

اثرات آنتی اکسیدانی عصاره و پودر پوست سبز گردو بر اکسیداسیون روغن آفتابگردان

نوشین نوشیروانی¹، هادی فصیحی²، علی مرادی پیام³

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 آنتی اکسیدان یکی از راه‌های محافظت روغن از اکسیداسیون می‌باشد. از آنجایی که اکثر آنتی اکسیدان‌های 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 آنتی اکسیدانی بالا، به عنوان یک گزینه مناسب به شمار می‌رود. لذا هدف از این پژوهش بررسی اثرات آنتی اکسیدانی 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 آنتی اکسیدانی آن به ترتیب توسط روش‌های فولین-سیوکالتو و به دام اندازی رادیکال DPPH ارزیابی شد. اثرات آنتی اکسیدانی 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 آنتی اکسیدان 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 میلی گرم بر گرم نمونه و میزان ترکیبات فلاونوئید برای دو روش به ترتیب 1/59 و 38/7 بر حسب کاتچین بر اساس میلی گرم بر گرم به دست آمد. میزان EC50 پوست سبز گردو 0/15 میلی گرم بر میلی لیتر 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.

نتیجه گیری: روش سوکسله باعث استخراج میزان بالاتری از پلی فنول 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 آنتی اکسیدانی بالا و ارزان به عنوان جایگزین آنتی اکسیدان‌های سنتزی معرفی می‌شود.

واژگان کلیدی: اکسیداسیون، روغن آفتابگردان، آنتی اکسیدان طبیعی، عصاره پوست سبز گردو

• مقدمه

جلوگیری از اکسیداسیون لیپیدها و یا حفاظت در برابر آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد، استفاده از آنتی اکسیدان‌ها می‌باشد (1). آنتی اکسیدان‌های 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 می شود (7). استفاده از این محصول فرعی به عنوان منبعی از آنتی اکسیدان ها باعث افزایش میزان ارزش افزوده تولید گردو می شود لذا می توان با ساماندهی و صنعتی کردن کاربرد آن مواد بسیار با ارزشی به دست آورد. فعالیت آنتی اکسیدانی گردو توسط مطالعات متعددی به اثبات رسیده است. به عنوان مثال فعالیت آنتی اکسیدانی مغز گردو توسط Zhang و همکاران (8) نشان داده شده است. سایر مشتقات گردو نیز دارای ویژگی آنتی اکسیدانی بوده و استفاده از محصولات فرعی و ضایعات حاصل از آن کمک زیادی به اقتصاد و حفظ محیط زیست می نماید. 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 نارسایی های وریدی، بواسیر و غیره از قدیم مورد استفاده قرار می گرفته است (10). نتایج مطالعه Pereira و همکاران نشان داد برگ گردو به عنوان ترکیبی با ویژگی های آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی می تواند مطرح باشد (11). حضور ترکیباتی نظیر نفتاکیتون، فلاونوئیدها و ژاگلون از ترکیبات مهم آنتی اکسیدانی برگ گردو به شمار می روند. ژاگلون یکی از مهمترین ترکیبات فنولیک موجود در گردو دارای فعالیت آنتی اکسیدانی قوی می باشد (12). Amaral و همکاران (10) حضور پلی فنول و فلاونوئیدها 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 می تواند 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 می باشد. آنها فعالیت ضد میکروبی برگ گردو را به دلیل وجود تانن ها، تری پنوئیدها و فلاونوئید 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 آنتی اکسیدانی را نشان می دهد.

