نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۸، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۱، ص. ۲۳۴-۲۱۹

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 8, No. 2, Summer 2012, p. 219-234

مقایسه ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ گردو واریته تویسرکانی حاصل از دو روش استخراج غرقابی با حلال و استخراج به کمک امواج مایکروویو

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

تاریخ دریافت: ۹۰/۶/۱۹
تاریخ پذیرش: ۹۱/۳/۲۷

چکیده

هدف از این پژوهش استخراج ترکیبات فنلی برگ گردو واریته تویسرکانی، به دو روش سنتی و به کمک امواج مایکروویو و بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات حاصله بود. ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و مقدار فنول کل عصاره های آبی، اتانولی (۵۰ درصد)، متانولی (۸۰ درصد) طی زمان‌های مختلف تعیین و در ادامه تاثیر عصاره متانولی در ممانعت از اکسایش روغن سویا بررسی شد. همه عصاره‌ها، خواص آنتی‌اکسیدانی وابسته به غلظت را نشان دادند. بیشترین مقدار فنول کل (۰/۲۵ ± ۸۹/۱۵ میلی‌گرم معادل اسید گالیک بر گرم عصاره خشک) مربوط به عصاره متانولی حاصل از استخراج به کمک امواج مایکروویو بود. عصاره اتانولی بالاترین قدرت مهار رادیکال آزاد (EC_{50}= ۲۷/۹۰µgr/ml)، قدرت احیاکنندگی (EC_{50}= ۹۳/۲۶µgr/ml) و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (EC_{50}= ۶۸/۲۳ µgr/ml) را دارا بود. همچنین عصاره متانولی در غلظت ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام به خوبی قادر بود اکسایش روغن کنترل کند و این عصاره موثرتر از BHA و BHT در همه غلظت‌ها (غیر از اینکه BHT در غلظت ۲۰۰ عدد پراکسید بهتری از این عصاره نشان داد اما در عین حال عدد تیوباربیتوریک عصاره بهتر بوده است) اکسایش را به تأخیرانداخت. با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش می‌توان برگ گردو واریته تویسرکانی را به عنوان منبع بالقوه‌ای از ترکیبات فنلی و آنتی اکسیدان‌های طبیعی معرفی نمود.

واژه‌های کلیدی: امواج مایکروویو، برگ گردو، ویژگی‌آنتی‌اکسیدانی، روغن سویا

مقدمه

روغن‌ها مصرف بسیار زیادی در زندگی روزمره دارند. اکسایش لیپیدها در غذا نه تنها باعث از دست رفتن کیفیت تغذیه‌ای و هضمی غذا می‌شود، بلکه تولید محصولات اکسیدشده‌ای مانند رادیکال‌های آزاد می‌کند که منجر به اکسایش خودبخودی و تولید ترکیبات شیمیایی نامطلوب و در نتیجه باعث تندی و بدطعمی ماده‌غذایی می‌گردد. به علاوه ترکیبات حاصل از اکسایش چربی‌ها می‌توانند در جذب پروتئین‌ها و یا اسیدفرولیک اختلال ایجاد کند. همچنین این ترکیبات موجب بیماری‌های قلبی، عروقی و سرطان می‌شوند (karpin *et al.*, 2001). بنابراین پراکسیداسیون لیپید از دلایل اصلی فساد غذاست که منجر به تشکیل ترکیبات سمی‌می‌گردد. جلوگیری از اکسایش چربی‌ها در مواد غذایی از اهمیت خاصی برخوردار است. به همین منظور امروزه در صنعت از آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی مانند بوتیلات هیدروکسی آنیزول[۵] (BHA)، بوتیلات هیدروکسی تولوئن[۶] (BHT) و ترت بوتیل هیدروکینون[۷] (THBQ) برای به تاخیر انداختن اکسایش چربی‌ها استفاده می‌شود، اما به دلیل اثرات مضر تغذیه‌ای و سرطان‌زا بودن و نیز تمایل مصرف‌کنندگان به استفاده از ترکیبات طبیعی، کاربرد آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مورد توجه محققین قرار گرفته است. یکی از بهترین منابع آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی ترکیبات فنلی موجود در بافت‌های گیاهی است (Shahsavari *et al.*, 2008). امروزه برای حذف یا کاهش ترکیبات سنتزی در مواد غذایی، حفظ و افزایش سلامت مصرف‌کنندگان و نیز دستیابی به آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی با قیمت پایین‌تر تحقیقات زیادی انجام شده است. به همین دلیل در سال‌های اخیر توجه زیادی به سمت ضایعات کشاورزی حاوی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی معطوف گردیده است. یکی از این منابع، برگ گردو است که حاوی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی می‌باشد (Pereira

۱، ۲ و ۳- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذائی، استادیار گروه مهندسی مواد و طراحی صنایع غذائی و دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
(*- نویسنده مسئول: Email: jafarism@hotmail.com)
۴-دکتری داروسازی، شرکت داروسازی نیاک، گرگان

5- Butylated hydroxyanisole
6- Butylated hydroxytoluene
7- Tert-butyl hyroquinone

et al., 2007). برگ گردو منبعی غنی از ترکیبات محافظ سلامت است که به طور قابل‌توجهی در طب سنتی برای درمان نارسایی وریدی و بیماری بواسیر کاربرد دارد (Pereira *et al*., 2007). یکی از ارقام رایج گردو در ایران گردوی تویسرکانی می‌باشد. Isabel, *et al*., (2007) عصاره برگ گردو را به عنوان یک گیرنده پراکسیدان معرفی کردند. آن‌ها همچنین وجود پلی‌فنل‌ها را در عصاره برگ گردو شناسایی کردند و کوئرستین ۳ گالاکتوزید را به عنوان مهم‌ترین ترکیب گزارش دادند و بیان کردند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی مشاهده شده در عصاره به علت وجود پلی‌فنول‌ها می‌باشد. در بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی شش رقم مختلف برگ گردو (لارا، فرانکوت، ملانایز، مایته، پاریزین و ماربوت) با روش سنتی گزارش شد که برگ‌های گردو قدرت احیاکنندگی بالا و فعالیت آنتی‌رادیکالی بالایی نشان دادند که بهتر از فعالیت آنتی‌اکسیدانی بوتیلات هیدروکسی آنیزول (BHA) و α توکوفرول بود (Pereira *et al*., 2007).

برای استفاده از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، این ترکیبات باید استخراج گردند. از روش‌های مختلفی برای استخراج ترکیبات فنلی استفاده می‌شود. در گذشته استخراج با حلال از جمله روش غرقابی متداول‌ترین روش استخراج بود. از معایب این روش طولانی بودن زمان استخراج و استفاده از مقادیر زیاد حلال می‌باشد (Wang and Weller, 2006). در سال‌های اخیر استفاده از امواج مایکروویو در استخراج، نتایج ارزنده‌ای را ارائه داده است. این روش باعث افزایش بازده استخراج در زمان کمتر و با استفاده از حلال کمتر، افزایش مقدار ترکیبات استخراج شده و آسیب کمتر به محیط‌زیست می‌گردد (Mandal *et al*., 2007). در واقع مایکروویو امواج الکترومغناطیسی با فرکانس ۰/۳ تا ۳۰۰ گیگاهرتز هستند در این نوع استخراج امواج جذب شده توسط نمونه موجب تولید گرما می‌گردد که منجر به تخریب دیواره و رهایی ترکیبات درون سلولی می‌گردد (Wang and Weller, 2006). در واقع تیمار مایکروویو ساختار داخلی سلول را تحت تاثیر قرار می‌دهد که به فرآیند آبگیری سریع همراه با سرعت گرمادهی بالا نسبت داده می‌شود و اساساً ناشی از بالارفتن ناگهانی دماست. این پدیده، سرعت انتقال جرم را از ترکیبات سازنده دیواره سلول افزایش می‌دهد (Chemat *et al*., 2005). تاکنون هیچ گزارشی در مورد استخراج ترکیبات فنلی از برگ گردو با استفاده از امواج مایکروویو وجود ندارد. اما در استخراج پلی‌فنل‌ها از برگ سبز چای، زمان ۴ دقیقه در استخراج با مایکروویو[1] بازده بالاتری نسبت به ۲۰ ساعت استخراج سنتی در دمای اتاق و ۴۵ دقیقه استخراج به کمک برگشت حرارت[2] نشان داد (Pan *et al*., 2003). در تحقیقی که توسط (Spigno *et al*., 2009) انجام گرفت در استخراج پلی‌فنل‌ها از چای سیاه به کمک امواج مایکروویو، غلظت فنول‌ها بعد از ۹۰ ثانیه اشعه‌دهی، ۴۳/۷ درصد بالاتر از مقدار به‌دست آمده بعد از ۲۱۰ ثانیه خیساندن به روش سنتی بود. در بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پوست لنگان[3] با اتانول ۹۵ درصد و دو روش سنتی و مایکروویو گزارش شد که در هر دو روش، عصاره فعالیت آنتی‌اکسیدانی بهتری نسبت به BHT از خود نشان داد و مایکروویو روشی کاراتر بوده است (Pan *et al*., 2008).

