DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijmapr.2014.4312

فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲۹، شمارهٔ ٤، صفحهٔ ۸۹۸-۸۷۹ (۱۳۹۲)

استخراج عصاره برگ گردوی بومی ایران با امواج مایکروویو و بررسی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی ترکیب‌های فنولی حاصل

سمیه رضایی ارمی[۱]، سید مهدی جعفری[۲*]، مرتضی خمیری[۳] و هومان بیات[٤]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۲*- نویسنده مسئول، استادیار، گروه مهندسی مواد و طراحی صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
پست‌الکترونیک: smjafari@gau.ac.ir
۳- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
٤- دکترای داروسازی، شرکت داروسازی نیاک، گرگان

تاریخ دریافت: مهر ۱۳۹۰ تاریخ اصلاح نهایی: اسفند ۱۳۹۰ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۰

چکیده

امروزه به‌دلیل اثرات نامطلوب آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی، تمایل روزافزونی به استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی وجود دارد. در این پژوهش ترکیب‌های فنولی برگ گردوی رقم شهمیرزادی به دو روش سنتی و مایکروویو استخراج گردید. در روش سنتی، استخراج با حلال‌های متانول۸۰٪، اتانول ۵۰٪، آب داغ و آب با دمای محیط (٦، ۱۲، ۱۸ و ٢٤ ساعت) و در روش مایکروویو با حلال‌های متانول ۸۰٪، اتانول ۵۰٪ (۲، ٤، ٦ و ۸ دقیقه) و آب داغ (زمان‌های ۳، ٦ و ۹ دقیقه) انجام شد. مقدار فنول کل با روش فولین سیوکالتو ارزیابی شد. بیشترین مقدار فنول کل در استخراج با امواج مایکروویو مربوط به عصاره متانولی (۰/۹۱ ± ۱۳۰/۱٦ میلی‌گرم معادل گالیک‌اسید بر گرم عصاره خشک) بود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با روشهای مهار رادیکال آزاد ۲ و ۲ دی‌فنیل ۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH)، قدرت احیاکنندگی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل ارزیابی شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی در همه روشها وابسته به غلظت بود. بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در آزمون مهار رادیکال DPPH و نیروی احیاکنندگی مربوط به عصاره اتانولی و در آزمون ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل مربوط به عصاره متانولی بود. در نهایت تأثیر عصاره متانولی در ممانعت از اکسیداسیون روغن سویا بررسی شد. نتایج نشان داد که عصاره‌ها توانایی جلوگیری از تولید محصولات اولیه و ثانویه اکسیداسیون را داشتند و غلظت ۱۰۰۰ppm عصاره به خوبی اکسیداسیون روغن را کنترل کرد. با توجه به نتایج این تحقیق می‌توان برگ گردوی شهمیرزادی را به‌عنوان منبع قابل‌توجهی از ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی مطرح نمود.

واژه‌های کلیدی: برگ گردو، نیروی احیاکنندگی، فنول کل، روغن سویا.

مقدمه

برگ گردو یک منبع بالقوه از ترکیب‌های محافظ سلامت می‌باشد و به‌طور وسیع در طب سنتی برای درمان نارسایی وریدی و بیماری بواسیر بکار می‌رود. همچنین ضداسهال، ضدکرم روده، ضدقارچ، کاهنده قند و فشارخون می‌باشد. در واقع برگ گردو حاوی مقادیر قابل‌توجهی ترکیب‌های پلی‌فنولی می‌باشد (Pereira *et al.*, 2007). اخیراً علاقه فزاینده‌ای به سمت ترکیب‌های فیتوشیمیایی به‌عنوان منبعی

غنی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی بوجود آمده‌است. هدف استفاده از این ترکیب‌ها در صنایع غذایی و دارویی، جایگزینی آنها با آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی می‌باشد که برای سلامتی بشر خطر دارند. در سال‌های اخیر استفاده از امواج مایکروویو در استخراج نتایج ارزنده‌ای داشته‌است. این روش باعث افزایش بازده استخراج در زمان کمتر و با استفاده از حلال کمتر، افزایش مقدار ترکیب‌های استخراج شده و آسیب کمتر به محیط زیست می‌گردد (Mandal *et al.*, 2007). تأثیر بهتر امواج مایکروویو را می‌توان مرتبط با اثرات مکانیکی گرم شدن داخلی دانست که بر مبنای هدایت و قطبش‌پذیری دی‌الکتریک در اثر تابش‌دهی با مایکروویو می‌باشد. در نتیجه فشار ایجاد شده درون سلول‌های نمونه منجر به انتقال مؤثر و کارایی این انرژی به مواد گیاهی می‌گردد که این انتقال از طریق برهم‌کنش مولکولی با میدان الکترومغناطیسی و انتقال سریع انرژی به حلال و مواد گیاهی خام می‌باشد (Rostagno *et al.*, 2007). مقدار فنول بالاتر بدست‌آمده با روش استخراج به کمک امواج مایکروویو (Microwave assisted extraction (MAE)) را این‌گونه توضیح می‌دهند که دیواره سلولی مواد گیاهی خشک که حاوی اندکی رطوبت هستند بعد از در معرض قرارگرفتن با گرمای مایکروویو، انرژی مایکروویو را جذب کرده و درنهایت تبدیل به حرارت می‌گردد و رطوبت شروع به تبخیر می‌کند. تبخیر آب موجب ایجاد فشار در دیواره سلولی شده که درنهایت موجب گسیختگی و پاره شدن سلول می‌گردد و ترکیب‌های فعال به درون حلال احاطه‌کننده وارد می‌شود (Mandal *et al.*, 2007). Pereira و همکاران (۲۰۰۷) در بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی شش رقم مختلف برگ گردو (لارا، فرانکوت، ملانایز، مایته، پاریزین و ماربوت) حاصل از استخراج سنتی گزارش کردند که نتایج حاصل از این عصاره‌ها بهتر از نتایج حاصل از BHA و آلفا-توکوفرول می‌باشد. Almeida و همکاران (۲۰۰۸) عصاره برگ گردو را به‌عنوان گیرنده پراکسیدان بررسی کردند. نتایج آنها نشان داد که عصاره برگ گردو می‌تواند به‌عنوان منبعی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مورد استفاده قرار گیرد. آنها همچنین پلی‌فنول‌ها را در برگ گردو شناسایی کردند که کوئرستین ۳ گالاکتوزید مهمترین آنها بود؛ اما هیچ گزارشی مبنی بر استخراج ترکیب‌های فنولی از برگ گردو با کمک امواج مایکروویو وجود نداشت. اما تحقیقات زیادی در زمینه استخراج ترکیب‌های فنولی از سایر منابع گیاهی با امواج مایکروویو وجود دارد و برای نمونه Pan و همکاران (۲۰۰۸) روی استخراج پلی‌فنول‌ها و کافئین از برگ‌های سبز چای تحقیق کردند و گزارش کردند که زمان ٤ دقیقه برای استخراج MAE بازده بالاتری نسبت به ۲۰ ساعت استخراج سنتی در دمای اتاق و ٤٥ دقیقه استخراج به کمک برگشت حرارت (Reflux extraction) می‌دهد. Proestos و Komaitis (۲۰۰۸) روی استخراج ترکیب‌های فنولی از رزماری، پونه کوهی، *Teucrium polium* و *Syrax officinalis* به روش MAE تحقیق و با روش سنتی مقایسه کردند. این محققان نشان دادند که مقدار ترکیب‌های فنولی استخراج شده در مدت ٤ دقیقه به روش MAE قابل مقایسه با مقدار ترکیب‌های استخراج شده به مدت ۲ دقیقه در روش سنتی بوده‌است. همچنین نتایج نشان داد که در روش سنتی با کاهش قطبیت حلال مقدار ترکیب‌های فنولی کاهش یافت. این محققان گزارش کردند که استخراج به روش MAE کاراتر از روش سنتی می‌باشد. همچنین زمان استخراج و حلال مصرفی کاهش یافته و مقدار ترکیب‌های فنولی استخراج شده افزایش یافته‌است. در مورد تأثیر عصاره برگ گردو بر ممانعت از اکسیداسیون

روغن نیز گزارشی در منابع موجود نیست، اما Bouaziz و همکاران (۲۰۰۸) در مورد تأثیر عصاره برگ زیتون بر ممانعت از اکسیداسیون روغن گزارش کردند که غنی‌سازی روغن زیتون با عصاره برگ‌های زیتون موجب کاهش اندیس پراکسید و پایداری اکسایشی نسبت به نمونه شاهد شد. همچنین Farag و همکاران (۲۰۰۷) نیز گزارش کردند که با افزودن عصاره برگ زیتون به روغن آفتابگردان، اندیس پراکسید از ٤۳ به ۳۳ میلی‌اکی‌والان گرم در کیلوگرم روغن و اندیس تیوباربیتوریک اسید از ۲/۳ به ۰/۸ میلی‌گرم مالون‌آلدهید در کیلوگرم کاهش می‌یابد. هدف از انجام این پژوهش استخراج ترکیب‌های پلی‌فنولی از برگ گردو واریته شهمیرزادی با دو روش سنتی و استفاده از امواج مایکروویو و بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی این عصاره‌ها در ممانعت از اکسیداسیون روغن می‌باشد.

مواد و روشها

همه مواد شیمیایی و معرف‌ها از شرکت مرک و سیگما تهیه شدند.

