup> | 168/97 <sup>c</sup> | 347/74 <sup>b</sup> | 446/01 <sup>a</sup> |                                    |

\* میانگین اعداد اسید تیوباربتوریک در مجموع هشت تیمار (نمونه شاهد (روغن عاری از آنتی‌اکسیدان) (T0)، روغن حاوی 200 پی پی ام TBHQ (TS)، روغن حاوی 100 پی پی ام (TE100)، 250 (TE250)، 500 (TE500) و 1000 (TE1000) پی پی ام عصاره پوست سبز گردو، روغن حاوی 500 (TP500) و 1000 (TP1000) پی پی ام پودر پوست سبز گردو، برای هر روز در سه تکرار (حروف غیر مشابه در ردیف بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال 0/05 می‌باشند).

\*\* میانگین اعداد اسید تیوباربتوریک در مجموع روزهای صفر، پنجم، دهم و پانزدهم برای هر تیمار در سه تکرار (حروف غیر مشابه در ستون بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال 0/05 می‌باشند).

## • بحث

محیط می‌تواند برخی از پلی ساکاریدهای پکتیکی را از دیواره سلولی استخراج نموده و موجب شکستن دیواره سلولی می‌گردد. 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 (17). این نتیجه با نتایج پژوهش رحیمی پناه و همکاران (29) مطابقت دارد. همچنین در پژوهش صورت گرفته توسط کمالی روستا و همکاران (21) برای استخراج ترکیبات فنولیک عصاره دارچین روش سوکسله راندمان بیشتری نسبت به روش استخراج با حلال سرد داشت. که آنها دلیل آن را مربوط به اثر حرارت در استخراج ترکیبات پلی فنولیک عنوان نمودند.

مقادیر EC50 به دست آمده در این پژوهش با پژوهش Zhang و همکاران (24) و Pereira و همکاران (11) مطابقت دارد. مقایسه مقادیر EC50 برای عصاره پوست سبز گردو و TBHQ نشان می‌دهد که TBHQ دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت به عصاره پوست گردو حاصل از روش سوکسله می‌باشد. در پژوهش صورت گرفته توسط قادری و همکاران (30) نیز آنتی‌اکسیدان BHA فعالیت ضد رادیکالی بیشتری نسبت به عصاره بلوط نشان داد. در پژوهش رضایی ارمی و همکاران (17) میزان EC50 عصاره پوست گردو استخراج شده توسط روش معمول بالاتر از آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی BHA و BHT بود که نشان‌دهنده فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتر

در مطالعه حاضر، میزان ترکیبات فنولیک پوسته سبز گردو در روش سوکسله و خیساندن به ترتیب 89/07 و 38/7 میلی گرم بر گرم بر حسب اسید گالیک و میزان ترکیبات فلاونوئیدی 17/81 و 1/59 میلی‌گرم بر گرم بر حسب کاتچین به دست آمد. میزان پلی فنول‌های استخراج شده از پوسته سبز گردو در پژوهش Oliveira و همکاران (4) در 5 وارسته مختلف گردو بین 74/08 - 32/61 میلی گرم بر گرم نمونه به دست آمد که با نتایج حاصل از این پژوهش مطابقت دارد. همچنین در پژوهش صورت گرفته توسط Carvalho و همکاران (18) میزان پلی فنول‌های پوست سبز گردو توسط حلال متانول و پترولیوم اتر به ترتیب 25/06 و 50/18 میلی‌گرم بر گرم به دست آمد. همان طور که در جدول 2 نشان داده شده است، از نظر میزان ترکیبات فنولی استخراج شده از پوست سبز گردو، بین دو روش استخراج با سوکسله و خیساندن تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال 0/05 وجود دارد. به طوری که میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی استخراج شده به روش سوکسله به ترتیب 2/3 و 11 برابر روش خیساندن می‌باشد. به نظر می‌رسد استفاده از دمای بالا در این روش باعث افزایش راندمان استخراج ترکیبات فنولیک می‌شود. افزایش دمای استخراج فاکتور مهمی در استخراج ترکیبات فنولیک به شمار رفته و با ضریب انتشار ترکیبات فنولیک به داخل حلال مرتبط است. همچنین دمای بالا تخریب بافت ماتریکس را تسهیل نموده و ترکیبات بیشتری در حلال وارد می‌شوند (9). حلال داغ نسبت به حلال با دمای