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 نفتا کینون) شناخته شده ترین ترکیب فنولیک موجود در برگ

هیدروکسی آنیزول (BHA) به طور گسترده ای در صنعت غذا مصرف می شوند. هر چند استفاده از آنها به دلیل خطرات احتمالی نظیر سرطان زایی و سمی بودن محدود شده است (2). لذا مصرف کنندگان تمایل به استفاده از افزودنی های طبیعی و سالم دارند (3). از آنجایی که آنتی اکسیدان های سنتزی در مقایسه با گیاهی دارای ساختار پیچیده ای می باشند مدت زمان طولانی تری برای بازیافت و بازگشت آنها به طبیعت مورد نیاز است و بنابراین آلاینده محیط زیست به شمار می روند (4). همچنین اکثر آنتی اکسیدان های سنتزی مورد استفاده نظیر BHA و BHT فرار بوده و به سادگی در دماهای بالا تجزیه می شوند (5). با توجه به موارد ذکر شده تلاش برای یافتن جایگزین مناسب برای این ترکیبات ضروری به نظر می رسد.

گردو یکی از مهمترین خشکباری است که به شکل گسترده در سراسر جهان کشت می شود. 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 مقام های 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 می شود، سالانه رقمی معادل 240 هزار تن پوست سبز گردو به دست می آید. پوست سبز گردو به دلیل وجود مواد رنگی از سالیان گذشته برای تهیه جوهر و رنگ های طبیعی مورد استفاده قرار گرفته است. با توجه به این که بیشتر صنایع تهیه رنگ پرهزینه بوده و موجب آلودگی محیط زیست می شود، با استفاده از پوست سبز گردو به عنوان منبع ارزان قیمت در تهیه رنگ می توان 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 می شود. پوست گردو به عنوان منبع مقرون به صرفه ای برای تهیه ژاگلون می باشد که ژاگلون می تواند 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- تیوباربیتوریک 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 قهوه‌ای 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 (19، 20، 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 (11، 15). 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، الاحیک 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 گونه‌ای 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 آنتی اکسیدان سنتزی TBHQ در حلال متانول تهیه شد. 0/3 میلی لیتر از محلول های تهیه شده با 2/7 میلی لیتر 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 اندازه گیری شد. فعالیت به دام اندازی رادیکالی توسط رابطه 1 محاسبه شد (23، 24):

رابطه 3

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

که در این رابطه A_C و A_S به ترتیب جذب کنترل و جذب نمونه می باشند.

بررسی اثر آنتی اکسیدانی عصاره و پودر پوست گردو حاصل از روش سوسکله در روغن آفتابگردان: به منظور بررسی اثر آنتی اکسیدانی 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 آنتی اکسیدان استفاده شد. همچنین آنتی اکسیدان سنتزی TBHQ در سطح 200 پی پی ام به روغن آفتابگردان بدون آنتی اکسیدان اضافه شده و یک نمونه فاقد آنتی اکسیدان 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°C نگهداری شده و عدد اسیدی، عدد پراکسید و عدد اسید تیوباربتوریک روغن آفتابگردان در روزهای 0، 5، 10 و 15 در سه تکرار اندازه گیری شد (25، 17). انتخاب دمای 70°C مطابق پژوهش Adam Mariod و همکاران (20) به دلیل آن است که در دماهای بالاتر از 70°C پراکسیدها بسیار سریع تجزیه می شوند.

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

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

a: میلی لیتر محلول هیدروکسید پتاسیم بکار رفته، N: نرمالیت 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 میلی لیتر حلال (30 میلی لیتر آب مقطر و 90 میلی لیتر 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°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 پتريدیش منتقل شده و در آون با دمای 38°C قرار داده شد. پس از گذشت 48 ساعت عصاره خشک از داخل پتريدیش ها جمع آوری نموده و تا پایان دوره آزمایش در ظرف شیشه ای قهوه ای رنگ و در دمای یخچال (حدود 4°C) نگهداری شد.

آزمون های صورت گرفته بر روی عصاره پوست سبز گردو

اندازه گیری میزان ترکیبات فنولی: اندازه گیری فنول ها 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).

$$Y = \text{جذب خوانده شده} \quad X = \text{میزان فنول}$$

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

اندازه گیری میزان ترکیبات فلاونوئیدی: اندازه گیری ترکیبات فلاونوئیدی توسط روش رنگ سنجی 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).