در مورد اثر عصاره‌های طبیعی بر پایداری روغن‌ها نیز فعالیت آنتی‌اکسیدانی برگ دارچین در جلوگیری از اکسایش روغن خردل بررسی و گزارش شد که اسانس با غلظت ۰/۰۲ اثرات قوی‌تری نسبت به BHA، BHT و پروپیل‌گالات داشت (Singh *et al*., 2007). غنی‌سازی روغن زیتون با عصاره برگ زیتون موجب کاهش اندیس پراکسید و افزایش پایداری اکسایشی نسبت به نمونه شاهد گردید (Bouaziz and Sayadi, 2005). از اهداف این پژوهش استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی به روش غرقابی و استخراج به کمک امواج مایکروویو و بررسی ویژگی آنتی‌اکسیدانی ترکیبات حاصله می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق برگ گردو واریته تویسرکانی در مرداد ۸۸ از مرکز جهاد کشاورزی مازندران تهیه شد. برگ‌ها در سایه خشک شدند و توسط آسیاب (ساخت شرکت ایران خودساز) تا مش ۴۰ آسیاب شدند و نمونه‌های حاصل به منظور جلوگیری از نفوذ رطوبت در بسته‌هایی که حاوی دو لایه نایلونی و مقوایی بود در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. تمام مواد شیمیایی و حلال‌های مورد استفاده با بالاترین خلوص از شرکت‌های مرک و سیگما تهیه شدند.

تهیه عصاره به روش استخراج غرقابی

۱۰ گرم برگ خشک شده گردو با نسبت ۱۰:۱ با حلال‌های مختلف (متانول ۸۰ درصد، اتانول ۵۰ درصد، آب با دمای محیط (۳۰ درجه سانتی‌گراد) وآب داغ (۹۵ درجه سانتی‌گراد)) مخلوط شدند (Shun *et al*., 2007). سپس هر چند مدت یکبار با همزن مغناطیسی (RKI مدل RHB) به خوبی همزده شدند. پس از طی زمان استخراج (۶، ۱۲، ۱۸ و ۲۴ ساعت) عصاره‌ها با کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف شدند و عصاره‌های حاصل از حلال‌های آلی ابتدا توسط تبخیرکننده چرخشی (مدل EKA overy 10) تحت دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و سپس با خشک‌کن انجمادی (operun FDB 5503) تحت دمای ۵۰- درجه سانتی‌گراد و عصاره‌های آبی

1- Microwave assisted extraction (MAE)
2- Reflux extraction
3- Longon

فقط با خشک‌کن انجمادی تحت دمای ۵۰- درجه سانتی‌گراد خشک شدند.

تهیه عصاره به روش استخراج با کمک امواج مایکروویو

۵ گرم نمونه با نسبت ۲۰:۱ با حلال‌های مختلف (متانول ۸۰ درصد، اتانول ۵۰ درصد و آب) مخلوط شده و توسط مایکروفر طراحی شده در آزمایشگاه مواد و طراحی صنایع غذایی دانشگاه گرگان تحت اشعه‌دهی قرار گرفتند (chemat *et al*., 2004). مایکروفر طراحی شده دارای یک همزن مغناطیسی با قابلیت تنظیم دورچرخش، کندانسور آب، سنسور دما و کنترل زمان بر روی مایکروفر بود (قره خانی و همکاران، ۱۳۸۸). مدت زمان اشعه‌دهی برای حلال‌های آلی ۲، ۴، ۶ و ۸ دقیقه و برای آب ۳، ۶ و ۹ دقیقه بود. زمان‌ها به کمک روش آزمون و خطا به‌دست آمد. سپس عصاره‌ها با کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف شدند. عصاره‌های حاصل از حلال‌های آلی ابتدا توسط تبخیرکننده چرخشی (مدل EKA overy 10) تحت دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و سپس با خشک‌کن انجمادی (operun FDB 5503) تحت دمای ۵۰- درجه سانتی‌گراد و عصاره‌های آبی فقط با خشک‌کن انجمادی تحت دمای ۵۰- درجه سانتی‌گراد خشک شدند.

اندازه‌گیری ترکیبات فنلی

میزان کل ترکیبات فنلی با روش رنگ‌سنجی فولین‌سیوکالتو سنجش شد (Arabshahi and Urooj, 2007). ۲۰ میکرولیتر از محلول عصاره با ۱/۱۶ میلی‌لیتر آب‌مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالتو مخلوط شد. در ادامه بعد از ۱ تا ۸ دقیقه ۳۰۰ میکرولیتر از محلول (۲۰ درصد) کربنات سدیم اضافه گردید. نمونه‌ها بعد از هم زدن با همزن لوله‌ای به مدت ۳۰ دقیقه در بن‌ماری با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس جذب نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۰ نانومتر خوانده شد. در واقع اساس این واکنش به این صورت است که اسید فسفوتانگستومولیبدیک در حضور ترکیبات شبه‌تاننی (ترکیبات فنولی با وزن مولکولی بالا) درمحیط قلیایی احیا شده و منجر به تشکیل رنگ آبی در محیط واکنش می‌شود که شدت رنگ ایجاد شده درطول موج ۷۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قابل اندازه‌گیری می‌باشد. جهت رسم منحنی استاندارد از اسیدگالیک در محدوده ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام استفاده شد. نتایج برحسب میلی‌گرم گالیک اسید در هر گرم عصاره خشک بیان گردید.

ارزیابی فعالیت مهار رادیکال آزاد دی‌پی‌پی‌اچ[1]

۳ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره‌ی متانولی ۸۰ درصد با ۱ میلی‌لیتر از محلول متانولی یک میلی‌مولار DPPH به شدت مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در مکانی تاریک نگهداری شد و جذب آن در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. نمونه شاهد حاوی ۱ میلی‌لیتر از محلول DPPH و ۳ میلی‌لیتر متانول بود (Li *et al*., 2005). فعالیت بر حسب درصد نسبی DPPH طبق فرمول زیر محاسبه شد.

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

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها به روش قدرت احیاکنندگی

۱ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره در حلال استخراجی با ۲/۵ میلی‌لیتر بافرفسفات (pH=6.6 و M=0.2) و ۲/۵ میلی‌لیتر فری‌سیانیدپتاسیم کاملاً مخلوط و به مدت نیم ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. سپس ۲/۵ میلی‌لیتر تری‌کلرو-راستیک اسید اضافه و نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۷۰۰ در دقیقه سانتریفوژ (Centurion K2042) گردید. پس از آن، ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول رویی با ۲/۵ میلی‌لیتر آب‌مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر کلریدآهن (III) مخلوط و جذب آن در طول موج ۷۰۰ نانومتر خوانده شد (Arabshahi and Urooj, 2007).

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها به روش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل

در این روش ۰/۱ میلی‌لیتر غلظت‌های مختلف عصاره خشک شده و ۱ میلی‌لیتر از معرف (مخلوطی از اسیدسولفوریک ۰/۶ مولار، فسفات‌سدیم ۲۸ میلی‌مولار و مولیبدات‌آمونیوم ۴ میلی‌مولار) را در لوله اپندروف ریخته و پس از دربندی به مدت ۹۰ دقیقه در بن‌ماری (ساخت شرکت فن آزما گستر ایران) نگهداری شد. بعد از سرد شدن آن تا دمای اتاق، جذب در طول موج ۶۹۵ نانومتر قرائت گردید. نمونه شاهد حاوی ۱ میلی‌لیتر محلول معرف و ۰/۱ میلی‌لیتر حلال بود (Prieto *et al*., 1999).

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها در به تاخیر انداختن اکسایش روغن سویا

بدین منظور غلظت‌های مختلف از عصاره متانولی برگ گردو تهیه شده به روش امواج مایکروویو (۲۵۰،۵۰۰ و ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام) و آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی BHA و BHT (۱۰۰ و ۲۰۰ پی‌پی‌ام) به

1 -DPPH radical scavenging activity (DPPH)

روغن سویای تصفیه شده و بدون آنتی‌اکسیدان و بدون اسید سیتریک اضافه گردید و به مدت ۱۶ روز در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. نمونه‌برداری در روزهای صفر، چهار، هشت، دوازده و شانزده انجام پذیرفت و عدد پراکسید (AOAC, 1990) و تیوباربیتوریک-اسید (Goli *et al*., 2005) آن تعیین شد.

تجزیه و تحلیل آماری

کلیه آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. میانگین‌ها با نرم‌افزار SAS و بر اساس آزمون دانکن ($p < 0.05$) مقایسه شدند. نمودارها با نرم‌افزار Excel ترسیم گردیدند.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از استخراج ترکیبات فنولی به روش سنتی

جدول ۱ تاثیر زمان استخراج و نوع حلال را بر میزان ترکیبات فنلی کل برگ گردو نشان می‌دهد. نتایج آنالیز واریانس داده‌های حاصل نشان داد که تاثیر زمان و حلال بر استخراج ترکیبات فنلی معنی‌دار است ($P<۰/۰۵$). بیشترین مقدار ترکیبات فنلی مربوط به عصاره اتانولی (۸۴/۸۷ میلی گرم گالیک اسید در هر گرم وزن خشک) بوده است و عصاره‌های متانولی، آب داغ و آب با دمای محیط در مراتب بعدی قرار داشتند.