همان طور که عنوان شد ممکن است مربوط به حضور لیپاز در پوست سبز گردو باشد که باعث لیپولیز چربی شده است. با افزایش غلظت عصاره احتمالاً میزان آنزیم لیپاز بیشتری وارد عصاره شده است.

نتایج اندازه‌گیری عدد پراکسید نشان داد که در روز های آغازین تیمارهای حاوی سطوح مختلف عصاره و پودر اعداد پراکسید نزدیک به هم را نشان می‌دهند در حالی که با گذشت زمان تفاوت بین اعداد پراکسید بیشتر شده که این نتایج با نتایج قره خانی و همکاران (30) مطابقت دارد. همانطور که در جدول 5 نشان داده شده است تا روز 10 آزمایش عدد پراکسید افزایش و پس از آن کاهش می‌یابد. احتمال دارد کاهش عدد پراکسید بعد از روز 10 مربوط به تجزیه هیدروپراکسیدها باشد. Iqbal و همکاران (35) نیز کاهش عدد پراکسید بعد از گذشت زمان را مربوط به تجزیه برخی از محصولات حاصل از تجزیه هیدروپراکسیدها نسبت دادند. هر چند در روز 15 ام همه تیمارها اعداد پراکسید کمتری نسبت به نمونه کنترل نشان می‌دهند. ولی در میان تیمارهای مختلف به ترتیب نمونه حاوی 100، 200 پی پی ام عصاره و سپس نمونه حاوی 1000 پی پی ام پودر کمترین اعداد پراکسید را نشان دادند. با این نتایج می‌توان عنوان نمود استفاده از غلظت‌های کمتر عصاره پوست گردو موثرتر از غلظت‌های بالا می‌باشد. در توضیح علت این پدیده می‌توان این گونه عنوان نمود که احتمالاً غلظت‌های بالاتر عصاره پوست سبز گردو به جای نقش آنتی‌اکسیدانی به عنوان پرواکسیدان یا تشدید کننده اکسیداسیون عمل نموده است (1). پودر در مقایسه با عصاره پوست گردو به دلیل دارا بودن میزان کمتری پلی فنول‌ها مشابه سطوح کم عصاره عمل نموده و اثر آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت به سطوح بالای عصاره نشان می‌دهد.

همان طور که مشاهده می‌شود کلیه تیمارها افزایش مداومی از عدد تیوباربتوریک اسید در طول زمان را نشان می‌دهند. در روزهای ابتدایی مقدار این اندیس بسیار پایین است، زیرا این اندیس در اثر تجزیه هیدروپراکسیدهای تشکیل شده در روزهای اول و تبدیل آنها به آلدئیدها و کتون افزایش می‌یابد (36). در نتیجه با پیشرفت روزهای آزمایش و در روزهای پایانی مقدار این اندیس بیشتر افزایش می‌یابد. به طوری که این افزایش در روز 10 در اکثر تیمارها با شدت بیشتری صورت پذیرفته که نتایج حاصل از آزمون عدد پراکسید نیز آن را تایید می‌نماید. به نظر می‌رسد در روز 10 شکستن هیدروپراکسیدها به محصولات ثانویه اکسیداسیون

آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی نسبت به عصاره استخراج شده می‌باشد که با نتایج حاصل از این مطالعه مطابقت دارد. در حالی که فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی استخراج شده توسط روش ماکروویو قابل رقابت با BHA بود. فنول‌ها به دلیل دارا بودن گروه‌های هیدروکسیل دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشند. بنابراین محتوای ترکیبات فنولی در گیاهان ارتباط مستقیمی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی آنها دارد (24). بسیاری از پژوهشگران رابطه مستقیمی بین محتوای فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی را در میوه‌ها و سبزیجات گزارش نموده اند (33، 18). ارتباط مستقیم غلظت پلی‌فنول با فعالیت آنتی‌اکسیدانی در مطالعه های رضایی ارمی و همکاران (14) بر روی پوست گردو، و Oliveira و همکاران (31) بر روی برگ فندق، Ma و همکاران (32) و Oliveira و همکاران (4) بر روی پوست گردو، نشان داده شده است. نتایج ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره توسط روش بازدارگی رادیکال DPPH (شکل 1) نشان داد که با افزایش غلظت عصاره به ویژه در غلظت‌های کمتر از 0/2 میلی گرم بر میلی لیتر، درصد بازدارندگی رادیکال DPPH شدت می‌یابد که دلیل آن مربوط به افزایش ترکیبات فنولی موجود در عصاره می‌باشد. احتمالاً در غلظت‌های خیلی بالا به دلیل پیدایش نوعی حالت اشباع شدگی، افزایش غلظت تأثیر معنی‌داری بر میزان مهار رادیکال‌های آزاد ندارد. این نتایج نشان می‌دهد یک غلظت بحرانی از ترکیبات فنولیک برای مهار رادیکال‌های آزاد کافی است (33). Pereira و همکاران (11) نیز نشان دادند که در غلظت‌های پایین ارتباط مستقیمی بین غلظت ترکیبات فنولیک و فعالیت آنتی‌اکسیدانی مشاهده می‌شود در حالی که در غلظت‌های بالا مشابه نتایج این پژوهش منحنی میزان بازدارگی رادیکال DPPH در غلظت‌های مختلف به صورت خط راستی در می‌آید.

مقایسه عدد اسیدی بین نمونه کنترل و نمونه‌های مختلف حاوی سطوح مختلف پودر و عصاره گردو نشان داد افزودن این ترکیبات باعث افزایش عدد اسیدی نسبت به نمونه کنترل می‌شود. دلیل آن ممکن است مربوط به حضور رطوبت در نمونه‌های حاوی عصاره در نتیجه تبخیر ناقص حلال و یا حضور آنزیم لیپاز در پوست گردو باشد. مطالعات (34، 33) نشان داده است که گردو حاوی آنزیم‌های لیپوکسی ژناز و لیپاز بوده که سرعت واکنش‌های اکسیداسیون و لیپولیز را تشدید می‌سازد. مقایسه اثر سطوح مختلف پودر و عصاره پوست سبز گردو بر عدد اسیدی نشان می‌دهد که با افزایش غلظت عصاره پوست سبز گردو عدد اسیدی افزایش می‌یابد که

پژوهش نشان می‌دهد استفاده از پوست سبز گردو به عنوان یک محصول جانبی و ارزان قیمت به دلیل دارا بودن مقدار بالایی از ترکیبات پلی فنولی به عنوان منبع آنتی‌اکسیدانی مورد استفاده قرار گیرد.

**سپاسگزاری:** نویسندگان این مقاله بر خود لازم می‌دانند از سرکار خانم دکتر رویا کریمیان عضو محترم هیئت علمی دانشگاه بوعلی سینا همدان، به دلیل در اختیار گذاشتن امکانات آزمایشگاهی برای انجام برخی آزمون‌های این پژوهش تشکر و قدردانی نمایند.