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

$$Y = \text{جذب خوانده شده} \quad X = \text{میزان فلاونوئید}$$

میزان به دام اندازی رادیکال های آزاد DPPH: غلظت های 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 ^a	7/38 ± 0/15 ^a	مقدار ترکیبات فنولیک
		(میلی گرم اسید گالیک بر گرم نمونه)
17/81 ± 0/38 ^b	1/59 ± 0/11 ^b	مقدار ترکیبات فلاونوئیدی
		(میلی گرم کاتچین بر گرم نمونه)

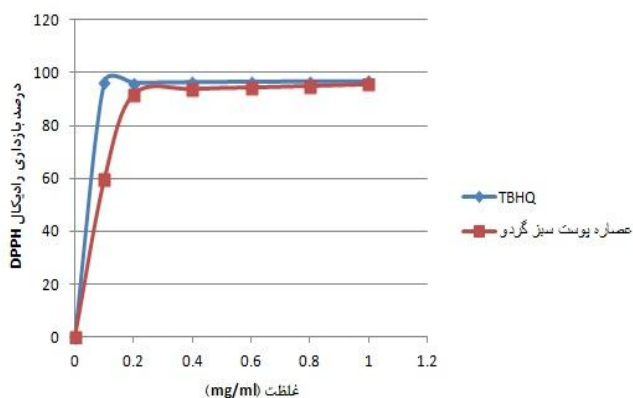
حروف غیر مشابه درون یک سطر بیانگر اختلاف معنی دار است (P<0/05)

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% بازدارندگی (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.

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

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 تیوباربیتوریک: عدد تیوباربیتوریک 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 معنی دار ندارند، بقیه تیمارها دارای اختلاف معنی دار بوده و بالاترین مقدار عدد اسیدی مربوط به تیمار TE1000 با مقدار 0/213 می باشد (جدول 4). پس از نمونه کنترل نمونه TE 100 کمترین عدد اسیدی را نشان می دهد. همان طور که مشاهده می شود 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 می دهد. بنابراین، مشخص می شود 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 می دهد که اثر زمان، تیمارهای اعمال شده و اثر متقابل زمان در تیمار روی تغییرات عدد اسیدی در سطح 1 درصد معنی دار می باشد (جدول 3). مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون دانکن نشان می دهد که بین هر 4 زمان مورد بررسی از نظر عدد اسیدی اختلاف معنی دار وجود داشته (جدول 4) و بالاترین مقدار عدد اسیدی (0/352) مربوط به طول دوره 15 روزه می باشد. گروه بندی دانکن بین تیمارهای مورد بررسی نشان می دهد 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				
منابع تغییر	درجه آزادی	عدد اسیدی	پراکسید	تیوباربتوریک
R	2	0/00000097	0/3073	1/100
Day	3	0/5567 **	113650/47 **	642233/02 **
R*Day	6	0/00000076	0/7785	0/5207
T	7	0/0303 **	7573/78 **	73806/62 **
Day*T	21	0/0215 **	2295/26 **	6193/91**
R*T	14	0/00000275	1/127	0/3364
Error	42	0/000188	0/7166	0/5026
درصد ضریب تغییرات		1/62	0/67	0/27

** معنی دار 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 ^s
TS		0/017 ± 0/0032	0/019 ± 0/0014	0/111 ± 0/0003	0/311 ± 0/0005	0/114 ^e
TE100		0/018 ± 0/0032	0/043 ± 0/0013	0/072 ± 0/0004	0/228 ± 0/0005	0/09 ^f
TE250		0/031 ± 0/0004	0/05 ± 0/0012	0/092 ± 0/0003	0/441 ± 0/0005	0/153 ^c
TE500		0/021 ± 0/0004	0/052 ± 0/0011	0/105 ± 0/0003	0/522 ± 0/001	0/175 ^b
TE1000		0/03 ± 0/0004	0/59 ± 0/001	0/141 ± 0/0003	0/623 ± 0/0015	0/213 ^a
TP500		0/024 ± 0/0028	0/028 ± 0/0009	0/12 ± 0/0003	0/386 ± 0/0005	0/139 ^d
TP1000		0/017 ± 0/0037	0/019 ± 0/0009	0/106 ± 0/0002	0/225 ± 0/0005	0/091 ^f
	میانگین * اعداد اسیدی	0/024 ^d	0/04 ^c	0/101 ^b	0/352 ^a	

* میانگین اعداد اسیدی در مجموع هشت تیمار (نمونه شاهد (روغن عاری از آنتی اکسیدان) (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 معنی دار در سطح احتمال 0/05 می باشند).