همان‌طورکه در جدول ۱ مشاهده می‌شود ترکیبات فنلی موجود در عصاره‌های آبی کمتر از عصاره‌های الکلی بود. زیرا آب به عنوان یک حلال قطبی، ایجاد یک محیط قطبی می‌کند که در این محیط ترکیباتی با قطبیت پایین، کمتر استخراج می‌گردند و به همین علت میزان ترکیبات فنلی استخراج شده با آب کاهش می‌یابد (Chirinos *et al*., 2007). در عوض با افزودن آب به حلال‌های آلی یک محیط نسبتاً قطبی تشکیل می‌گردد که می‌تواند مقادیر و انواع بیشتری از ترکیبات فنلی با قطبیت متوسط را استخراج کند (Chirinos *et al*., 2007). از طرف دیگر حضور مقادیر مناسب آب در حلال آلی، به صورت مطلوبی موجب افزایش تورم بافت گیاهی می‌گردد که این تورم، موجب افزایش سطح تماس بین ماتریکس گیاهی و حلال و در نتیجه افزایش میزان استخراج می‌شود (Li et al, 2010). میزان قطبیت حلال‌های مختلف میزان استخراج ترکیبات فنلی را تحت‌تاثیر قرار می‌دهد (Rumbaoa *et al*., 2009). ترکیبات فنلی عصاره‌های حاصل از حلال‌های مختلف از نظر مقدار ترکیبات فنلی کل، نوع ترکیبات استخراج شده و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی متفاوتند. حلالیت ترکیبات فنلی بسته به نوع حلال، درجه پلیمریزاسیون آن‌ها و برهم‌کنش آن‌ها با سایر ترکیبات موجود در بافت‌های گیاهی متفاوت است (Suzuki *et al*., 2002). در کل حلال‌های اتانول و متانول به صورت مخلوط با آب (۴۰-۸۰ درصد) توانایی بیشتری نسبت به حالت خالص الکل‌ها در استخراج ترکیبات فنلی از بافت‌های گیاهی دارند (Suzuki *et al*., 2002). طبق گزارش (Pereira *et al*., 2007) فلاونوئیدها ترکیب اصلی برگ گردو بوده و مقدار آن از ۵۴/۸ درصد تا ۶۲/۹ درصد کل ترکیبات فنلی متغیر است و به دلیل کم‌محلول بودن فلاونوئید در آب نسبت به اتانول و متانول، می‌توان کمتر بودن مقدار فنول کل در عصاره آبی برگ 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 ترکیبات فنلی در حلال می‌گردد (Sutivisedsak *et al*., 2010). در واقع آب داغ برخی از پلی‌ساکاریدهای پکتیکی را از دیواره سلولی استخراج و موجب شکستن دیواره سلولی می‌گردد (Li *et al*., 2006). همچنین دماهای بالا قطبیت حلال را کاهش داده و بنابراین توانایی حل کردن ترکیباتی با قطبیت کمتر بهبود می‌یابد (Cacace and Mazza, 2006). افزایش دما همچنین کشش سطحی و ویسکوزیته حلال را کاهش و سرعت انتشار و انتقال جرم را افزایش می‌دهد (Ramos *et al*., 2002).

زمان استخراج نیز تاثیر معنی‌داری روی میزان استخراج ترکیبات فنلی کل داشت. زیرا با گذشت زمان حلال فرصت پیدا می‌کند که به درون بافت گیاهی نفوذ کرده و همچنین ترکیبات فنلی نیز فرصت کافی برای جدا شدن از ماتریکس و ورود به حلال را دارند (Spigno *et al*., 2007). همان‌طورکه در جدول ۱ مشاهده می‌شود با افزایش زمان استخراج در حلال‌های آلی میزان ترکیبات فنلی افزایش یافت. در حالی‌که، میزان ترکیبات فنلی در حلال آب داغ تا ۱۸ ساعت افزایش و سپس کاهش پیدا کرد که می‌تواند به دلیل از بین رفتن ترکیبات فنلی کل بر اثر نگهداری طولانی مدت نمونه‌ها در دمای بالا باشد (Bebes *et al*., 2004).

استخراج ترکیبات فنولی به کمک امواج مایکروویو

نتایج آنالیز واریانس نشان داد که در استخراج با امواج مایکروویو تاثیر حلال روی مقدار ترکیبات فنلی در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار بوده است. با افزایش زمان تابش میزان استخراج ترکیبات فنلی افزایش یافت. همچنین متانول ۸۰ درصد با میزان ترکیبات فنلی استخراج شده ۱۱۸/۰۹ میلی‌گرم گالیک اسید در هر گرم وزن خشک، حلال بهینه بود و آب ترکیبات فنلی کمتری (۶۳/۶۹ میلی‌گرم گالیک اسید در هر گرم وزن خشک) را استخراج کرد.

جدول ۱- میزان فنل کل (میلی‌گرم گالیک اسید در هر گرم وزن خشک) برگ گردو واریته تویسرکانی، تحت تاثیر مدت زمان استخراج و نوع حلال در روش غرقابی

حلال	زمان (ساعت)			
	٦	١٢	١٨	٢٤
متانول ۸۰ درصد	۶۲/۱۳ ± ۰/۸۸^{de}	۶۴/۳۳ ± ۰/۳۲^{de}	۶۹/۳۵ ± ۰/۹۶^{cd}	۷۳/۷۷ ± ۰/۷۹^{bc}
اتانول ۵۰ درصد	۶۷/۹۶ ± ۰/۹۶^{cd}	۷۴/۴۳ ± ۰/۶۹^{bc}	۷۷/۴۸ ± ۰/۹۶^{ab}	۸۴/۸۷ ± ۰/۸۷^{a}
آب داغ (۹۵ درجه سانتی‌گراد)	۵۲/۴۰ ± ۰/۲۲^{fg}	۵۲/۸۴ ± ۰/۴۹^{fg}	۵۷/۲۱ ± ۰/۴۳^{ef}	۴۸/۶۹ ± ۰/۵^{hg}
آب با دمای محیط (۳۰ درجه سانتی‌گراد)	۴۰/۸۴ ± ۰/۱۷^{i}	۴۴/۴۶ ± ۰/۴۱^{hi}	۴۶/۵۵ ± ۰/۸۷^{hgi}	۴۸/۸۲ ± ۰/۶۴^{hg}

اعداد (± خطای استاندارد) دارای حروف مشترک از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

جدول۲- مقایسه میانگین مقادیر مختلف فنل کل (میلی‌گرم گالیک اسید در هر گرم وزن خشک حاصل از استخراج به کمک امواج مایکروویو در زمان‌ها و حلال‌های مختلف در برگ واریته تویسرکانی

حلال	زمان (دقیقه)					
	۲	۳	٤	٦	۸	۹
متانول۸۰ درصد	۸۸/۵۰±۰/۱۲^{c}	–	۹۶/۳۳±۰/۲۲^{c}	۱۰۶/۹۲±۰/۹۸^{b}	۱۱۸/۰۹±۰/۶۲^{a}	–
اتانول ۵۰ درصد	۷۸/۳۸±۰/۶۵^{c}	–	۸۸/۵۲±۰/۷۱^{c}	۹۱/۹۷±۰/۷۹^{c}	۹۵/۵۴±۰/۷۳^{c}	–
آب	–	۶۳/۶۹±۰/۶۲^{e}	–	۶۷/۰۷±۰/۵۹^{e}	–	۶۷/۸۴±۰/۲۹^{e}

حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد.

دلیل اینکه متانول حلال بهینه در این استخراج بود را می‌توان این‌گونه توجیه کرد که در این نوع استخراج برخی پارامترهای فیزیکی مانند حلالیت ترکیب مورد نظر، ثابت دی‌الکتریک و فاکتور اتلاف باید در نظر گرفته شوند. حلال‌هایی با ثابت دی‌الکتریک بالاتر مقادیر بیشتری از انرژی مایکروویو را جذب می‌کنند (Wang and Weller, 2006). همچنین هرچه فاکتور اتلاف بالاتر باشد گرما سریع‌تر در ماتریکس توزیع گشته و گرما سریع‌تر به حلال انتقال می‌یابد. آب با اینکه بالاترین ضریب دی‌الکتریک را دارد ولی فاکتور اتلاف آن به طور معنی‌داری پایین‌تر از حلال‌های دیگر است. این امر، موجب ایجاد پدیده‌ای تحت عنوان فوق‌داغ شدن می‌گردد. بنابراین گرمای زیادی را جذب می کند اما به علت پایین بودن فاکتور اتلاف آن گرمای کمتری را به محیط می‌دهد که این امر منجر به گرم شدن بیش از حد محیط استخراج (حلال و نمونه داخل آن) و در نتیجه تخریب گرمایی برخی از ترکیبات فنولی می شود (Proestos and Mandal *et al*., 2007 ؛ Komaitis, 2008). در نتیجه گرمادهی شدید منجر به تخریب ترکیبات حساس به حرارت می‌گردد. بنابراین بهتر است حلالی انتخاب گردد که علاوه بر داشتن ثابت دی‌الکتریک بالا، فاکتور اتلاف بالایی هم داشته باشد تا توزیع گرما در سرتاسر ماتریکس تسهیل گردد. اما متانول ثابت دی‌الکتریک بالا و فاکتور اتلاف مناسبی دارد. بنابراین بهتر از اتانول و آب جواب داده است (Proestos and Komaitis, 2008). محققان ترکیبات فنلی بقایای *vitis vinifera* را با حلال‌های اتانول و متانول استخراج کردند. متانول حلال بهینه بوده که مطابق با نتایج این پژوهش می‌باشد (Casazza *et al*., 2010).

جدول ۳- مقادیر فاکتور اتلاف و ثابت دی‌الکتریک مربوط به حلال‌های متداول در MAE (Wang and Weller, 2006)

حلال	ثابت دی‌الکتریک	فاکتور اتلاف
اتانول	۲۴/۳	۲۵۰۰
متانول	۳۲/۶	۶۴۰۰
آب	۷۸/۳	۱۵۷۰

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

در شکل ۱ مقدار فنول کل حاصل از دو روش مقایسه شده است. همان‌طورکه مشاهده می‌شود مقدار فنول کل در روش مایکروویو در هر سه حلال بیشتر از روش غرقابی می‌باشد، زیرا در استخراج مایکروویو امواج جذب شده توسط نمونه گرما تولید می‌کند که این گرما موجب تبخیر آب نمونه و اعمال فشار روی دیواره سلولی می‌گردد که دیواره را تخریب و ترکیبات درون سلول را رها می‌کند.