آماده‌سازی نمونه

در این تحقیق برگ گردو واریته شهمیرزادی در مرداد ۸۸ از مرکز جهاد کشاورزی مازندران تهیه شد. به‌طوری‌که نمونه‌های چیده شده فاقد آثاری از آفتاب سوختگی و کاملاً سالم بودند. برگ‌ها در سایه خشک و توسط آسیاب ساخت شرکت ایران خودساز خرد شده (تا مش ٤۰) و در کیسه‌های محافظ به رطوبت در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند تا ترکیب‌های فنولی موجود در نمونه‌ها دچار آسیب نگردد.

استخراج ترکیب‌های فنولی

استخراج ترکیب‌های فنولی به روش سنتی (غرقابی)

۱۰ گرم برگ خشک شده گردو با نسبت ۱:۱۰ با حلال (متانول ۸۰٪، اتانول ۵۰٪، آب با دمای محیط و آب داغ) مخلوط شد. بعد از طی زمان استخراج (٦، ۱۲، ۱۸ و ۲٤ ساعت) عصاره‌ها با کاغذ صافی واتمن شماره ۱ فیلتر شدند. عصاره های حاصل از حلال‌های آلی ابتدا توسط تبخیرکننده چرخشی (مدل ای‌کاآآوری ۱۰) و بعد با خشک کن انجمادی (ایران مدل اف‌دی‌بی ۵۵۰۳) و عصاره‌های آبی فقط با خشک‌کن انجمادی خشک شدند.

استخراج ترکیب‌های فنولی به کمک امواج مایکروویو

۵ گرم نمونه با نسبت ۱:۲۰ با حلال (متانول ۸۰٪، اتانول ۵۰٪ و آب) مخلوط شده و در یک مایکروفر استخراج شده در آزمایشگاه گروه مهندسی مواد و طراحی صنایع غذایی دانشگاه گرگان تحت اشعه دهی قرار گرفتند. این اصلاحات شامل اضافه کردن یک همزن مغناطیسی با قابلیت تنظیم دور چرخش، کندانسور آب، سنسور دما و کنترل زمان بر روی مایکروفر بوده است (قره‌خانی و همکاران، ۱۳۸۸). مدت زمان اشعه‌دهی برای حلال‌های آلی ۲، ٤، ٦ و ۸ دقیقه و برای آب ۳، ٦ و ۹ دقیقه بود که این زمان ها به کمک روش آزمون و خطا حاصل شد. سپس عصاره‌ها با کاغذ صافی واتمن شماره ۱ فیلتر شدند. عصاره های فیلتر شده حاصل از حلال های آلی ابتدا توسط تبخیرکننده چرخشی و بعد با خشک‌کن انجمادی و عصاره‌های آبی فقط با خشک‌کن انجمادی خشک شدند.

اندازه‌گیری ترکیب‌های فنولی

میزان کل ترکیب‌های فنولی با روش رنگ‌سنجی فولین‌سیوکالتو مورد بررسی قرار گرفت (Arabshahi-Delouee & Urooj, 2007). اسیدگالیک به‌عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون بکار رفت و میزان آن براساس معادل گالیک‌اسید در گرم وزن خشک بیان شد. آزمایش‌ها در سه تکرار انجام و میانگین آنها گزارش شد.

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی

ارزیابی فعالیت مهار رادیکال آزاد دی‌پی‌پی‌اچ

توانایی دادن اتم هیدروژن یا الکترون توسط عصاره‌های مختلف در این آزمایش با میزان بی‌رنگ شدن محلول بنفش ۲ و ۲ دی‌فنیل ۱-پیکروهیدرازیل در متانول مورد سنجش قرار گرفت (Li *et al.*, 2005). ۲ و ۲ دی‌فنیل ۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH) رادیکال چربی‌دوستی است که حداکثر جذب را در طول موج ۵۱۷ نانومتر دارد. ابتدا ۳ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره در متانول ۸۰٪ با ۱ میلی‌لیتر از محلول متانولی ۱ میلی‌مولار DPPH به شدت مخلوط شد؛ سپس مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در مکانی تاریک نگهداری و در نهایت جذب آن در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. نمونه شاهد این آزمون شامل ۱ میلی‌لیتر از محلول DPPH و ۳ میلی‌لیتر متانول بود. فعالیت بر حسب درصد نسبی DPPH طبق فرمول زیر محاسبه شد.

$$\text{درصد مهار رادیکال DPPH} = \frac{\text{جذب نمونه} - \text{جذب شاهد}}{\text{جذب شاهد}} \times ۱۰۰ \qquad (۱)$$

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها به روش قدرت احیاکنندگی

احیاء آهن (III) اغلب به‌عنوان معیاری برای قابلیت الکترون‌دهی بکار می‌رود. توانایی عصاره‌ها برای احیاء آهن سه ظرفیتی توسط روش عربشاهی و عروج (۲۰۰۷) تعیین شد. در این روش ۱ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره در حلال استخراجی استفاده و با ۲/۵ میلی‌لیتر بافرفسفات (pH= 6.6 و M= 0.2) و ۲/۵ میلی‌لیتر فری‌سیانیدپتاسیم (۱۰ گرم در لیتر) کاملاً مخلوط و به مدت نیم ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. سپس ۲/۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید (۱۰۰ گرم در لیتر) به مخلوط فوق اضافه و کاملاً مخلوط شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه (۱۷۰۰g) سانتریفیوژ (ساخت سنتوریون کانادا مدل کا ۲۰۴۲ (Centurion K2042)) گردید. پس از آن، ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول رویی با ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر کلریدآهن (III) (۱ گرم در لیتر) مخلوط گردید و در طول موج ۷۰۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر جذب آن خوانده شد. همچنین از BHA و BHT به‌عنوان شاهد مثبت استفاده گردید.

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها به روش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل

این روش براساس احیای مولیبدنوم (VI) به مولیبدنوم (V) توسط عصاره و تشکیل کمپلکس سبز

رنگ فسفات مولیبدنوم در محیط اسیدی است. غلظت‌های مختلف عصاره خشک شده در حلال‌های استخراجی تهیه شد. سپس ۰/۱ میلی لیتر از هر یک از غلظت‌ها و ۱ میلی‌لیتر از معرف (مخلوطی از اسیدسولفوریک ۰/٦ مولار، فسفات‌سدیم ۲۸ میلی مولار و مولیبدات‌آمونیوم ٤ میلی‌مولار) را در لوله اپندروف ریخته و پس از دربندی به مدت ۹۰ دقیقه در بن‌ماری (ساخت شرکت فن آزما گستر ایران) ۹۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. بعد از سرد شدن آن تا دمای اتاق، جذب در طول موج ٦۹۵ نانومتر در برابر یک نمونه بلانک قرائت گردید. نمونه بلانک حاوی ۱ میلی‌لیتر محلول معرف و ۰/۱ میلی‌لیتر حلال استفاده شده بود که در شرایطی مشابه با بقیه نمونه ها انکوبه شده بودند (Prieto *et al.*, 1999).

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها در به تأخیر انداختن اکسیداسیون روغن سویا

به این منظور عصاره‌های متانولی برگ و پوسته هر دو رقم گردو که به روش امواج مایکروویو استخراج شدند در سه سطح غلظت (۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام) و آنتی اکسیدان های سنتزی BHA و BHT در دو سطح غلظت (۱۰۰ و ۲۰۰ پی‌پی‌ام) به روغن سویای تصفیه شده و بدون آنتی اکسیدان و اسیدسیتریک اضافه و به مدت ۱٦ روز در دمای ٦۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. در طی این مدت زمان در روزهای صفر، ٤، ۸، ۱۲ و ۱٦ عدد پراکسید (AOAC., 1990) و تیوباربیتوریک‌اسید (Goli *et al.*, 2005) آن تعیین شد.

تجزیه و تحلیل آماری

نتایج بدست آمده با استفاده از روش آنالیز واریانس (ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ($p < ۰/۰۵$) انجام شد. تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام گردید.

نتایج

مقدار ترکیب‌های فنولی حاصل از استخراج به روش سنتی

جدول ۱ تأثیر مدت زمان استخراج و نوع حلال بر میزان ترکیب‌های فنولی کل برگ واریته شهمیرزادی را نشان می‌دهد. نتایج آنالیز واریانس (ANOVA) نشان داد که اثر حلال و زمان بکاررفته در استخراج ترکیب‌های فنولی در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار است ($p < ۰/۰۵$). همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود در عصاره‌های الکلی (متانولی ۸۰٪ و اتانولی ۵۰٪) با افزایش زمان استخراج، میزان ترکیب‌های فنولی کل افزایش می‌یابد. اما در عصاره حاصل از آب داغ، تا زمان ۱۲ ساعت میزان ترکیب‌های فنولی افزایش و بعد از آن کاهش می‌یابد که دلیل آن را می‌توان به از بین رفتن ترکیب‌های فنولی کل بر اثر نگهداری طولانی مدت نمونه‌ها در دمای بالا نسبت داد (Besbes *et al.*, 2004). البته بیشترین میزان ترکیب‌های فنولی مربوط به عصاره متانولی (۱۰۱/۰۰ میلی‌گرم معادل گالیک‌اسید در گرم نمونه خشک) بود. با این حال عصاره متانولی در زمان ٦ و ۱۲ ساعت اختلاف معنی‌داری با عصاره اتانولی نداشت.