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

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 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 آون 70°C نگهداشته شده و عدد پراکسید در طول دوره 15 روزه اندازه گیری 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 ^d
TS		21/63 ± 0/8	146/5 ± 0/309	151/09 ± 0/36	150/85 ± 0/27	117/51 ^e
TE100		20/58 ± 0/883	84/35 ± 1/173	195/72 ± 0/427	95/4 ± 0/17	99/01 ^f
TE250		38/92 ± 0/494	95/4 ± 0/784	224/29 ± 0/415	112/11 ± 0/2	117/68 ^e
TE500		53/68 ± 0/407	120/8 ± 0/34	262/95 ± 0/505	138/05 ± 0/255	143/87 ^b
TE1000		71/04 ± 0/543	159/77 ± 0/772	302/32 ± 0/585	161/73 ± 0/32	173/715 ^a
TP500		56/12 ± 0/671	118/44 ± 0/33	189/92 ± 0/37	165/41 ± 0/31	132/47 ^c
TP1000		19/35 ± 1/016	90/62 ± 0/249	148/12 ± 0/355	126/38 ± 0/235	96/11 ^g
میانگین [*] اعداد پراکسید		40/66 ^d	120/82 ^c	208/95 ^a	130/45 ^b	

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

* میانگین اعداد اسید تیوباربتوریک در مجموع هشت تیمار (نمونه شاهد (روغن عاری از آنتی اکسیدان) (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 معنی دار در سطح احتمال 0/05 می باشند).

** 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 معنی دار در سطح احتمال 0/05 می باشند).

• بحث

محیط می تواند برخی از پلی ساکاریدهای پکتیکی را از دیواره سلولی استخراج نموده و موجب شکستن دیواره سلولی می گردد. دماهای بالا قطبیت حلال را کاهش داده و بنابراین توانایی حل کردن ترکیباتی با قطبیت کمتر بهبود می یابد. افزایش دما همچنین کشش سطحی و ویسکوزیته حلال را کاهش داده و سرعت انتشار و سرعت انتقال جرم را در حین استخراج افزایش می دهد (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 می دهد که TBHQ دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتری نسبت به عصاره پوست گردو حاصل از روش سوکسله می باشد. در پژوهش صورت گرفته توسط قادری و همکاران (30) نیز آنتی اکسیدان 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 آنتی اکسیدان های سنتزی BHA و BHT بود که نشان دهنده فعالیت آنتی اکسیدانی 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 فلاوونوئیدی 17/81 و 1/59 میلی گرم بر گرم بر حسب کاتچین به دست آمد. میزان پلی فنول های استخراج شده از پوسته سبز گردو در پژوهش Oliveira و همکاران (4) در 5 واریته 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 فنول های پوست سبز گردو توسط حلال متانول و پترولیوم اتر به ترتیب 25/06 و 50/18 میلی گرم 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 معنی داری در سطح احتمال 0/05 وجود دارد. به طوری که میزان ترکیبات فنولی و فلاوونوئیدی استخراج شده به روش سوکسله به ترتیب 2/3 و 11 برابر روش خیساندن می باشد. به نظر می رسد استفاده از دمای بالا در این روش باعث افزایش راندمان استخراج ترکیبات فنولیک می شود. 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 می شوند (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 اندازه گیری عدد پراکسید نشان داد که در روز های آغازین تیمارهای حاوی سطوح مختلف عصاره و پودر اعداد پراکسید نزدیک به هم را نشان می دهند 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 می یابد. 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 می دهند. 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 می توان عنوان نمود استفاده از غلظت های کمتر عصاره پوست گردو موثرتر از غلظت های بالا می باشد. در توضیح علت این پدیده می توان این گونه عنوان نمود که احتمالاً غلظت های بالاتر عصاره پوست سبز گردو به جای نقش آنتی اکسیدانی 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 فنول ها مشابه سطوح کم عصاره عمل نموده و اثر آنتی اکسیدانی بالاتری نسبت به سطوح بالای عصاره نشان می دهد.