مهاجرت یون‌های محلول، نفوذ حلال را به درون ماتریکس افزایش داده و بنابراین رهایی این ترکیبات را تسهیل می‌سازد (Wang and Weller, 2006). تاثیر انرژی مایکروویو به

ویژگی‌های دی‌الکتریک حلال و ماتریکس گیاهی بستگی دارد (Wang and Weller, 2006). ملکول‌های قطبی انرژی مایکروویو را به شدت جذب می‌کنند، زیرا آن‌ها یک گشتاور دوقطبی ثابت دارند (Proestos and Komaitis, 2008). دما و فشار متمرکز می‌تواند منجر به مهاجرت انتخابی سریع‌تر ترکیبات هدف از ماتریکس به محیط احاطه کننده و بازیابی و بازده بهتر استخراج نسبت به روش سنتی گردد و با فوایدی مانند کاهش زمان استخراج و کاهش مصرف حلال همراه می‌باشد. علت اینکه حلال بهینه در دو روش استخراج متفاوت بوده است را می‌توان این‌گونه توجیه کرد: در مقایسه بین این دو روش، نوع حلال مصرفی بسیار مهم است. در استخراج سنتی، قابلیت استخراج حلال‌های مختلف اساساً بستگی به محلولیت ترکیب موردنظر در حلال، سینیتیک انتقال جرم محصول و قدرت برهم‌کنش ماتریکس و ماده حل‌شونده دارد. درحالی‌که در روش استخراج مایکروویو شدت گرمادهی نقش مهمی در کارایی استخراج دارد. به منظور گرم شدن سریع تحت اشعه‌دهی با مایکروویو، حلال باید ثابت دی‌الکتریک و ثابت افت دی‌الکتریک بالا داشته باشد. آب ثابت دی‌الکتریک بالایی دارد و افزودن آن به حلال‌های آلی مانند اتانول و متانول می‌تواند شاخص قطبیت این حلال‌ها را افزایش داده و باعث افزایش ثابت دی‌الکتریک مخلوط گردد (Spigno and De Faveri, 2009). افزایش دما منجر به بهبود کارایی استخراج می‌گردد البته تا جایی که منجر به تخریب ترکیبات نگردد. دلیل این امر را این‌گونه توضیح می‌دهند که افزایش دما منجر به افزایش واجذبی ترکیبات از ماتریکس می‌شود. همچنین با افزایش دما حلال ظرفیت بالاتری برای محلول‌سازی آنالیت‌ها دارد. در عین حال کشش سطحی و ویسکوزیته حلال کاهش یافته و مرطوب‌سازی نمونه و نفوذ به ماتریکس افزایش می‌یابد. اما دماهای خیلی بالا موجب تخریب ترکیبات می‌گردد (Li *et al*., 2010). بنابراین مقدار ترکیبات فنلی استخراج شده با روش مایکروویو بالاتر از روش غرقابی بوده است که در تطابق با نتایج Lujan *et al*., 2006 در مورد برگ زیتون، Sutivisedsak *et al*., 2010 در مورد لوبیا Proestos and Komaitis, 2008 در مورد رزماری و پونه کوهی و Pan *et al*., 2003 در مورد برگ‌های سبز چای بوده است.

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های حاصل از برگ گردو

توانایی مهار رادیکال آزاد DPPH در عصاره‌های حاصل از استخراج سنتی

نتایج آنالیز واریانس نشان داد که نوع و غلظت عصاره‌ها و آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی تاثیر معنی‌داری روی مهار رادیکال DPPH دارد ($P<0/05$). فعالیت آنتی‌رادیکالی در همه نمونه‌ها وابسته به غلظت بود. شکل ۲ میزان مهار رادیکال آزاد DPPH در حضور غلظت‌های مختلف عصاره برگ تویسرکانی حاصل از استخراج سنتی نشان می‌دهد. در بین عصاره‌ها، عصاره اتانولی بالاترین فعالیت آنتی‌رادیکالی را دارا بود که حتی در غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر فعالیت مهارکنندگی بالاتری نسبت به BHT داشت (به طور معنی‌داری در سطح ۵ درصد) و در غلظت‌های ۲۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اختلاف معنی‌داری با BHT نداشت. همه عصاره‌ها در همه غلظت‌ها (به استثنای عصاره آبی در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) فعالیت بهتری نسبت به BHA داشتند. بالاتر بودن فعالیت مهارکنندگی را می‌توان به محتوی فنلی نسبت داد، زیرا در عصاره اتانولی حاصل از برگ تویسرکانی شاهد بالاترین مقدار ترکیبات فنلی (۸۴/۸۷ میلی‌گرم گالیک اسید در هر گرم وزن خشک) بودیم.

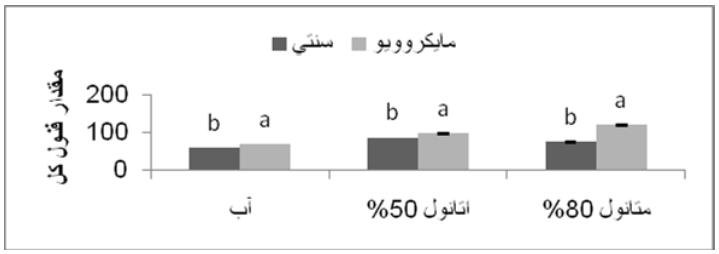
بررسی توانایی مهار رادیکال آزاد DPPH عصاره‌های حاصل از امواج مایکروویو

نتایج آنالیز واریانس نشان داد که نوع و غلظت عصاره‌ها و آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی تاثیر معنی‌داری روی مهار رادیکال آزاد DPPH داشت ($P<0/05$). همان‌طورکه در شکل ۳ مشاهده می‌شود عصاره اتانولی در همه غلظت‌ها فعالیت بالاتری نسبت به سایر عصاره‌ها داشت. همچنین عصاره‌های الکلی در همه غلظت‌ها فعالیت مهاری بالاتری نسبت به BHA داشتند و در غلظت‌های پایین فعالیت بهتری نسبت به BHT نشان دادند. عصاره آبی نیز فعالیت مهاری بهتری نسبت به BHA داشت و در غلظت ۱۲/۵ و ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر فعالیت مهاری بهتری نسبت به BHT داشت. برای مقایسه فعالیت ضدرادیکالی عصاره‌ها از فاکتوری تحت عنوان EC_{50} استفاده می‌گردد. طبق تعریف EC_{50} به غلظتی از عصاره اطلاق می‌گردد که در آن ۵۰ درصد از رادیکال‌های DPPH مهار شوند. با توجه به مقادیر ارائه شده در جدول ۴، همه عصاره‌ها EC_{50} کمتری از BHA داشتند. عصاره اتانولی با وجود کمتر بودن مقدار EC_{50} تفاوت معنی‌داری با BHT نداشت. BHT با EC_{50} معادل ۳۵/۸۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر فعالیت مهاری بالاتری نسبت به عصاره‌های متانولی و آبی داشت. در بین عصاره‌ها، عصاره اتانولی کمترین EC_{50} (۳۴/۳۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و در نتیجه بالاترین فعالیت آنتی‌رادیکالی داشت و عصاره آبی (۸۲/۷۳ میگروگرم بر میلی‌لیتر) کمترین فعالیت آنتی‌رادیکالی را دارا بود، همان‌طورکه بیان شد این تفاوت در مقادیر EC_{50} به‌دلیل اختلاف در مقادیر فنول عصاره‌ها می‌باشد (Barreira *et al*., 2008). این محققان گزارش کردند که نمونه‌هایی با مقادیر پلی‌فنل بالاتر EC_{50} کمتری نشان دادند. در استخراج مایکروویو، عصاره اتانولی در بین عصاره‌ها کمترین EC_{50} معادل ۲۷/۹۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و در نتیجه بالاترین

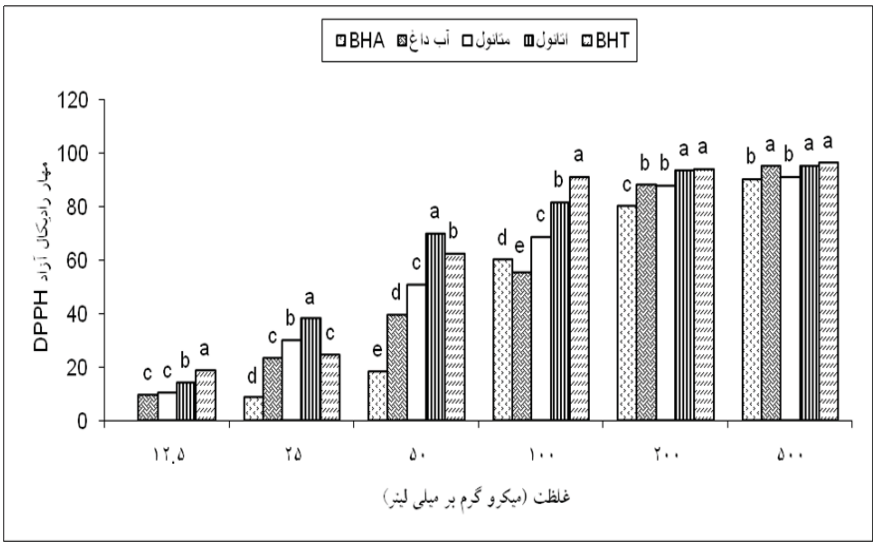
فعالیت آنتی‌رادیکالی را دارا بود که حتی از BHA (۸۵/۷۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و BHT (۳۵/۸۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بهتر عمل کرده است. همچنین عصاره آبی (۵۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر) کمترین فعالیت آنتی‌رادیکالی را بین عصاره‌ها داشت که با این‌حال فعالیت بهتری نسبت به BHA از خود نشان داد. عصاره متانولی (۳۱/۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر) نیز فعالیت بهتری نسبت به BHA و BHT از خود نشان داد.