مقدار ترکیب‌های فنولی حاصل از استخراج به روش مایکروویو

جدول ۲ تأثیر مدت زمان استخراج و نوع حلال را بر میزان ترکیب‌های فنولی کل در روش MAE نشان می‌دهد. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که تأثیر حلال روی استخراج ترکیب‌های فنولی به کمک امواج مایکروویو در سطح ۵٪ معنی‌دار است ($p <$ ۰/۰۵). در هر سه حلال با افزایش زمان استخراج میزان ترکیب‌های کل افزایش می‌یابد. متانول ۸۰٪ بهترین حلال استخراج شناخته شد و آب کمترین مقدار ترکیب‌های فنولی را استخراج کرد.

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

همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود مقدار فنول کل در روش استخراج مایکروویو بیشتر از روش سنتی می‌باشد.

جدول ۱- مقایسه میانگین مقادیر مختلف فنول کل (میلی‌گرم گالیک‌اسید در هر گرم وزن خشک) حاصل از استخراج سنتی در زمان‌ها و حلال‌های مختلف در برگ گردو رقم شهمیرزادی

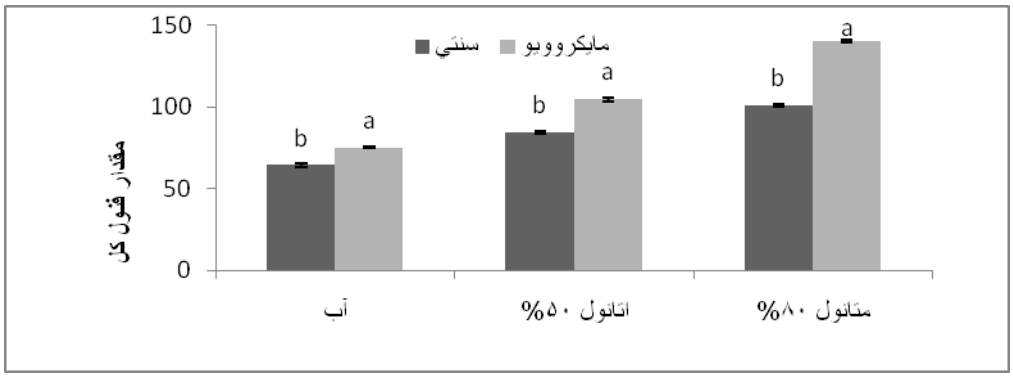
حلال	زمان (ساعت)			
	٦	۱۲	۱۸	۲٤
متانول ۸۰٪	۸۰/۸۷ ± ۰/٦۱ c	۸۲/۷۰ ± ۰/۳۸ c	۹٤/۳۲ ± ۰/۰٤ b	۱۰۱/۰۰ ± ۰/۵۲ a
اتانول ۵۰٪	٦۹/۵۳ ± ۰/۵٦ de	۷۰/۰۵ ± ۰/۲۸ de	۷٤/۵٦ ± ۰/۷۳ d	۸٤/٦۲ ± ۰/۹۳ c
آب داغ	٦۱/۳۵ ± ۰/٤۲ f	٦٤/۳٦ ± ۰/۹۸ ef	۵۹/۳۳ ± ۰/۹۹ fg	٤۳/٤۲ ± ۰/٦۲ j
آب با دمای محیط	٤۱/۳۲ ± ۰/٤۸ j	٤۵/۷٤ ± ۰/۵ ji	۵۰/۲۱ ± ۰/٦۳ hi	۵۳/٤۸ ± ۰/۷٤ hg

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

جدول ۲- مقایسه میانگین مقادیر مختلف فنول کل (میلی‌گرم گالیک‌اسید در هر گرم وزن خشک) حاصل از استخراج مایکروویو در زمان‌ها و حلال‌های مختلف در برگ واریته شهمیرزادی

حلال	زمان (دقیقه)					
	۲	۳	٤	٦	۸	۹
متانول ۸۰٪	۱۰۱/۹۲ ± ۰/۷۱ cd	–	۱۲۲/٦۵ ± ۱/۲۷ b	۱۲۵/٤۹ ± ۰/۹۹ ab	۱۳۰/۱٦ ± ۰/۹۱ a	–
اتانول ۵۰٪	۹٤/٦۹ ± ۰/۱۲ e	–	۹۵/۲۱ ± ۰/۵٤ e	۹۸/۲۸ ± ۰/۳۹ de	۱۰٤/٦٦ ± ۱/۱۹ c	–
آب	–	٦۱/۰٦ ± ۰/٤۵ g	–	۷۳/۹٦ ± ۰/٦۲ f	–	۷۵/۳۲ ± ۰/۷۵ f

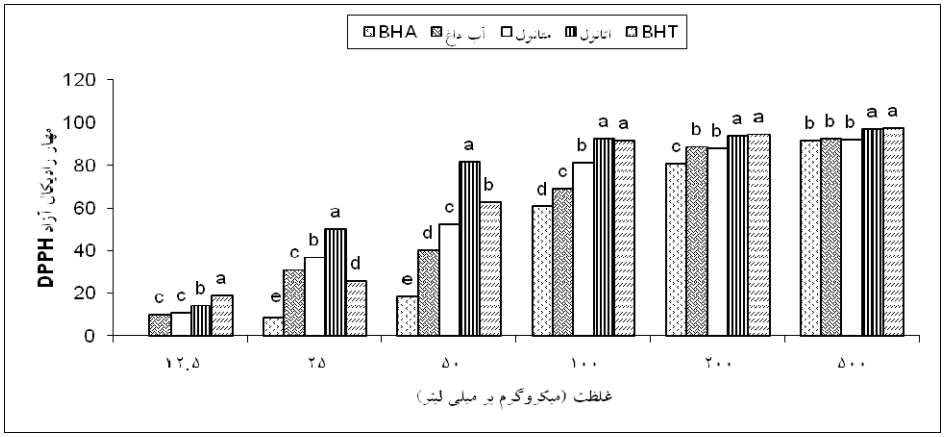
حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.



شکل ۱- مقایسه مقدار فنول کل عصاره‌ها در زمان بهینه هر حلال با دو روش سنتی و مایکروویو

بررسی توانایی مهار رادیکال DPPH توسط عصاره‌های حاصل از استخراج سنتی

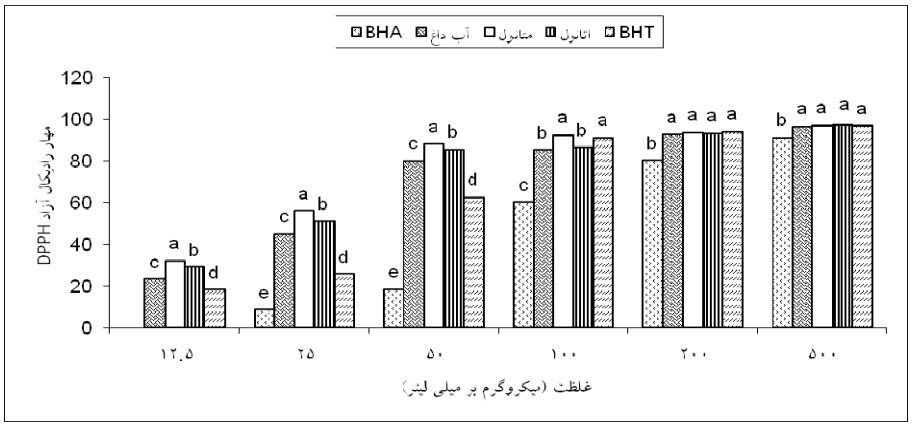
شکل ۲ میزان کاهش جذب محلول DPPH در حضور غلظت‌های مختلف عصاره برگ شهمیرزادی حاصل از استخراج سنتی و همچنین BHA و BHT را به‌عنوان آنتی‌اکسیدان سنتزی نشان می‌دهد. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که نوع و غلظت عصاره‌ها و آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی تأثیر معنی‌داری روی مهار رادیکال آزاد DPPH در سطح ۵٪ داشت. فعالیت آنتی‌رادیکالی در هر سه عصاره وابسته به غلظت بود. همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود عصاره اتانولی و آبی به‌ترتیب بیشترین و کمترین فعالیت آنتی‌رادیکالی را داشت. همه عصاره‌ها فعالیت بالاتری نسبت به BHA نشان دادند. عصاره اتانولی در بیشتر غلظت‌ها فعالیت بالاتری نسبت به BHT داشت و در غلظت‌های بالا اختلاف معنی‌داری با BHT نداشت. همچنین عصاره متانولی در بیشتر غلظت‌ها فعالیت بالاتری از عصاره آبی داشت.



شکل ۲- مقایسه میانگین درصد مهار DPPH در غلظت‌های مختلف عصاره‌های حاصل از استخراج سنتی از برگ گردو واریته شهمیرزادی و آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی

بررسی توانایی مهار رادیکال آزاد DPPH عصاره‌های حاصل از امواج مایکروویو

شکل ۳ میزان کاهش جذب محلول DPPH را در حضور غلظت‌های مختلف عصاره برگ شهمیرزادی حاصل از استخراج به کمک امواج مایکروویو و همچنین BHA و BHT به‌عنوان آنتی‌اکسیدان سنتزی نشان می‌دهد. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که نوع و غلظت عصاره‌ها و آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی تأثیر معنی‌داری روی مهار رادیکال آزاد DPPH در سطح ۵٪ داشت ($p < ۰/۰۵$). فعالیت آنتی‌رادیکالی در هر سه عصاره وابسته به غلظت بود. همان‌طور که در شکـل ۳ مشاهده می‌شود در میان عصاره‌ها، عصاره متانولی بالاترین فعالیت آنتی‌رادیکالی را داشت و عصاره اتانولی و آبی در مراتب بعدی بودند. آنتی‌اکسیدان سنتزی BHA در تمامی غلظت‌ها فعالیت پایین‌تری نسبت به همه عصاره‌ها داشت. عصاره متانولی در بیشتر غلظت‌ها فعالیت آنتی‌رادیکالی بالاتری نسبت به BHT داشت. عصاره اتانولی در غلظت‌های پایین فعالیت بهتری از BHT از خود نشان داد. به‌طوری که عصاره آبی بین عصاره‌ها کمترین فعالیت آنتی‌رادیکالی را داشت، اما فعالیت آن بالاتر از BHA بود و در غلظت‌های پایین فعالیت بهتری نسبت به BHT داشت.