صورت پذیرفته و بنابراین عدد تیوباربتوریک اسید که نشان دهنده محصولات ثانویه اکسیداسیون می‌باشد افزایش بیشتری را نشان می‌دهد. مقایسه تیمارهای مختلف نشان داد افزودن عصاره و پودر سبز گردو باعث کاهش عدد TBA نسبت به نمونه شاهد می‌شود و همان طور که نتایج آزمون عدد پراکسید نشان داد کمترین عدد TBA بعد از 15 روز مربوط به نمونه حاوی 100 پی پی ام عصاره پوست سبز گردو به دست آمد. بنابراین نتایج آزمون عدد پراکسید و TBA غلظت 100 پی پی ام عصاره را مناسب‌ترین غلظت با بالاترین اثر آنتی‌اکسیدانی معرفی می‌نماید. در جمع‌بندی کلی نتایج این

## • References

- Wanasundara PKJPD, Shahidi F. Antioxidants: science, technology, and applications. In: Shahidi F. Bailey's industrial oil and fat products. 6<sup>th</sup> ed; Memorial University of Newfoundland: A John Wiley & Sons, 2005. P. 430-38.
- Sariri R. Antioxidant activity exhibited by medicinal plants, vegetables and fruits from North of Iran. Research Signpost 2012; 37/661(2): 205-236.
- Besbes S, Blecker C, Deroanne C, Bahloul N, Lognay G, Drira NE, et al. Date seed oil: phenolic, tocopherol and sterol profiles. J Food Lipids 2004; 11: 251-65.
- Oliveira I, Sousa A, Ferreira CFR, Bento A, Estevinho L, Pereira JA. Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. Food Chem Toxicol 2008; 46: 2326-2331.
- Abdalla A E, Roozen JP. Effect of plant extracts on the oxidative stability of sunflower oil and emulsion. Food Chem 1999; 64: 323-329.
- No name. Walnut distribution in Iran. *Coordination center of science and technology of walnut*. URL: www.kicc-walnut.ir/Upload/iran.pdf. Accessed 2014 November 4 [in Persian].
- Ahmadvand H, Khosrobeigi A, Shahsavari G, Abdolahpour F, Bagheri S, Rahidour M. Inhibitory effect of walnut (*Juglans regia* L.) husk hydroalcoholic extract on LDL oxidation *in Vitro*. Journal of Jahrom University of Medical Sciences 2011; 9: 3: 1-7 [in Persian].
- Zhang Z, Liao L, Moore J, Wu T, Wang Z. Antioxidant phenolic compounds from walnut kernels (*Juglans regia* L.). Food Chem 2009; 113: 160-165.
- Fernandez-Agullo A, Pereira E, Freire MS, Valentao P, Andrade P B, Gonzalez-Alvarez J, Pereira J A. Influence of solvent on the antioxidant and antimicrobial properties of walnut (*Juglans regia* L.) green husk extracts. Ind Crop Prod 2013; 42: 126-132.
- Amaral J S, Seabra RM, Andrade PB, Valentao P, Pereira JA, Ferreres F. Phenolic profile in the quality control of walnut (*Juglans regia* L.) leaves. Food Chem 2004; 88: 373-379.
- Pereira J A, Olivria I, Sousa A, Valentao P, Andrade P.B, Ferreira ICFR, et al. Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: Phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. Food Chem Toxicol 2007; 45: 2287-2295.
- Qa dan F, Theaini AJ, Ali DA, Afifi R, Elkhawad A, Mataka K Z. The Antimicrobial Activities of *Psidium guajava* and *Juglans regia* Leaf Extracts to Acne-Developing Organisms. Am J Chin Med 2005; 33: 2: 197-204.
- Sharafati Chaleshtori R, Sharafati Chaleshtori F, Rafieian M. Biological characterization of Iranian walnut (*Juglans regia*) Leaves. Turk J Biol 2011; 35: 635-639.
- Rezai Erami S, Jafari SM, Khomeiri M, Bayat H. Extraction of walnut leaves extracts with microwave assisted extraction and evaluation of antioxidant properties of phenolic compounds. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 2013; 29(4): 879-898 [in Persian].
- Mahoney N, Molyneux R J, Campbell BC. Regulation of Aflatoxin Production by Naphthoquinones of Walnut (*Juglans regia*). J Agric Food Chem 2000; 48: 4418-4421.
- Stamper F, Solar A, Hundia M, Veberic R, Colaric M. Traditional walnut liqueur – cocktail of phenolics. Food Chem 2006; 95: 627-631.
- Rezai Erami S, Jafari SM, Khomeiri M, Bayat H. Antioxidant activity of toyserkani variety of walnut husk and comparison of its antiradical activity with synthetic antioxidants. Food Industrial Researches 2011; 22(1): 39-50 [in Persian].
- Carvalho M, Ferreira P J, Mendes VS, Silva R, Pereira JA, Jeronimo C, et al. Human cancer cell antiproliferative and antioxidant activities of *Juglans regia* L. Food Chem Toxicol 2010; 48: 441-447.
- Iqbal S, Haleem S, Akhtar M, Zia-ul-Haq M, Akbar J. Efficiency of pomegranate peel extracts in stabilization of sunflower oil under accelerated conditions. Food Res Int 2008; 41: 194-200.