همان طور که مشاهده می شود کلیه تیمارها افزایش مداومی از عدد تیوباربتوریک اسید در طول زمان را نشان می دهند. 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 می یابد (36). در نتیجه با پیشرفت روزهای آزمایش و در روزهای پایانی مقدار این اندیس بیشتر افزایش می یابد. 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 می نماید. به نظر می رسد در روز 10 شکستن هیدروپراکسیدها به محصولات ثانویه اکسیداسیون

آنتی اکسیدان های سنتزی نسبت به عصاره استخراج شده می باشد که با نتایج حاصل از این مطالعه مطابقت دارد. در حالی که فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره اتانولی استخراج شده توسط روش ماکروویو قابل رقابت با BHA بود. فنول ها به دلیل دارا بودن گروه های هیدروکسیل دارای فعالیت آنتی اکسیدانی می باشند. بنابراین محتوای ترکیبات فنولی در گیاهان ارتباط مستقیمی با خاصیت آنتی اکسیدانی آنها دارد (24). بسیاری از پژوهشگران رابطه مستقیمی بین محتوای فنولی و فعالیت آنتی اکسیدانی را در میوه ها و سبزیجات گزارش نموده اند (33، 18). ارتباط مستقیم غلظت پلی فنول با فعالیت آنتی اکسیدانی 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 آنتی اکسیدانی عصاره توسط روش بازدارندگی رادیکال DPPH (شکل 1) نشان داد که با افزایش غلظت عصاره به ویژه در غلظت های کمتر از 0/2 میلی گرم بر میلی لیتر، درصد بازدارندگی رادیکال DPPH شدت می یابد که دلیل آن مربوط به افزایش ترکیبات فنولی موجود در عصاره می باشد. احتمالاً در غلظت های خیلی بالا به دلیل پیدایش نوعی حالت اشباع شدگی، افزایش غلظت تأثیر معنی داری بر میزان مهار رادیکال های آزاد ندارد. این نتایج نشان می دهد یک غلظت بحرانی از ترکیبات فنولیک برای مهار رادیکال های آزاد کافی است (33). Pereira و همکاران (11) نیز نشان دادند که در غلظت های پایین ارتباط مستقیمی بین غلظت ترکیبات فنولیک و فعالیت آنتی اکسیدانی مشاهده می شود در حالی که در غلظت های بالا مشابه نتایج این پژوهش منحنی میزان بازدارندگی رادیکال DPPH در غلظت های مختلف به صورت خط راستی در می آید.

مقایسه عدد اسیدی بین نمونه کنترل و نمونه های مختلف حاوی سطوح مختلف پودر و عصاره گردو نشان داد افزودن این ترکیبات باعث افزایش عدد اسیدی نسبت به نمونه کنترل می شود. دلیل آن ممکن است مربوط به حضور رطوبت در نمونه های 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 آنزیم های لیپوکسی ژناز و لیپاز بوده که سرعت واکنش های اکسیداسیون و لیپولیز را تشدید می سازد. مقایسه اثر سطوح مختلف پودر و عصاره پوست سبز گردو بر عدد اسیدی نشان می دهد که با افزایش غلظت عصاره پوست سبز گردو عدد اسیدی افزایش می یابد 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 آنتی اکسیدانی 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 آنتی اکسیدانی 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. 6th 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, Abdolapour 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, Olivwria 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, Matalka 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, Oliveiramb 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 lydiu*m 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, Ferreira 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 pyrolytic 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, Jebraeli 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^{*1}, Fasihi H², Moradipayam A³

1- **Corresponding author: PhD Student in Food Science & Technology, Young Researchers & 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