شکل ۳- مقایسه میانگین درصد مهار DPPH در غلظت‌های مختلف عصاره‌های حاصل از استخراج به کمک امواج مایکروویو از برگ گردو واریته شهمیرزادی و آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی

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 بالاتر عصاره‌هاست. مقادیر EC50 عصاره‌ها در جدول ۳ آورده شده‌است. با توجه به جدول ۳، در استخراج سنتی کمترین میزان EC_{50} و در نتیجه فعالیت آنتی‌رادیکالی بالاتر مربوط به عصاره اتانولی بود. عصاره اتانولی نسبت به BHA و BHT قویتر عمل کرده‌است. عصاره متانولی و آبی فعالیت آنتی‌رادیکالی بالاتری نسبت به BHA داشتند. در استخراج با امواج مایکروویو با توجه به مقادیر ارائه شده در جدول ۳ مشاهده می‌شود که عصاره‌های حاصل از استخراج مایکروویو دارای فعالیت آنتی‌رادیکالی بالایی هستند. البته تمام عصاره‌های برگ شهمیرزادی EC_{50} کمتر و در نتیجه فعالیت بالاتری نسبت به BHA و BHT

داشتند. در بین عصاره‌ها، عصاره متانولی بالاترین فعالیت آنتی‌رادیکالی را داشت. عصاره آبی در بین عصاره‌ها کمترین فعالیت را داشت که با این حال از BHA و BHT قویتر عمل کرده‌است.

جدول ۳- مقایسه میانگین مقادیر مختلف EC50 (میکروگرم در هر میلی لیتر عصاره) در سه آزمون مختلف

	استخراج	عصاره			آنتی‌اکسیدان سنتزی	
		اتانولی	متانولی	آب	BHA	BHT
آزمون DPPH	سنتی	۲۷/۵۲ e	٤٦/٦٨ c	٦٢/٤٦ b	۸۵/۷۳ a	۳۵/۸۷ d
	مایکروویو	۲٦/۷۰ d	۲٤/۲۲ d	۲۹/۷۳ c	۸۵/۷۳ a	۳۵/۸۷ b
آزمون نیروی احیاکنندگی	سنتی	۷۲/۲۰ d	۹۳/۸٦ c	۱۹۸/۰٦ a	۱٦۸/٦٦ b	٥٤/٦۳ e
	مایکروویو	٦۹/۷۱ cd	۸۹/٥۸ bc	۹٦/۹٤ b	۱٦۸/٦٦ a	٥٤/٦۳ d
آنتی‌اکسیدانی کل	سنتی	۱۲۱/۰۱ c	۹٤/۲۰ e	۱٤۰/٥٦ b	۱٥۸/۳۲ a	۹۹/۱۹ d
	مایکروویو	٦۹/۳۲ d	٥٤/٥٥ e	۷۸/٤۰ c	۱٥۸/۳۲ a	۹۹/۱۹ b

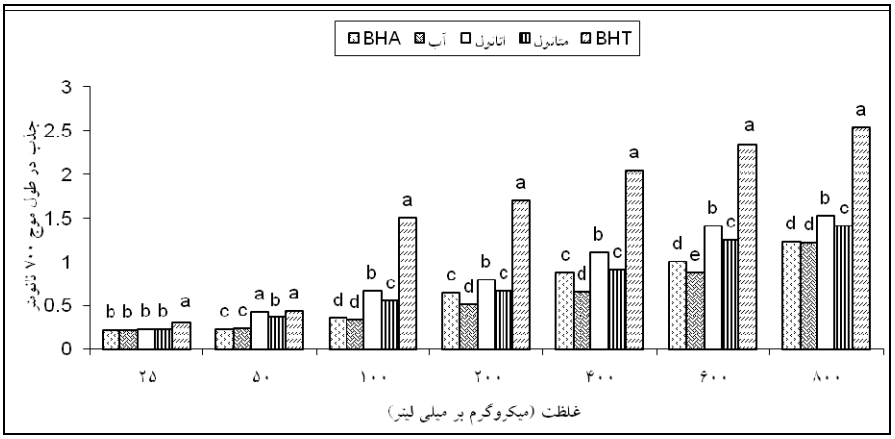
حروف مشابه در هر سطر بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

بررسی نیروی احیاکنندگی عصاره‌های حاصل از استخراج سنتی

شکل ٤ نیروی احیاکنندگی غلظت‌های مختلف عصاره برگ شهمیرزادی حاصل از استخراج سنتی و همچنین BHA و BHT به‌عنوان آنتی‌اکسیدان سنتزی را نشان می‌دهد. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که تأثیر نوع حلال و غلظت روی نیروی احیاکنندگی عصاره‌ها و در نتیجه فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها معنی‌دار است ($p < ۰/۰۵$). در هر سه عصاره و همچنین آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی نیروی احیاکنندگی وابسته به غلظت بود. نتایج نشان داد که در تمامی غلظت‌های مورد بررسی آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT دارای بیشترین قدرت احیاکنندگی است. همچنین اختلاف معنی‌داری بین قدرت احیاکنندگی عصاره آبی و BHA در بیشتر غلظت‌ها مشاهده نشد. عصاره اتانولی و متانولی در بیشتر غلظت‌ها قدرت احیاکنندگی بالاتری نسبت به عصاره آبی و BHA داشتند.

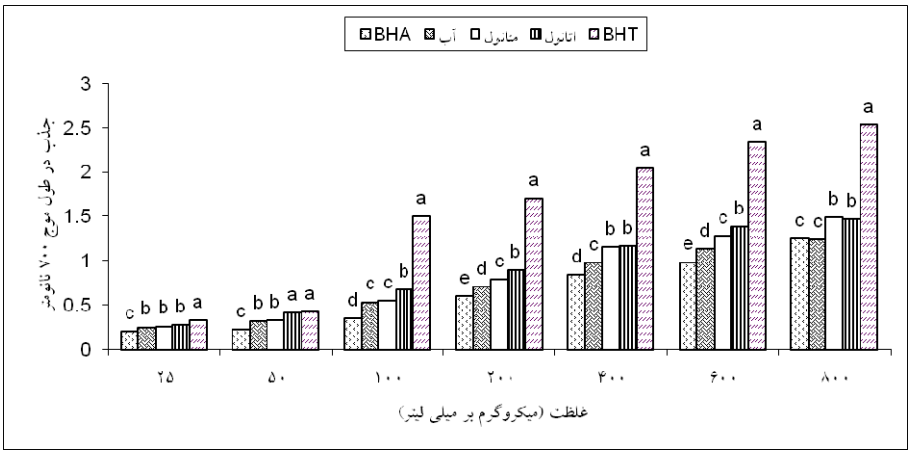
بررسی نیروی احیاکنندگی عصاره‌های حاصل از استخراج با امواج مایکروویو

شکل ۵ نیروی احیاکنندگی غلظت‌های مختلف عصاره برگ شهمیرزادی حاصل از استخراج مایکروویو را نشان می‌دهد. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که تأثیر نوع حلال و غلظت روی نیروی احیاکنندگی عصاره‌ها معنی‌دار است ($p < ۰/۰۵$). هر سه عصاره نیروی احیاکنندگی وابسته به غلظت را نشان دادند. در میان عصاره‌ها، عصاره اتانولی در بیشتر غلظت‌ها بالاترین و عصاره آبی در تمامی غلظت‌ها کمترین نیروی احیاکنندگی را دارا بود. بجز عصاره آبی در غلظت ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، BHA قابل رقابت با عصاره‌ها نبوده‌است. معمولاً برای مقایسه نیروی احیاکنندگی عصاره‌های مختلف از فاکتوری تحت عنوان EC_{50} استفاده می‌گردد. طبق تعریف EC_{50} به غلظتی از عصاره اطلاق می‌گردد که در طول موج ۷۰۰ نانومتر جذبی معادل ۰/۵ داشته باشد. این مقادیر در جدول ۳ آورده شده‌است.