فعالیت آنتی رادیکالی عصاره‌ها وابسته به غلظت بوده (شکل‌های ۲و ۳) و با افزایش غلظت این فعالیت افزایش می‌یابد، زیرا در غلظت‌های بالاتر ترکیبات فنلی، به دلیل افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل موجود در محیط واکنش، احتمال اهداء هیدروژن به رادیکال‌های آزاد و به دنبال آن قدرت مهارکنندگی عصاره افزایش می‌یابد (Sanchez-Moreno *et al*., 1999). اما همان‌طورکه در شکل‌های ۲ و ۳ مشهود است در غلظت‌های بالاتر با افزایش غلظت مهار رادیکال آزاد تغییری قابل محسوسی مشاهده نمی‌شود، زیرا یک غلظت بحرانی از فنول‌ها برای کسب فعالیت آنتی‌اکسیدانی مطلوب کافی است.

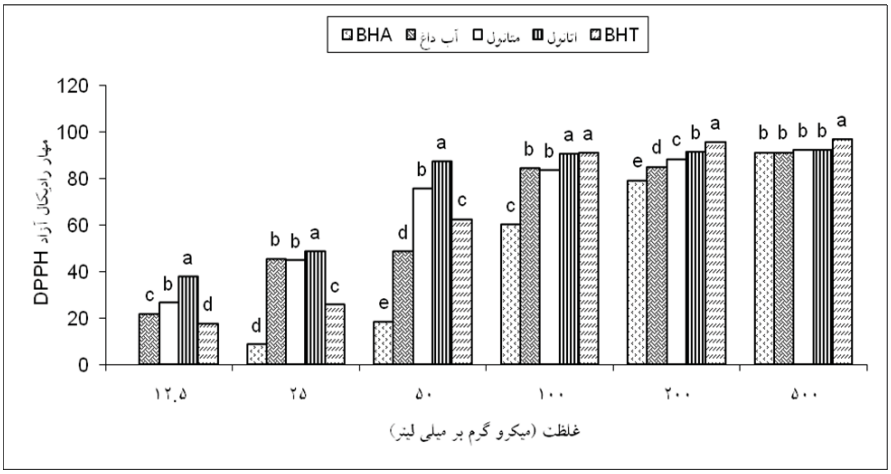
در غلظت‌های بالاتر از این غلظت بحرانی، یک اثر اشباع‌شدگی بوجود می‌آید که موجب می‌شود حضور فنول‌های اضافی فعالیت آنتی‌اکسیدانی را افزایش ندهد (Rumbaoa *et al*., 2009). ترکیبات فنلی به‌صورت مؤثری به عنوان دهنده هیدروژن عمل نموده، لذا به عنوان یک آنتی‌اکسیدان مؤثر عمل می‌کنند (کامکار، ۱۳۸۸). عصاره برگ گردو سرشار از ترکیبات فنلی می‌باشد و در واقع این ترکیبات گروه مهمی از ترکیبات گیاهی به‌عنوان متابولیت‌های ثانویه را تشکیل می‌دهند که در پاسخ به استرس‌های محیطی تولید می‌شوند. این ترکیبات به‌دلیل داشتن گروه‌های هیدروکسیل، توانایی خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد و مهار رادیکال را دارند (Pereira *et al*., 2007). ارتباط مقدار پلی‌فنل‌ها با فعالیت آنتی‌اکسیدانی ثابت می‌کند که پلی‌فنل‌ها احتمالاً در فعالیت مهار رادیکال آزاد این عصاره‌های گیاهی نقش دارند. در واقع برگ گردو مقدار قابل‌توجهی هتروزیدهای کوئرستین دارد.



شکل ۱- مقدار فنول کل حاصل از استخراج سنتی و استخراج به کمک امواج مایکروویو



شکل۲- مقایسه میانگین درصد مهارکنندگی رادیکال DPPH غلظت‌های مختلف عصاره‌های حاصل از برگ گردو واریته تویسرکانی، BHA و BHT (روش غرقابی)



شکل۳- مقایسه میانگین درصد مهارکنندگی رادیکال DPPH غلظت‌های مختلف عصاره‌های حاصل از برگ گردو واریته تویسرکانی، BHA و BHT (روش مایکروویو)

جدول٤- مقایسه میانگین مقادیر مختلف EC50 (میکروگرم در هر میلی‌لیتر) عصاره برگ تویسرکانی حاصل از استخراج غرقابی و مایکروویو در آزمون‌های مختلف

		عصاره				آنتی‌اکسیدان سنتزی	
EC_{50}	استخراج	عصاره‌متانولی	عصاره اتانولی	عصاره آبی	BHA	BHT
مهار رادیکال DPPH	غرقابی	۴۹/۰۱^{b}	۳۴/۳۵^{c}	۸۲/۷۳^{a}	۸۵/۷۳^{a}	۳۵/۸۷^{c}
	مایکروویو	۳۱/۱۶^{d}	۲۷/۹۰^{d}	۵۴/۰۰^{b}	۸۵/۷۳^{a}	۳۵/۸۷^{c}
قدرت احیاکنندگی	غرقابی	۲۵۲/۳۲^{b}	۱۵۱/۵۶^{d}	۳۴۲/۷۰^{a}	۱۶۸/۶۶^{c}	۵۴/۶۳^{e}
	مایکروویو	۱۱۴/۱۵^{b}	۹۳/۲۶^{c}	۱۲۹/۴۶^{b}	۱۶۸/۶۶^{a}	۵۴/۶۳^{d}
ظرفیت آنتی اکسیدانی کل	غرقابی	۹۵/۲۱^{e}	۱۴۳/۰۲^{c}	۱۸۴/۱۶^{a}	۱۵۸/۲۳^{b}	۹۹/۱۹^{d}
	مایکروویو	۷۶/۱۵^{d}	۶۸/۲۳^{e}	۹۱/۱۸^{c}	۱۵۸/۲۳^{a}	۹۹/۱۹^{b}

حروف غیرمشابه در هر سطر بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد.

کوئرستین مانند گلیکوزیدهای دیگر قادر به محافظت در برابر آسیب به DNA در لمفوسیت‌ها و افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پلاسما می‌باشد که پایداری ژنوم را افزایش می‌دهد (Pereira *et al*., 2007). فلاونوئیدهای موجود در برگ گردو همچنین دارای ویژگی مهار رادیکال آزاد هستند (Pereira *et al*., 2007).

همان‌طورکه در جدول ۴ مشاهده می‌شود فعالیت آنتی‌رادیکالی عصاره‌های مختلف باهم متفاوت است که تفاوت در فعالیت آنتی‌رادیکالی را به دلایل مختلف می‌توان نسبت داد. اما به دلیل ساختار پیچیده عصاره‌ها بیان همبستگی میان فعالیت آنتی‌رادیکالی و ترکیبات موجود در عصاره‌ها به آسانی امکان‌پذیر نیست که می‌توان به تفاوت در نوع و مقدار ترکیبات موثر موجود در آن‌ها نسبت داد. تعداد گروه‌های هیدروکسیل موجود در ساختار آنتی‌اکسیدان معمولا فاکتور تعیین‌کننده نیست. موقعیت گروه‌های هیدروکسیل، حضورگروه‌های عاملی دیگر مانند پیوندهای دوگانه و ترکیب گروه‌های هیدروکسیل و گروه‌های کتونی نقش مهمی در فعالیت آنتی‌اکسیدانی ایفا می‌کند.

اطلاعات به‌دست آمده روشن کرد که عصاره‌ها حاوی آنتی‌اکسیدان‌های اولیه هستند که با رادیکال‌های آزاد واکنش می‌دهند. در پژوهش (Pereira *et al*., 2007) میزان مهار رادیکال آزاد DPPH در غلظت‌های مختلف عصاره واریته‌های مختلف برگ گردو مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد، با افزایش غلظت عصاره‌ها مهار رادیکال‌های آزاد به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت .هم چنین در غلظت‌های بالا، فعالیت رادیکال‌زدائی عصاره‌ها به‌طور معنی‌دار افزایش نیافت که با نتایج به دست آمده در این بررسی مطابقت داشت. در بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی سه واریته برگ فندق (بولویلر، فرتایل دکوتارد، داویانا) مقدار EC_{50} در آزمون DPPH به ترتیب ۰/۲۰۳، ۰/۱۶۴ و ۰/۱۸۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش شد (Olivera *et al*., 2007). همچنین (Turkmen *et al*.,2006) گزارش کردند اثر حلال‌های مورد استفاده در استخراج پلی‌فنل‌ها اثر معنی‌داری روی فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPHداشت که مطابق با نتایج این پژوهش است. پلی‌فنل‌ها

توانایی دهندگی هیدروژن به رادیکال DPPH را دارند که به دلیل ساختار شیمیایی آن‌ها می‌باشد. عصاره‌های به‌دست آمده با حلال‌هایی با قطبیت بالاتر، به‌طور قابل‌توجهی فعالیت مهاری بالاتری نسبت به حلال‌هایی با قطبیت کمتر داشتند که نشان‌دهنده این مطلب است که آنتی‌اکسیدان‌ها و ترکیبات فعال زیستی با قطبیت مختلف وجود دارند. تغییر در قطبیت حلال، توانایی آن حلال را در حل کردن یک گروه خاص از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی تغییر می‌دهد و ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی را تحت‌تاثیر قرار می‌دهد. بنابراین مطابق نتایج این پژوهش فعالیت آنتی رادیکالی حاصل از حلال‌های مختلف باهم متفاوت است.