20. Adam Mariod A, Ibrahim RM, Ismail M, Ismail N. Antioxidant activity of the phenolic leaf extracts from *Monechma ciliatum* in stabilization of corn oil. *J Am Oil Chem Soc* 2010; 87: 35-43.
21. Kamaliroosta L, Ghavami M, Gharachorloo M, Azizinezhad, R. Isolation of cinnamon extract and assessing its effect on the stability of sunflower oil. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology* 2010; 6 (1): 13-22 [in Persian].
22. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Meth. Enzymol* 1999; 299:152-178.
23. Barreira JCM, Ferreira ICFR, Oliveiram MBPP, Pereira JA. Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and fruit. *Food Chem* 2008; 107: 1106-1113.
24. Zhang Y, Yang L, Zu Y, Chen X, Wang F, Liu, F. Oxidative stability of sunflower oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during accelerated storage. *Food Chem* 2010; 118: 656-662.
25. Samadloyi HR, Azizi MH, Barzegar M. Antioxidative effect of pomegranate seed phenolic components on soybean oil. *J Agric Sci Natur Resour* 2007; 14(4): 1-8 [in Persian].
26. Serbetci T, Ozsoy N, Demirci B, Can A, Kulyur S, Can Baser K H. Chemical composition of the essential oil and antioxidant activity of methanolic extracts from fruits and flowers of *Hypericum lydium* Boiss. *Ind Crop Prod* 2012; 36: 599-606.
27. Official Methods and Recommended Practices of American Oil Chemists' Society, edited by David Firestone, Vol. 1., Method Cd 8-53. 15th ed. Washington, DC, USA: AOAC, 1990.
28. Buranasompob A, Tangm J, Powers JR, Reyes J, Clark S, Swanson BG. Lipxygenase activity in walnuts and almonds. *LWT* 2007; 40: 893-899.
29. Rahimipناه M, Hamed M, Mirzaour M. Analysis of some factors affecting the phenolic compounds extracted from green husk of walnut (*Juglans regia* L.). *IJMAPR* 2011; 27: (3) 419-430 [in Persian].
30. Ghaderi Ghahfarokhi, M., Sadeghi Mahoonak, A. R., Alami, M., Azizi, M. H., Ghorbani, M. Study on antioxidant activities of phenolic extracts from fruit of a variety of Iranian acorn (*Q. castaneifolia* var *castaneifolia*). *JFST* 2012; 35(9) 45-56 [in Persian].
31. Oliveira I, Sousa A, Valentao P, Andrade PB, Ferrira ICFR, et al. Hazel (*Corylus avellana* L.) leaves as source of antimicrobial and antioxidative compounds. *Food Chem* 2007; 105: 1018-1025.
32. Ma X, Wei Q, Zhang S, Shi L, Zhao Z. Isolation and bioactivities of organic acids and phenols from walnut shell pyrolygneous acid. *J Anal Appl Pyrolysis* 2011; 91: 338-343.
33. Ling B, Hou L, Li R, Wang S. Thermal treatment and storage condition effects on walnut paste quality associated with enzyme inactivation. *LWT Food Science and Technology* 2014; 59: 786-793.
34. Gharakhani M, Ghorbani M, Gharakhani A, Sadeghi Mahoonak A, Jebraeeli S, Ghasemi Y. The effects of extracts of orange skin and flesh of the leg on the inhibition of soybean oil oxidation. *J MP* 2010; 10 (2): 55-66 [in Persian].
35. Iqbal S, Bhanger M I. Stabilization of sunflower oil by garlic extract during accelerated storage. *Food Chem* 2007; 100: 246-254.
36. Salmanian S, Sadeghi Mahoonak AR, Alami M, Ghorbani M. Antioxidant activity of hawthorn (*Crataegus elbursensis*) extract on stability of soybean oil. *J FR* 2013; 23 (2) 199-209 [in Persian].