شکل ٤- مقایسه میانگین نیروی احیاکنندگی از غلظت‌های مختلف عصاره آبی و الکلی (سنتی) برگ گردو واریته شهمیرزادی و آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی

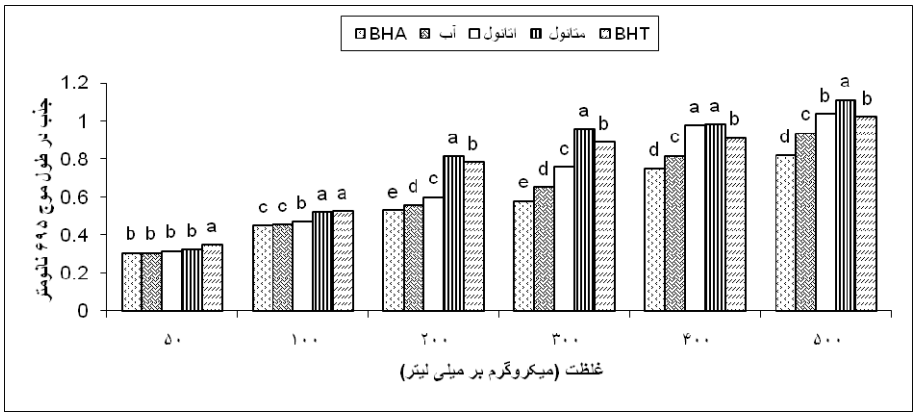
بنابراین هرچه این غلظت کمتر باشد نشان‌دهنده نیروی احیاکنندگی بالاتر عصاره‌ها و در نتیجه فعالیت آنتی‌اکسیدانی بهتر آنهاست که به‌دلیل وجود ترکیب‌های فنولی می‌باشد. طبق مقادیر ارائه شده در جدول ۳، در استخراج سنتی در بین عصاره‌ها کمترین مقدار EC_{50} مربوط به عصاره اتانولی بود. البته هر سه عصاره نیروی احیاکنندگی ضعیف‌تری نسبت به آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی BHT از خود نشان دادند. عصاره متانولی و اتانولی فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت به BHA از خود نشان دادند. در استخراج با امواج مایکروویو نیز در بین عصاره‌ها کمترین مقدار EC_{50} مربوط به عصاره اتانولی بود. به‌طوری که هر سه عصاره قویتر از آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی BHA عمل کردند و تنها عصاره اتانولی قابل رقابت با BHT بود.



شکل ٥- مقایسه میانگین نیروی احیاکنندگی از غلظت‌های مختلف عصاره آبی و الکلی (مایکروویو) برگ گردو واریته شهمیرزادی و آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی

بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره‌های حاصل از استخراج سنتی

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های حاصل از استخراج سنتی در شکل ٦ آورده شده‌است. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره‌ها وجود دارد، به‌طوری که هر سه عصاره ظرفیت آنتی اکسیدانی وابسته به غلظت را نشان دادند. در میان عصاره ها، عصاره متانولی بالاترین ظرفیت آنتی اکسیدانی و عصاره آبی کمترین ظرفیت آنتی اکسیدانی را دارا بود. بیشتر عصاره‌ها ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل بالاتری نسبت به BHA داشتند و در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر نیز عصاره آبی و BHA اختلاف معنی داری در سطح احتمال ۵٪ نشان ندادند. لازم به یادآوریست که به‌استثنای غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر، BHT قابل رقابت با عصاره متانولی نبوده‌است.

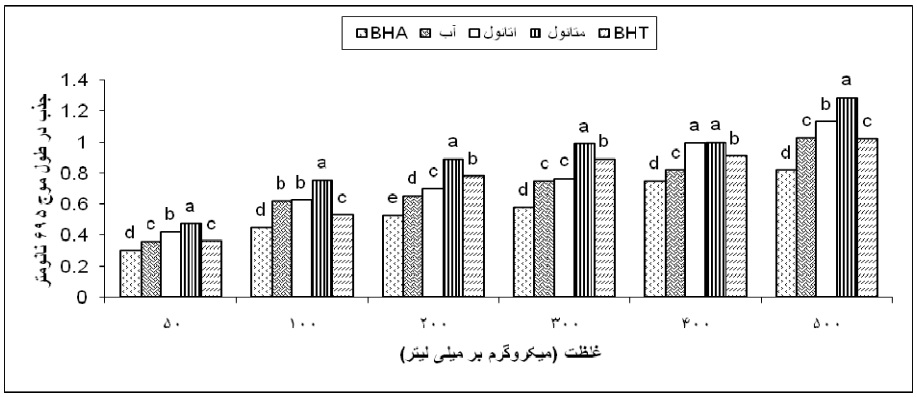


شکل ٦- مقایسه میانگین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل غلظت‌های مختلف عصاره‌های برگ گردو واریته شهمیرزادی حاصل از استخراج سنتی و آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی

بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره‌های حاصل از استخراج با کمک مایکروویو

شکل ۷ ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل غلظت‌های مختلف عصاره برگ شهمیرزادی حاصل از استخراج مایکروویو را نشان می‌دهد. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره‌های حاصل از استخراج به کمک امواج مایکروویو وجود دارد ($p < ۰/۰۵$). به‌طوری که هر سه عصاره ظرفیت آنتی‌اکسیدانی وابسته به غلظت را نشان دادند. همان‌طور که در شکل ۷ مشاهده می‌شود آنتی‌اکسیدان سنتزی BHA کمترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل را دارا بود که قابل رقابت با عصاره‌ها نبود. عصاره متانولی در همه غلظت‌ها ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت به عصاره اتانولی، آبی و آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی داشت و در غلظت ٤۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اختلاف معنی‌داری با عصاره اتانولی نداشت و عصاره اتانولی و آبی در مرتبه بعدی قرار گرفتند. عصاره اتانولی در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ٤۰۰ و ۵۰۰ و عصاره آبی در غلظت ۱۰۰ ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل بالاتری نسبت به BHT از خود نشان دادند. معمولاً برای مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره‌ها از فاکتوری تحت عنوان EC_{50} استفاده می‌گردد که در جدول ۳ آورده شده‌است. طبق تعریف EC_{50} به غلظتی از عصاره اطلاق می‌گردد که در طول موج ٦۹۵ نانومتر جذبی معادل ۰/۵ داشته

باشد. بنابراین هرچه این غلظت کمتر باشد نشان‌دهنده فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتر عصاره‌هاست. همان‌طور که در جدول ۳ مشاهده می‌گردد کمترین میزان EC_{50} و در نتیجه فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتر مربوط به عصاره متانولی بود که نسبت به BHA و BHT قویتر عمل کرده‌است. عصاره اتانولی فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت به BHA و کمتر از BHT داشت. تفاوت مشاهده شده بین EC_{50} عصاره‌های مختلف را می‌توان به تفاوت در مقادیر ترکیب‌های فنولی آنها نسبت داد. در استخراج مایکروویو طبق مقادیر ارائه شده در جدول ۳ در بیشتر موارد کمترین مقدار EC_{50} مربوط به عصاره متانولی بود. البته هر سه عصاره ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت به BHT و BHA داشتند.

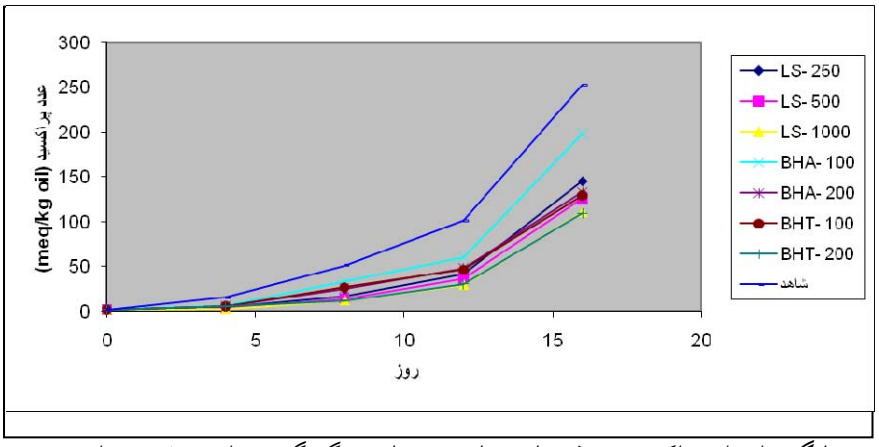


شکل ۷- مقایسه میانگین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل غلظت‌های مختلف عصاره حاصل از استخراج به کمک امواج مایکروویو و آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی

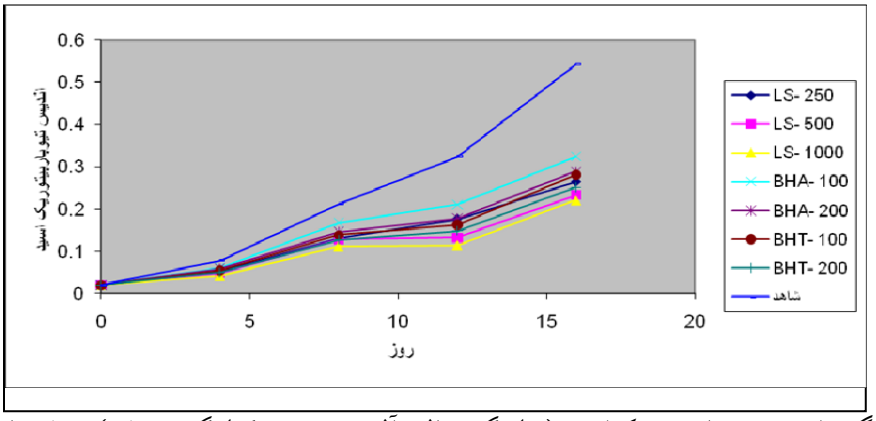
بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها در روغن سویا

جدول ٤ مقایسه میانگین‌های اعداد پراکسید و تیوباربیتوریک‌اسید را در مجموع روزهای ٤، ٨، ١٢ و ١٦ نشان می‌دهد. در بررسی میانگین اعداد پراکسید در مجموع روزها مشخص شد که نمونه شاهد دارای بالاترین مقدار اعداد پراکسید بوده و تفاوت معنی‌داری با همه تیمارهای دیگر داشت. همه آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی بهتر از BHA-100، BHA-200 و BHT-100 توانستند از اکسیداسیون جلوگیری کنند و غلظت ۱۰۰۰ عصاره نیز تفاوت معنی‌داری با BHT-200 نداشت. شکل ۸ مقادیر عدد پراکسید را در همه روزهای آزمایش برای هر رقم و مقایسه آن با نمونه شاهد و آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی نشان می‌دهد. البته با افزایش زمان نگهداری نمونه‌ها در شرایط اکسیداسیون، اعداد پراکسید افزایش یافته‌است. به‌طوری که در همه روزها نمونه شاهد بالاترین مقدار عدد پراکسید را داشت و BHA-100 در مرتبه بعد قرار داشت.