بررسی قدرت احیاکنندگی عصاره‌های حاصل از استخراج سنتی

نتایج آنالیز واریانس نشان داد که نوع و غلظت عصاره‌ها و آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی تاثیر معنی‌داری روی نیروی مهارکنندگی عصاره‌ها داشت ($P<0/05$). همان‌طورکه از شکل ۴ مشهود است در همه نمونه‌ها قدرت احیاکنندگی آهن وابسته به غلظت بود. در میان عصاره‌ها، عصاره اتانولی بالاترین قدرت احیاکنندگی و عصاره آبی در اکثر غلظت‌ها کمترین قدرت احیاکنندگی را دارا بود. BHT بالاترین قدرت احیاکنندگی را داشت و هیچ‌یک از عصاره‌ها قابل رقابت با BHT نبودند. در غلظت‌های پایین قدرت احیاکنندگی عصاره اتانولی بهتر از BHA بوده است اما در غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به بالا این روند معکوس می‌گردد. عصاره متانولی و آبی در غلظت‌های پایین اختلاف معنی‌داری با BHA نشان نداد.

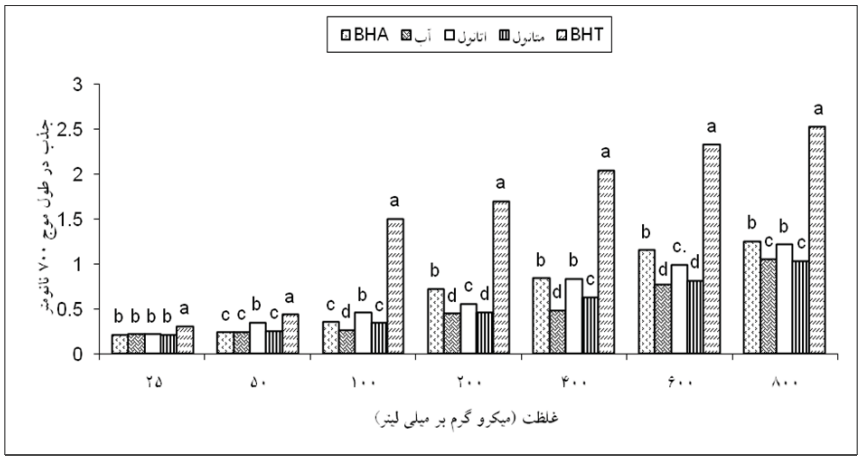
بررسی قدرت احیاکنندگی عصاره‌های حاصل از استخراج با امواج مایکروویو

نتایج آنالیز واریانس نشان داد که نوع و غلظت عصاره‌ها و آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی تاثیر معنی‌داری روی قدرت احیاکنندگی عصاره‌ها داشت ($P<0/05$). با توجه به شکل ۵ در میان عصاره‌ها، عصاره اتانولی در اکثر غلظت‌ها بالاترین قدرت احیاکنندگی و عصاره آبی در اکثر غلظت‌ها کمترین قدرت احیاکنندگی را دارا بود. BHT بالاترین قدرت احیاکنندگی را داشت و هیچ یک از عصاره‌ها قابل رقابت با BHT نبودند. در اکثر غلظت‌های مورد مطالعه، عصاره‌ها قدرت احیاکنندگی بالاتری نسبت به BHA داشتند. معمولا برای مقایسه قدرت احیاکنندگی 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. بنابراین هر چه این غلظت کمتر باشد نشان‌دهنده قدرت احیاکنندگی بالاتر عصاره‌هاست. مقادیر EC_{50} عصاره‌ها در جدول ۴ آورده شده است. در استخراج سنتی، هر سه عصاره قدرت احیاکنندگی ضعیف‌تری نسبت به BHT (۵۴/۶۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از خود نشان دادند. عصاره اتانولی (۱۵۱/۵۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر) فعالیت بالاتری نسبت به BHA (۱۶۸/۶۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر) داشت. در استخراج به کمک مایکروویو، هر سه عصاره قدرت احیاکنندگی قوی‌تری نسبت به BHA (۱۶۸/۶۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از خود نشان دادند و اختلاف بین آن‌ها معنی‌دار بوده است.

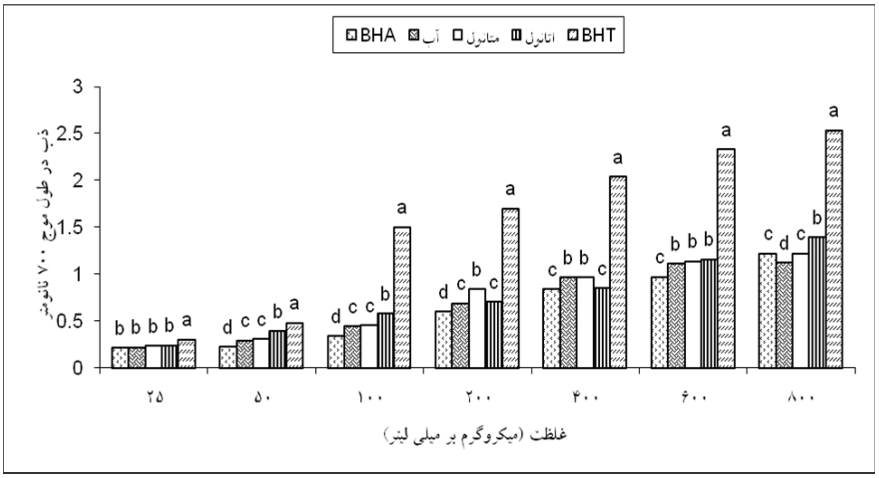
ویژگی احیاکنندگی در ارتباط با حضور احیاکننده‌ها می‌باشد (Barreira *et al*., 2008). همچنان که از شکل‌های ۴ و ۵ مشهود است با افزایش غلظت عصاره‌ها قدرت احیاکنندگی افزایش یافت، زیرا با افزایش میزان ترکیبات فنولی موجود در عصاره، قدرت احیاکنندگی آن افزایش می‌یابد در نتیجه عصاره قادر خواهد بود با اهداء الکترون یا اتم‌های هیدروژن واکنش‌های زنجیری تشکیل رادیکال‌های آزاد را شکسته و اکسایش چربی را به تاخیر بیاندازد (کوماران و کاروناکاران، ۲۰۰۷). وجود ردکتون‌ها (عوامل احیاکننده) کلید اصلی قدرت احیاکنندگی است که فعالیت آنتی‌اکسیدانی را از طریق شکستن واکنش زنجیری رادیکال آزاد انجام می‌دهند. (Pereira *et al*., 2007) با بررسی نیروی احیاکنندگی عصاره آبی شش رقم مختلف برگ گردو (لارا، پاریزین، ملانایز، فرانکوت، مایته و ماربوت)گزارش کردند که قدرت احیاکنندگی عصاره‌ها وابسته به غلظت بود که مطابق با نتایج این پژوهش بوده است. مقدار EC_{50} این عصاره‌ها به ترتیب ۰/۱۹، ۰/۲۰۱، ۰/۲۰۶، ۰/۲۰۸، ۰/۲۱۵، ۰/۲۲۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است. محققان دیگر قدرت احیاکنندگی عصاره‌های گیاهی مختلف را بررسی کردند. در بررسی قدرت احیاکنندگی عصاره آبی سه واریته برگ فندق (بولویلر، فرتایل دی کوتارد، داویانا) توسط (Olivera *et al*., 2007) EC_{50} این عصاره‌ها به ترتیب ۰/۲۲۴، ۰/۱۹۹ و ۰/۲۲۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش شد و مطابق با نتایج این پژوهش با افزایش غلظت قدرت احیاکنندگی عصاره‌ها افزایش یافت.

بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره‌های حاصل از استخراج سنتی

نتایج آنالیز واریانس نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها وجود دارد ($P<0/05$). با توجه به شکل ۶ در میان عصاره‌ها، عصاره متانولی بالاترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را نشان داد که در اکثر غلظت‌ها فعالیت بالاتری نسبت به BHT و در همه غلظت‌ها فعالیت بالاتری نسبت به BHA نشان داد. همچنین عصاره آبی و اتانولی در غلظت‌های بالا فعالیت بالاتری نسبت به BHA از خود نشان دادند.