## Study on the Antioxidant Effects of Extract and Powder of Green Walnut Hulls on the Oxidation of Sunflower Oil

Noshirvani N<sup>\*1</sup>, Fasihi H<sup>2</sup>, Moradipayam A<sup>3</sup>

1- *\*Corresponding author: PhD Student in Food Science & Technology, Young Reseachers & Elite Club, Hamedan Branch, Islamic Azad University, Hamedan, Iran, Email: nooshin\_noshirvani87@yahoo.com*

2- *PhD student in Biochemistry, Institute of Applied Scientific of Jihad Agriculture, Hamedan, Iran*

3- *Graduated in M.Sc of Plant Breeding, Institute of Applied Scientific of Jihad Agriculture, Hamedan, Iran*

Received 21 Nov, 2014

Accepted 24 Feb, 2015

**Background and Objectives:** One way to protect the oil against oxidation is using antioxidants. Since the most used synthetic antioxidants are harmful to health, due to safety concerns, there is an increasing trend among food scientists to replace synthetic antioxidants with natural ones, which, in general, are supposed to be safer. Walnut hulls, due to having high antioxidant effects, is a good choice as a natural antioxidant. The aim of this study, is investigation of the antioxidant effects of the extract and powder of green walnut hull on the oxidation of sunflower oil.

**Materials & Methods:** Green walnut hull extract was prepared with Maceration and Soxhlet extraction methods and the amount of phenolic compounds and antioxidant activity, respectively, was determined by Folin-Ciocalteu and DPPH radical trap methods. Antioxidant effects of different concentrations (100, 250, 500 and 1000 mg/kg) of green hull extract and powder (500 and 1000 mg/kg) were compared with the control and artificial antioxidant TBHQ in the maximum limit amount (200 mg/kg) through evaluation of acidity, peroxide value and thiobarbituric (TBA) on days 0, 5, 10 and 15 days of storage at 70°C.

**Results:** The amount of total phenolics and flavonoids for Maceration method was 17.81 and 1.59 and for Soxhlet method was 98.07 and 38.7, respectively, on the basis of gallic acid and catechin (mg/g sample) for phenols and flavonoids obtained. The walnut hulls' EC50 was 0.15 mg/ml. The data showed that peroxide value and thiobarbituric oxidation rate increase over time, but the samples containing extract and powder of walnut hulls compared to the control in most concentrations showed less oxidation. The use of high concentrations of green walnut hull extract increased oil oxidation, and the best result was obtained for 100 mg/kg that could well slow the oxidation process and compete with TBHQ at 200 mg/kg.

**Conclusion:** Soxhlet extraction method leads to higher levels of polyphenols than the Maceration method. Less concentration of green hull extract is more effective than higher concentrations in reducing oxidation. Green walnut hull is presented as a source of high antioxidant effect with low price to replace with synthetic antioxidants.

**Keywords:** Oxidation, Sunflower oil, Natural antioxidant, Green walnut hull extract