با توجه به مقادیر اندیس تیوباربیتوریک‌اسید ارائه شده در جدول ۲ مشخص شد که نمونه شاهد دارای بالاترین مقدار این اندیس بوده که اختلاف معنی‌داری با همه تیمارها داشت. همه عصاره‌ها بهتر از BHA-100، BHA-200 و BHT-100 توانستند تشکیل محصولات ثانویه اکسیداسیون را به تأخیر بیندازند. غلظت ۵۰۰ و ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام عصاره بهتر از BHT-200 عمل کرد. شکل ۹ مقادیر اندیس تیوباربیتوریک را در همه روزهای آزمایش و مقایسه آن با نمونه شاهد و آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی نشان می‌دهد. نمونه شاهد بالاترین مقدار عدد TBA را داشت.



شکل ۸- مقایسه میانگین اعداد پراکسید روغن‌های حاوی عصاره برگ گردو واریته شهمیرزادی در روزهای مختلف و همچنین مقایسه آنها با روغن‌های حاوی آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی و نمونه شاهد



شکل ۹- مقایسه میانگین اندیس تیوباربیتوریک‌اسید (میلی‌گرم مالون‌آلدهید در هر کیلوگرم روغن) روغن‌های حاوی عصاره برگ گردو واریته شهمیرزادی در روزهای مختلف و مقایسه آنها با روغن‌های حاوی آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی و نمونه شاهد

جدول ٤- مقایسه میانگین اعداد پراکسید و تیوباربیتوریک‌اسید در مجموع روزهای چهارم، هشتم، دوازدهم و شانزدهم برای هر تیمار در سه تکرار

تیمار	عدد پراکسید	عدد تیوباربیتوریک‌اسید
نمونه کنترل	۱۰٦/۱۳ a	۰/۲۸۹ a
غلظت ۲۵۰	۵۱/۷۷ bcd	۰/۱۵ cde
غلظت ۵۰۰	٤۵/۰۹ cd	۰/۱۳ ef
غلظت ۱۰۰۰	۳۹/٤٤ d	۰/۱۱٦ f
BHA-100	۷۳/۸۳ b	۰/۱۸۵ b
BHA-200	۵۳/۰٤ bc	۰/۱٦۳ c
BHT-100	۵۱/٦۷ bcd	۰/۱۵۳ cd
BHT-200	۳۹/٤۷ d	۰/۱۳۷ def

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

بحث

ارزیابی مقدار فنول کل در استخراج سنتی

با توجه به نتایج بدست‌آمده متانول ۸۰٪ به‌عنوان حلال بهینه برای استخراج شناخته شد. عوامل مختلفی بر بازده استخراج عصاره از مواد گیاهی تأثیر می‌گذارند که قطبیت حلال از آن جمله است. قطبیت متانول ۵/۱ (در مقایسه با ۱۰/۲ برای آب) است و به این ترتیب بین حلال‌های کاملاً قطبی و غیرقطبی قرار می‌گیرد. بنابراین ترکیب‌های فنولی موجود در عصاره‌های آبی کمتر از عصاره‌های الکلی بود. آب به‌عنوان یک حلال استخراج، ایجاد یک محیط قطبی می‌کند که در این محیط ترکیب‌هایی با قطبیت پایین، کمتر استخراج می‌شوند. با افزودن آب به حلال‌های آلی (متانول ۸۰٪ و اتانول ۵۰٪) یک محیط نسبتاً قطبی تشکیل می‌گردد که می‌تواند مقادیر و انواع بیشتری از ترکیب‌های فنولی با قطبیت متوسط را استخراج کند. از طرف دیگر حضور مقادیر مناسب آب در حلال آلی، به‌صورت مطلوبی موجب افزایش تورم بافت گیاهی می‌گردد که این تورم، موجب افزایش سطح تماس بین ماتریکس گیاهی و حلال و در نتیجه افزایش استخراج می‌گردد (Li *et al*., 2010). البته دلیل کمتر بودن مقدار فنول کل توسط عصاره آب داغ نسبت به عصاره‌های الکلی را این‌گونه می‌توان بیان کرد که طبق گزارش Pereira و همکاران (۲۰۰۷) فلاونوئید ترکیب اصلی برگ گردو بوده و مقدار آن از ٥٤/٨٪ تا ٦٢/٩٪ کل ترکیب‌های فنولی متغیر است و به دلیل کم‌محلول بودن فلاونوئیدها در آب نسبت به اتانول و متانول می‌توان کمتر بودن مقدار فنول کل عصاره آبی را توجیه کرد. علت بالا بودن مقدار فنول کل در آب داغ نسبت به آب با دمای محیط را می‌توان این‌گونه تفسیر کرد که دمای بالا موجب نفوذ بهتر حلال به درون ماتریکس و حلالیت بالاتر ترکیب‌های فنولی در حلال می‌گردد (Sutivisedsak *et al*., 2010). در واقع آب داغ برخی از پلی‌ساکاریدهای پکتیکی را از دیواره سلولی استخراج کرده و موجب شکستن دیواره سلولی می‌گردد. در نتیجه حلال آب در تماس با مواد فنولی قرار گرفته و بازیابی ترکیب‌های فنولی بهبود می‌یابد (Li *et al*., 2006).

همان‌طور که مطرح شد زمان استخراج نیز تأثیر معنی‌داری بر میزان ترکیب‌های فنولی کل داشت. زیرا با گذشت زمان حلال فرصت پیدا می‌کند که به درون بافت گیاهی نفوذ کرده و ترکیب‌های فنولی نیز فرصت کافی برای جدا شدن از ماتریکس و ورود به حلال داشته باشند (Spigno & De Faveri, 2009). اما در آب داغ بعد از ۱۲ ساعت کاهش در مقدار ترکیب‌های فنولی مشاهده شد. دلیل آن را می‌توان این‌گونه توجیه کرد که دما پایداری ترکیب‌های فنولی را به علت تجزیه آنزیمی یا تجزیه حرارتی تحت تأثیر قرار می‌دهد یا در اثر تبخیر مقدار ترکیب‌های فنولی کاهش می‌یابد. Arabshahi-Delouee و Urooj (۲۰۰۷) ترکیب‌های فنولی برگ شاه‌توت را با سه حلال متانول، استن و آب استخراج کردند. متانول بهترین حلال استخراج بوده که مطابق با نتایج این پژوهش بوده است.

ارزیابی مقدار فنول کل در استخراج به کمک مایکروویو

همان‌طور که در بخش نتایج مشاهده شد متانول ۸۰٪ بیشترین مقدار ترکیب‌های فنولی را استخراج کرده‌است. در MAE قطبیت حلال بسیار مهم است. حلال‌های قطبی معمولاً بهتر از انواع غیرقطبی عمل می‌کنند. آب با اینکه بالاترین ضریب دی‌الکتریک را دارد ولی فاکتور اتلاف آن

به‌طور معنی‌داری پایین‌تر از حلال‌های دیگر است. ازاین‌رو میزانی از انرژی مایکروویو که توسط آب جذب می‌گردد بیشتر از مقداری است که می‌تواند پخش کند. این پدیده تحت عنوان فوق داغ شدن می‌باشد. در نتیجه گرمادهی شدید منجر به تخریب ترکیب‌های 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. متانول ضریب دی‌الکتریک بالا و فاکتور اتلاف بالاتری نسبت به آب و اتانول دارد، بنابراین بهتر از اتانول و آب جواب داده است (Proestos & Komaitis, 2008). در پژوهشی Casazza و همکاران (۲۰۱۰) ترکیب‌های فنولی بقایای *Vitis vinifera* را با حلال‌های اتانول و متانول توسط روش‌های غیرسنتی استخراج کردند. حلال بهینه حلال متانول بوده که مطابق با نتایج این پژوهش بوده‌است.

مقایسه مقدار فنول کل با دو روش استخراج سنتی و استخراج به کمک امواج مایکروویو

همان‌طور که در بخش نتایج آورده شده‌است استخراج مایکروویو کاراتر از استخراج سنتی بود. در استخراج با 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 ترکیب‌های درون سلول می‌گردد. تأثیر انرژی مایکروویو به مقدار زیادی وابسته به ویژگی‌های دی‌الکتریک حلال و ماتریکس گیاهی می‌باشد (Wang & Weller, 2006). به‌منظور 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 می‌تواند شاخص قطبیت این حلال‌ها را افزایش داده و باعث افزایش ثابت دی‌الکتریک مخلوط گردد. به همین دلیل متانول ۸۰٪ نتیجه بهتری داده است. البته افزایش دما منجر به افزایش واجذبی ترکیب‌ها از ماتریکس می‌شود. همچنین با افزایش دما حلال ظرفیت بالاتری برای محلول‌سازی آنالیت‌ها دارد. در عین حال کشش سطحی و ویسکوزیته حلال با افزایش دما کاهش می‌یابد که مرطوب‌سازی نمونه و نفوذ به ماتریکس را افزایش می‌دهد. اما دماهای خیلی بالا تخریب ترکیب‌ها را تحریک می‌کند (Li *et al*., 2010). در تحقیقی که روی استخراج پلی‌فنول‌ها از چای سیاه به کمک امواج مایکروویو انجام شد، نشان داده شده که غلظت فنول‌ها بعد از ۹۰ ثانیه اشعه‌دهی، ٤۳/۷٪ بالاتر از مقدار بدست آمده بعد از ۲۱۰ ثانیه خیساندن سنتی بوده‌است (Spigno & De Faveri, 2009).

فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

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 آنتی‌اکسیدان‌هاست (Naidu *et al*., 2008). همان‌طور که در نتایج مشاهده می‌شود یک غلظت بحرانی از ترکیب‌های فنولی برای مهار رادیکال‌های آزاد کافی است. احتمالاً در غلظت‌های بالاتر به دلیل پیدایش نوعی اشباع‌شدگی افزایش غلظت تأثیر معنی‌داری روی میزان مهار رادیکال‌های آزاد ندارد. در کل، افزایش غلظت ترکیب‌های فنولی به‌طور مستقیم میزان توانایی عصاره‌های

مختلف را در مهار رادیکال آزاد افزایش می‌دهد. در غلظت‌های بالاتر ترکیب‌های فنولی، به‌دلیل افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل موجود در محیط واکنش، احتمال اهدا هیدروژن به رادیکال‌های آزاد و به دنبال آن قدرت مهارکنندگی عصاره افزایش می‌یابد. به‌طوری که تفاوت مشاهده شده بین EC_{50} عصاره‌های مختلف را می‌توان به تفاوت در مقادیر ترکیب‌های فنولی آنها نسبت داد.

Turkmen و همکاران (۲۰۰٦) گزارش کردند که اثر حلال‌های مورد استفاده در استخراج پلی‌فنول‌ها اثر معنی‌داری روی فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH دارد و نشان‌دهنده این مطلب است که آنتی‌اکسیدان‌ها و ترکیب‌های فعال زیستی با قطبیت مختلف وجود دارند. تغییر در قطبیت حلال، توانایی آن حلال را در حل کردن یک گروه خاص از ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی تغییر می‌دهد و ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی را تحت‌تأثیر قرار می‌دهد. Pan 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 آنتی‌اکسیدانی بهتری نسبت به BHT از خود نشان دادند. همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره حاصل از روش مایکروویو بهتر از روش سنتی بوده است که مطابق نتایج این پژوهش می‌باشد.

فعالیت نیروی احیاکنندگی عصاره‌ها

در کل ویژگی‌های احیاکنندگی با حضور ترکیب‌های اهداکننده الکترون همراه است. بنابراین با افزایش میزان ترکیب‌های فنولی موجود در عصاره، قدرت احیاکنندگی آنها افزایش می‌یابد. Pan و همکاران (۲۰۰۸) نیروی احیاکنندگی را به مقدار فراوان ترکیب‌های فنولی نسبت داده‌اند. براساس گزارش Arabshahi-Delouee و Urooj (۲۰۰۷) قدرت احیاکنندگی عصاره‌ها با میزان جذب آنها در طول موج ۷۰۰ نانومتر رابطه مستقیم دارد و هرچه میزان جذب بالاتر باشد نشان‌دهنده بالا بودن قدرت احیاکنندگی می‌باشد. Pereira و همکاران (۲۰۰۷) نیروی احیاکنندگی عصاره آبی شش رقم مختلف برگ گردو (لارا، فرانکوت، ملانایز، مایته، پاریزین و ماربوت) را بررسی و با آنتی‌اکسیدان سنتزی BHA و α-توکوفرول مقایسه کردند. نتایج حکایت از آن داشت که عصاره‌ها در غلظت‌های بسیار پایین نیروی احیاکنندگی قویتری نسبت به BHA و α-توکوفرول داشتند. نیروی احیاکنندگی عصاره‌های مختلف بسیار مشابه و وابسته به غلظت بود. این محققان گزارش کردند در روش نیروی احیاکنندگی رنگ زرد محلول آزمایش به سایه‌های مختلفی از سبز آبی تبدیل می‌شود که بستگی به نیروی احیاکنندگی هر عصاره دارد. در پژوهشی دیگر که روی برگ فندق انجام شد Olivera و همکاران (۲۰۰۷) نیروی احیاکنندگی عصاره آبی سه واریته برگ فندق (بولویلر، فرتایل دی کوتارد، داویانا) را تعیین و گزارش کردند که نیروی احیاکنندگی این عصاره‌ها با افزایش غلظت عصاره‌ها افزایش یافت و در غلظت‌های بسیار پایین (یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) نیروی احیاکنندگی بالایی را نشان دادند که حتی از BHA و α-توکوفرول نیز قویتر عمل کرده‌اند. به‌طوری که ظرفیت احیاکنندگی یک ترکیب شاخص مناسبی از فعالیت آنتی‌اکسیدانی است.

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل

روش فسفومولیبندیوم روش کمی برای ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدان‌های محلول در آب و محلول در

چربی (ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل) می‌باشد. این روش بر مبنای احیاء مولیبدن ٦ ظرفیتی به مولیبدن ۵ ظرفیتی در محیط اسیدی می‌باشد که با تشکیل کمپلکس سبز رنگ فسفومولیبدن با بیشینه جذب در ٦۹۵ نانومتر همراه است. عصاره‌هایی که شدت جذب بالاتری دارند ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل بالاتری نیز دارند (Arabshahi-Delouee & Urooj, 2007). این اثر با افزایش زمان واکنش و افزایش غلظت افزایش می‌یابد. البته فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی از ترکیب‌های فنولی و پلی‌فنولی ناشی می‌شود. بنابراین باید ارتباط و همبستگی نزدیکی بین مقدار ترکیب‌های فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی وجود داشته باشد. یک غلظت بحرانی از فنول‌ها برای کسب فعالیت آنتی‌اکسیدانی مطلوب کافی است. در غلظت‌های بالاتر از این غلظت بحرانی، یک اثر اشباع‌شدگی بوجود می‌آید که موجب می‌شود حضور فنول‌های اضافی فعالیت آنتی‌اکسیدانی را افزایش ندهد.

نتایج حاصل از فعالیت آنتی‌اکسیدانی در چهار روش باهم متفاوت بوده‌است. زیرا تفاوت در فعالیت آنتی‌اکسیدانی در روشهای مختلف به مقدار زیادی به طبیعت آب‌دوست و آب‌گریز فنول‌های موجود و نسبت آنها وابسته می‌باشد. سنجش DPPH اساساً فعالیت آنتی‌اکسیدانی فنول‌های محلول در آب را سنجش می‌کند. بنابراین وقتی دو عصاره در روش DPPH نتایج مشابهی دادند نشان‌دهنده این است که مقدار مولکول‌های آب‌دوست مشابه دارند (Chun *et al*., 2005). ترکیب‌های فنولی و آنتوسیانین‌ها مسئول فعالیت آنتی‌اکسیدانی بخش آب‌دوست هستند. درحالی‌که کاروتنوئیدها و توکوفرول‌ها ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی اصلی در عصاره لیپوفیلی هستند. مقدار فنول کل دارای همبستگی و ارتباط مستقیم با فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. بنابراین فعالیت آنتی‌اکسیدانی منعکس‌کننده مقدار ترکیب‌های فنولی است. Pan و همکاران (۲۰۰۸) فعالیت آنتی‌اکسیدانی پوست لنگان را با اتانول ۹۵٪ و دو روش سنتی و مایکروویو استخراج کردند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل در هر دو روش با افزایش زمان و افزایش غلظت افزایش یافت. به‌طوری که فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره حاصل از MAE بالاتر از عصاره حاصل از روش سنتی بوده که مشابه با نتایج این پژوهش بوده‌است.

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها در روغن سویا

عدد پراکسید بیانگر اکسیداسیون اولیه است. درحالی که اندیس تیوباربیتوریک بیانگر مراحل ثانویه اکسیداسیون می‌باشد. نمونه شاهد که حاوی هیچ آنتی‌اکسیدانی نبوده بیشترین مقدار عدد پراکسید را در همه روزها دارا بوده است. بنابراین با افزایش زمان نگهداری نمونه‌های روغن در شرایط اکسیداسیون، میزان عدد پراکسید افزایش یافته‌است. زیرا آنتی‌اکسیدان‌ها طی مدت زمان خاصی فعال باقی مانده و با گذشت زمان به تدریج از درجه تأثیر آنها کاسته می‌شود که دلیل آن می‌تواند نگهداشتن نمونه‌ها در شرایط اکسیداسیون و حرارت باشد تا زمانی که کلاً بی‌اثر شوند. بنابراین در روزهای آغازین تفاوت چندانی بین نمونه‌های حاوی آنتی‌اکسیدان سنتزی و طبیعی مشاهده نشد و اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های نمونه‌های مختلف نبود. اما در روزهای پایانی شاهد بالا رفتن واکنش‌های اکسیداسیون هستیم و تفاوت بین نمونه‌ها مشهود است. افزایش در مقدار پراکسید را می‌توان به تشکیل هیدروپراکسیدها یعنی محصولات اولیه اکسیداسیون نسبت داد (Laguerre *et al*., 2007). تشکیل

مالون‌دی‌آلدهید مانند پراکسید در همه نمونه‌ها با گذشت زمان افزایش یافت. همچنین از آنجا که مالون‌آلدهید 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 مانند عدد پراکسید با افزایش غلظت عصاره‌ها کاهش می‌یابد. این اثر آنتی‌اکسیدانی را به محتوی فنولی عصاره‌ها نسبت می‌دهند. در واقع با افزایش غلظت مقدار ترکیب‌های فنولی افزایش یافته که منجر به افزایش گروه‌های فعال برای مهار رادیکال آزاد می‌گردد. پژوهشی در مورد تأثیر عصاره برگ و پوسته گردو در ممانعت از اکسیداسیون روغن وجود ندارد. اما محققان اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی دیگر را در به تأخیر انداختن روغن‌ها بررسی کردند. برای نمونه، Shaker (۲۰۰۶) با افزودن عصاره پوست و دانه انگور به روغن آفتابگردان گزارش کرد که به دلیل وجود ترکیب‌های فنولی بالاتر در پوست، توانایی پوست در ممانعت از اکسیداسیون بالاتر از دانه می‌باشد. در بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره پوست سبز پسته، Goli و همکاران (۲۰۰۵) گزارش کردند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره در غلظت ۶۰۰ پی‌پی‌ام قابل مقایسه با BHA و BHT در غلظت ۲۰۰ پی‌پی‌ام بوده که این اثر آنتی‌اکسیدانی را به ترکیب‌های فنولی نسبت دادند.