شکل ٤- مقایسه میانگین قدرت احیاکنندگی غلظت‌های مختلف عصاره آبی و الکلی برگ گردو واریته تویسرکانی، BHA و BHT (روش سنتی)



شکل ٥- مقایسه میانگین قدرت احیاکنندگی غلظت‌های مختلف عصاره آبی و الکلی برگ گردو واریته تویسرکانی، BHA و BHT (روش مایکروویو)

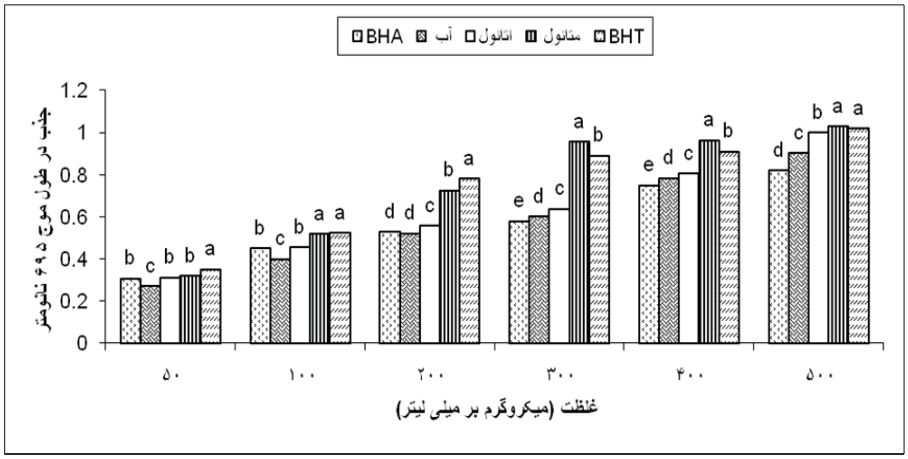
بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره‌های حاصل از استخراج با کمک مایکروویو

نتایج آنالیز واریانس نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها وجود دارد ($P<0/05$). همان‌طورکه در شکل ۷ مشاهده می‌شود آنتی‌اکسیدان سنتزی BHA کم‌ترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل را دارا بود که قابل رقابت با عصاره‌ها نبود. در بین عصاره‌ها، عصاره متانولی در همه غلظت‌ها فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت به عصاره‌های آبی، اتانولی و BHA داشت و به استثنای غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر فعالیت بالاتری نسبت به BHT داشت و عصاره اتانولی و آبی به‌ترتیب در مراتب بعدی قرار داشتند. معمولاً برای مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره‌های مختلف از فاکتوری تحت عنوان EC_{50} استفاده می‌گردد. طبق تعریف EC_{50} به غلظتی از عصاره اطلاق می‌گردد که در طول موج ۶۹۵ نانومتر جذبی معادل ۰/۵ داشته باشد. همان‌طورکه در جدول ۴ مشاهده می‌گردد در استخراج سنتی بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتر مربوط به عصاره متانولی (۹۵/۲۱ میکروگرم بر میلی لیتر) بود که نسبت به BHA (۱۵۸/۲۳ میکروگرم بر میلی لیتر) و BHT (۹۹/۱۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر) قوی‌تر عمل کرد. عصاره اتانولی (۱۴۳/۰۲ میکروگرم بر میلی لیتر) فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت به BHA (۱۵۸/۲۳ میکروگرم بر میلی لیتر) و کمتری نسبت به BHT (۹۹/۱۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر) داشت. تفاوت مشاهده شده بین EC_{50} عصاره‌های مختلف را می‌توان به تفاوت در مقادیر ترکیبات فنلی آن‌ها نسبت داد. در پژوهش Arabshahi and urooj (2007) ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره‌های متانولی، استونی و آبی و BHT به ترتیب ۱/۳۹۳، ۱/۳۸۶، ۰/۶۶ و ۳/۹۲۱ معادل آلفاتوکوفرول در گرم عصاره بود و بیانگر ارتباط مستقیم میان مقدار ترکیبات فنلی و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل بوده است.

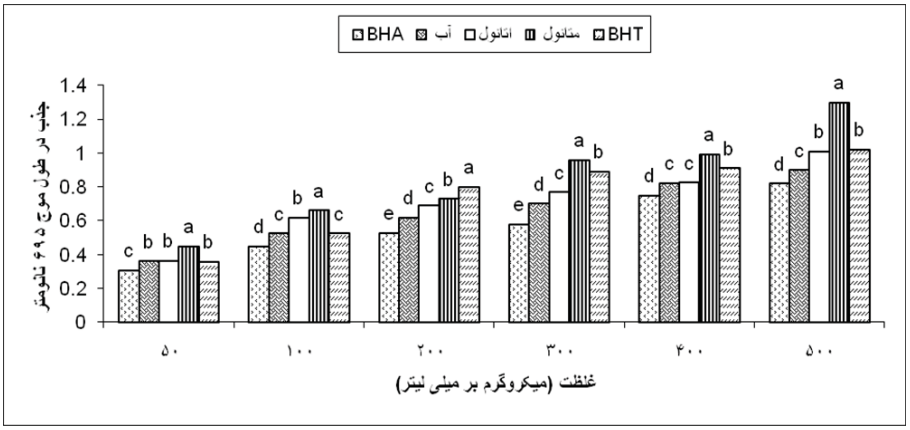
همان‌طورکه مشاهده شد مقادیر EC_{50} در آزمون‌های مختلف متفاوت بوده است. این اختلاف در نتایج حاصله بیانگر این است که طبیعت فیزیکوشیمیایی فنول‌های موجود در عصاره مهم‌تر از محتوی فنلی کل اندازه‌گیری شده توسط روش فولین‌سیوکالتیو در ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. همچنین این مطلب نشان می‌دهد که تفاوت در فعالیت آنتی‌اکسیدانی در روش‌های مختلف (روش فولین سیوکالتیو، سنجش مهار DPPH، سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل و قدرت احیاکنندگی) به مقدار زیادی به طبیعت آب‌دوست و آب‌گریز فنول‌های موجود و نسبت آن‌ها وابسته می‌باشد. سنجش DPPH به‌طور اساسی 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). علاوه بر این روش‌های مختلف تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی وابسته به شرایط واکنش، نوع سوبسترا، نوع آزمون، نوع آنتی‌اکسیدان می‌باشد (Contini *et al.*, 2005). مقدار فنول کل دارای همبستگی و ارتباط مستقیم با فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. بنابراین فعالیت آنتی‌اکسیدانی منعکس کننده مقدار ترکیبات فنلی است.

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها در روغن سویا

جدول شماره ۵ مقایسه میانگین‌های اعداد پراکسید و تیوباربیتوریک اسید را در مجموع روزهای ۴، ۸، ۱۲، ۱۶ نشان می‌دهد. در بررسی میانگین اعداد پراکسید مشخص شد که نمونه شاهد دارای بالاترین مقدار اعداد پراکسید (۱۰۶/۱۳ میلی اکی‌والان بر کیلوگرم روغن) بوده و تفاوت معنی‌داری ($P<0/05$) با تیمارهای دیگر داشت. همه آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی بهتر از آنتی‌اکسیدان سنتزی BHA در غلظت ۱۰۰ پی‌پی‌ام (۷۳/۸۳ میلی اکی‌والان بر کیلوگرم روغن) توانستند از اکسایش جلوگیری کنند و تفاوت بین آن‌ها معنی‌دار بود.



شکل ٦- مقایسه میانگین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل غلظت‌های مختلف عصاره‌های برگ گردو واریته تویسرکانی حاصل از استخراج سنتی و BHA و BHT



شکل ۷- مقایسه میانگین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل غلظت‌های مختلف عصاره‌های برگ گردو واریته تویسرکانی حاصل از استخراج به کمک امواج

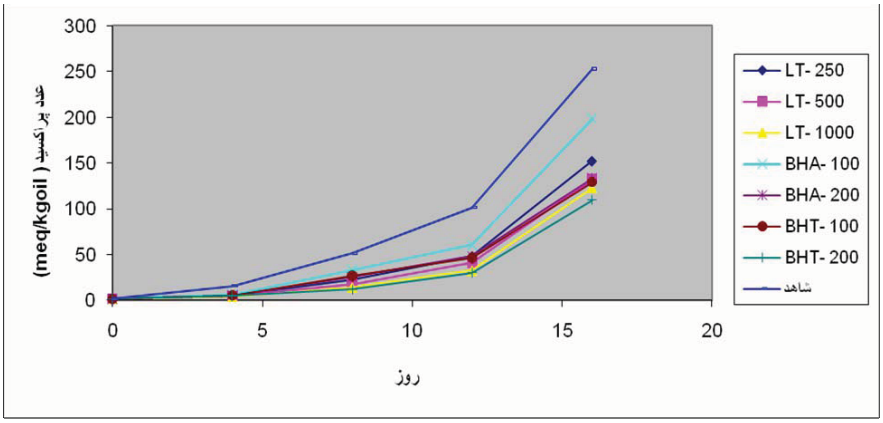
غلظت‌های ۵۰۰ پی‌پی‌ام (۴۸/۹۹ میلی اکی‌والان بر کیلوگرم روغن) و ۱۰۰۰ پی‌پی ام (۴۴/۲۲ میلی اکی‌والان بر کیلوگرم روغن) عصاره بهتر از BHA-100 (۷۳/۸۳ میلی اکی‌والان بر کیلوگرم روغن)، BHA-200 (۵۳/۰۴ میلی اکی‌والان بر کیلوگرم روغن) و BHT-100 (۵۱/۶۷ میلی اکی‌والان بر کیلوگرم روغن) اکسیداسیون را به تاخیر انداخته است. شکل ۸ مقادیر عدد پراکسید را در همه روزهای آزمایش برای هر رقم و مقایسه آن با نمونه شاهد و آنتی-اکسیدان‌های سنتزی نشان می‌دهد. با افزایش زمان نگهداری نمونه‌ها در شرایط اکسایش، اعداد پراکسید افزایش یافته است. در همه روزها نمونه شاهد بالاترین مقدار عدد پراکسید را داشت و BHA-100 در مرتبه بعدی قرار داشت.