نتیجه‌گیری کلی

در این مطالعه برگ گردوی شهمیرزادی به‌عنوان منبع طبیعی ترکیب‌های فنولی مورد بررسی قرار گرفت. براساس انتخاب نوع حلال، زمان استخراج و روش استخراج میزان ترکیب‌های فنولی متفاوت بوده‌است. البته استخراج با امواج مایکروویو کاراتر از استخراج سنتی بوده‌است و حلال متانول به‌عنوان حلال بهینه در استخراج مایکروویو شناخته شده‌است و عصاره متانولی به خوبی اکسیداسیون روغن را به تأخیر انداخته است. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که عصاره برگ گردو فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی دارد. به‌طور کلی عصاره برگ گردو به‌عنوان منبعی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی، توانایی واکنش با رادیکال‌های حاصل از اکسیداسیون لیپیدها را داشته و موجب قطع واکنش‌های زنجیری و افزایش زمان اکسیداسیون کند و کاهش سرعت اکسیداسیون خودبخودی می‌شود. همان‌گونه که اشاره شد فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره مورد مطالعه مربوط به ترکیب‌های فنولی موجود در آن می‌باشد. این تحقیق می‌تواند نقطه شروعی برای کاربرد عصاره برگ گردو در روغن و سایر ترکیب‌ها باشد.

منابع مورد استفاده

- قره‌خانی، م.، رفیعی، ز.، قربانی، م. و جعفری، س. م.، ۱۳۸۸. سیستم مایکروویو محفظه باز برای استخراج ترکیبات مؤثره از گیاهان دارویی، گزارش نهایی طرح تحقیقاتی، شماره ۵۹۳۲۱.
- AOAC., 1990. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists, 15th ed. Washington, DC., USA.
- Almeida, I.F., Fernandes, E., Lima, J L.F.C., Costa, P.C.F. and Bahia, M.F., 2008. Walnut (*Juglans regia*) leaf extracts are strong scavengers of pro-oxidant reactive species. Food Chemistry, 106(3): 1014-1020.
- Arabshahi-Delouee, S. and Urooj, A., 2007. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. Food Chemistry, 102(4): 1233-1240.
- Besbes, S., Blecker, C., Deroanne, C., Bahloul, N., Lognay, G., Drira, N.E. and Attia, H., 2004. Date

- Olivera, I., Sousa, A., Valentao, P., Andrade, P.B., Ferreira, I.C.F.R., Ferreira, F., Bento, A., Seabra, R., Estevinho, L. and Pereira, J.A., 2007. Hazel (*Corylus avellana*) leaves as source of antimicrobial and antioxidant compounds. Food Chemistry, 105(3): 1018-1025.
- 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(3): 1264-1270.
- Pereira, J.A., Oliveira, I., Sousa, A., Valento, P., Andrade, P.B., Ferreira, I.C.F.R., Ferreres, F., Bento, A., Seabra, R. and Estevinho, L., 2007. Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. Food and Chemical Toxicology, 45(11): 2287-2295.
- 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(2): 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(4): 652-659.
- Rostagno, M.A., Palma, M. and Barroso, C.G., 2007. Microwave assisted extraction of soy isoflavones. Analytica Chimica Acta, 588(2): 274-282.
- Shaker, E.S., 2006. Antioxidant effect of extracts from red grape seed and peel on lipid oxidation in oils of sunflower. Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie, 39: 883-92.
- Spigno, G. and De Faveri, D.M., 2009. Microwave-assisted extraction of tea phenols: a phenomenological study. Journal of Food Engineering, 93(2): 210-217.
- Sutivisedsak, N., Cheng, H.N., Willett, J.L., Lesch, W.C., Tangsrud, R.R. and Biswas, A., 2010. Microwave-assisted extraction of phenolics from bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Food Research International, 43(2): 516-519.
- Turkmen, N., Sari, F. and Velioglu, Y.S., 2006. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. Food Chemistry, 99(4): 835-841.
- Wang, L. and Weller, C.L., 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. Trends in Food Science and Technology, 17(6): 300-312.
seed oil: phenolic, tocopherol and sterol profiles. Journal of Food Lipids, 11(4): 251-265.
- Bouaziz, M., Fki, I., Jemai, H., Ayadi, M. and Sayadi, S., 2008. Effect of storage on refined and husk olive oils composition: stabilization by addition of natural antioxidants from *Chemlali* olive leaves. Journal of Food Chemistry, 108(1): 253-262.
- Casazza, A.A., Aliakbarian, B., Mantegna, S., Cravotto, G. and Perego, P., 2010. Extraction of phenolics from Vitis vinifera wastes using non-conventional techniques. Journal of Food Engineering, 100(1): 50-55.
- Chun, S.S., Vattem, D.A., Lin, Y.T. and Shetty, K., 2005. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against helicobacter pylori. Process Biochemistry, 40(2): 809-816.
- Farag, R.S., Mahmoud, E.A. and Basuny, A.M., 2007. Use crude olive leaf juice as a natural antioxidant for the stability of sunflower oil during heating. International Journal of Food Science and Technology, 42(1): 107-115.
- Goli, A.H., Barzegar, M. and Sahari, M.A., 2005. Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. Food Chemistry, 92(3): 521-525.
- Laguerre, M., Lecomte, J. and Villeneuve, P., 2007. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges. Progress in Lipid Research, 46(5): 244-282.
- Li, B.B., Smith, B. and Hossain, M.M., 2006. Extraction of phenolics from citrus peels: I. Solvent extraction method. Separation and Purification Technology, 48(2): 182-188.
- Li, J.W., Ding, S.D. and Ding, X.L., 2005. Comparison of antioxidant capacities of extracts from five cultivars of Chinese jujube. Process Biochemistry, 40(11): 3607-3613.
- Li, J., Zu, Y.G., Fu, Y.J., Yang, Y.C., Li, S.M., Li, Z.N. and Wink, M. 2010. Optimization of microwave-assisted extraction of triterpene saponins from defatted residue of yellow horn (*Xanthoceras sorbifolia* Bunge.) kernel and evaluation of its antioxidant activity. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 11(4): 637-643.
- Mandal, V., Mohan, Y. and Hemalatha, S., 2007. Microwave assisted extraction-an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. Pharmacognosy Review, 1(1): 7-18.
- Naidu, M.M., Sulochannamma, G., Sampathu, S.R. and Srinivas, P., 2008. Studies on extraction and antioxidant potential of green coffee. Food Chemistry, 107(1): 377-384.

Extraction of walnut leaves extracts with microwave assisted extraction and evaluation of antioxidant properties of phenolic compounds

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

1- MSc. student, Food Science & Technology, University of Agriculture Sciences and Natural Resoures, Gorgan, Iran
2*- Corresponding author, Food Science & Technology, Material and Design Engineering, University of Agriculture Sciences and Natural Resoures, Gorgan, Iran, E-mail: smjafari@gau.ac.ir
3- Food Science & Technology, University of Agriculture Sciences and Natural Resoures, Gorgan, Iran
4- Pharmacy Doctorate, Niyak Company, Gorgan, Iran

Received: September 2011 Revised: February 2012 Accepted: February 2012

Abstract

Recently, there is an increasing trend to use natural antioxidants due to undesirable effects of synthetic antioxidants. In this study, phenolic compounds of shahmirzadi variety of walnut leaf were extracted with traditional and microwave assisted extraction (MAE) methods. In traditional method, extraction was performed with methanol 80%, ethanol 50% , boiling water and water at ambient temperature (6, 12, 18 and 24 hours) and in MAE it was done with methanol 80%, ethanol 50% (2, 4. 6 and 8 minutes) and boiling water (3, 6 and 9 minutes). Total phenolic content was determined by Folin-Ciocaltue reagent. In MAE, methanol extract of walnut leaf had the highest total phenolics with 130.16±0.19 mg/g. The antioxidant capacity of extracts was assessed through reducing power assay, DPPH radical-scavenging activity and total antioxidant activity. Extracts showed antioxidant activity in a concentration-dependent way. The ethanol extract of leaves in the reducing power assay and DPPH radical-scavenging activity and the methanol extract of leaves in the antioxidant activity assay presented the highest antioxidant activity. Finally, the influence of methanol extract in retarding the soy bean oxidation was examined. Our results showed that extracts could prevent formation of initial and secondary products of oxidation and an extract with 1000 ppm phenolic content could control oxidation of oil. Hence we can present shahmirzadi walnut leaves as a potential source of natural antioxidants.

Key words: Walnut leave, reducing power, total phenol, soy oil.