با توجه به مقادیر اندیس تیوباربیتوریک‌اسید ارائه شده در جدول ۵ نیز مشخص شد که نمونه شاهد دارای بالاترین مقدار این اندیس (۰/۲۸۹ میلی‌گرم مالون آلدهید در هر کیلوگرم روغن) بود که اختلاف معنی‌داری با تیمارها داشت ($P<0/05$). همه عصاره‌ها بهتر از BHA-100 (۰/۱۸۵ میلی‌گرم مالون آلدهید در هر کیلوگرم روغن) عمل کردند. غلظت ۲۵۰ پی‌پی‌ام عصاره (۰/۱۶۶ میلی‌گرم مالون-آلدهید در هر کیلوگرم روغن) بهتر از BHA-100 (۰/۱۸۵ میلی‌گرم مالون‌آلدهید در هر کیلوگرم روغن) عمل کرده و اختلاف معنی‌داری با BHA-200 (۰/۱۶۳ میلی‌گرم مالون‌آلدهید در هر کیلوگرم روغن) نداشته است. غلظت ۵۰۰ پی‌پی ام عصاره (۰/۱۴۶ میلی‌گرم مالون-آلدهید در هر کیلوگرم روغن) بهتر از BHA در هر دو غلظت عمل کرده و اختلاف معنی‌داری با BHT در هر دو غلظت نداشته است. غلظت ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام عصاره (۰/۱۲۴ میلی‌گرم مالون‌آلدهید در هر کیلوگرم روغن) بهتر از BHA و BHT در هر دو غلظت عمل کرده است. اثر غلظت نیز در مهار اکسایش معنی‌دار بوده است و با افزایش غلظت در همه آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی و طبیعی اکسایش بیشتر به تاخیر افتاد. شکل ۹ مقادیر اندیس تیوباربیتوریک را در همه روزهای آزمایش و مقایسه آن با نمونه شاهد و آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی نشان می‌دهد. نمونه شاهد (۰/۲۸۹ میلی‌گرم مالون‌آلدهید در هر کیلوگرم روغن) بالاترین مقدار عدد TBA را داشت.

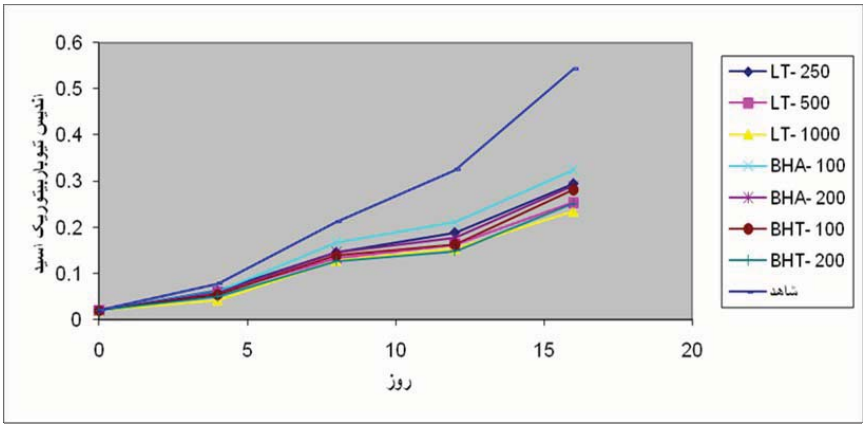
تمامی نمونه‌های مورد بررسی از نظر عدد پراکسید و تیوباربیتوریک اختلاف معنی‌داری با نمونه شاهد داشتند. بنابراین تمامی نمونه‌های حاوی آنتی اکسیدان در برابر اکسایش پایدارتر از نمونه شاهد بودند. آنتی‌اکسیدان‌ها طی مدت زمان خاصی فعال باقی مانده و با گذشت زمان به تدریج از درجه تاثیر آن‌ها کاسته می‌شود که دلیل آن می‌تواند نگه‌داشتن نمونه‌ها در شرایط اکسایش و حرارت باشد. به همین خاطر با افزایش زمان نگهداری نمونه‌های روغن در شرایط اکسایش، میزان عدد پراکسید افزایش یافت (شکل‌های ۸).

نمونه شاهد که حاوی هیچ آنتی‌اکسیدانی نبوده بیشترین مقدار عدد پراکسید را در همه روزها دارا بود. در واقع افزایش در مقدار پراکسید را می‌توان به تشکیل هیدروپراکسیدها نسبت داد. پراکسید محصول اولیه اکسایش مواد چرب است.

به طور کل هر قدر که درجه غیراشباع روغن‌ها بیشتر باشد روغن آمادگی بیشتری برای اکسایش دارد. وقتی که میزان پراکسید به حد معینی برسد تغییرات مختلفی صورت گرفته و مواد فرار آلدئیدی و کتونی ایجاد می‌شوند که در ایجاد بو و طعم نامطبوع مواد چرب مؤثر می‌باشند و باعث بالا رفتن اندیس تیوباربیتوریک می‌گردد.



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

جدول۵- مقایسه میانگین اعداد پراکسید و تیوباربیتوریک‌اسید در مجموع روزهای چهارم، هشتم، دوازدهم و شانزدهم برای هر تیمار در سه تکرار

تیمار	عدد پراکسید	عدد تیوباربیتوریک اسید
نمونه کنترل	۱۰۶/۱۳^{a}	۰/۲۸۹^{a}
غلظت ۲۵۰	۵۴/۶۰^{c}	۰/۱۶۶^{c}
غلظت ۵۰۰	۴۸/۹۹^{f}	۰/۱۴۶^{ef}
غلظت ۱۰۰۰	۴۴/۲۲^{g}	۰/۱۲۴^{g}
BHA-100	۷۳/۸۳^{b}	۰/۱۸۵^{b}
BHA-200	۵۳/۰۴^{d}	۰/۱۶۳^{cd}
BHT-100	۵۱/۶۷^{e}	۰/۱۵۳d^{e}
BHT-200	۳۹/۴۷^{h}	۰/۱۳۷^{f}

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

بنابراین در روزهای پایانی از تجزیه پراکسیدها، مالون دی-آلدهیدها تولید می‌شوند که بیانگر مراحل ثانویه اکسایش می‌باشد. آلدهیدهای فرار عامل اصلی بدطعمی روغن هستند. از آنجا که مالون-آلدهید از تجزیه هیدروپراکسیدها حاصل می‌گردد بنابراین در روزهای ابتدایی مقدار تیوباربیتوریک اسید پایین است، اما بعد از گذشت زمان که مقدار محصولات اولیه اکسایش افزایش یافته است و شروع به تجزیه شدن کردند که مقدار این اندیس نیز افزایش یافت. این شاخص نیز مانند عدد پراکسید با افزایش غلظت عصاره‌ها کاهش یافت (شکل ۹). زیرا با افزایش غلظت مقدار ترکیبات فنلی افزایش یافته که منجر به افزایش گروه‌های فعال برای مهار رادیکال آزاد می-گردد. هیچ گزارشی مبنی بر استفاده از عصاره برگ گردو یا گیاه دیگری از این خانواده بر پایداری روغن در منابع علمی یافت نشد اما تحقیقات بسیاری در زمینه پایداری روغن‌های خوراکی با کمک آنتی-اکسیدان‌های طبیعی حاصل از منابع گیاهی دیگر صورت گرفته است که نتایج مشابهی به دست آمد. Farag *et al.*, (2005) در بررسی اثر عصاره برگ زیتون در غلظت ۸۰۰ پی‌پی‌ام بر اکسیداسیون روغن آفتابگردان گزارش کردند اندیس پراکسید از ۴۳ به ۳۳ میلی اکی والان گرم در کیلوگرم روغن اندیس تیوباربیتوریک از ۲/۳ به ۰/۸ کاهش می‌یابد. در پژوهشی Mir-ahmadi *et al.*, (2006) گزارش کردند که اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ سبز چای در مهار اکسیداسیون روغن آفتابگردان در غلظت‌های ۲۰۰ و ۵۰۰ پی‌پی‌ام بهتر از BHA و BHT در غلظت‌های ۲۰۰ و ۵۰۰ پی‌پی‌ام بوده است. این اثر آنتی اکسیدانی را به وجود ترکیبات فنلی نسبت می‌دهند که در تطابق با نتایج محققان متعددی می‌باشد (Goli etal, 2005؛ Singh *et al.*, 2006). در بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره پوست سبز پسته، Goli *et al.*, (2005) گزارش کردند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره در غلظت ۶۰۰ پی‌پی‌ام قابل مقایسه با BHA و BHT در غلظت ۲۰۰ پی‌پی‌ام بوده است که این اثر آنتی‌اکسیدانی را به ترکیبات فنلی نسبت دادند. نتایج تحقیق نیز از نظر روند تغییرات اعداد پراکسید و اسید تیوباربیتوریک در طی دوره نگهداری در شرایط اکسیداسیون و تاثیر غلظت عصاره‌های افزوده به روغن مشابه نتایج محققان فوق بوده است.

نتیجه‌گیری

در ایـن پـژوهش فعالیـت آنتـی‌اکـسیدانی بـرگ گـردو واریتـه تویسرکانی مورد بررسی قرار گرفت و خصوصیات آنتی‌اکسیدانی آن به روش‌های مختلف به اثبات رسید. این ویژگی‌هـای آنتـی‌اکـسیدانی را می‌توان به ترکیبات فنلی موجود در عصاره‌ها نسبت داد. همچنین اثـر حلال، زمان و روش استخراج بر میزان ترکیبات آنتی‌اکـسیدانی مـورد مطالعه قرار گرفت. با افزایش زمان استخراج میـزان ترکیبـات فنـولی افزایش یافت. استخراج به کمک مایکروویو کاراتر از روش سنتی بود. از آن‌جا که درخت گردو بومی کشور ایران است و عصاره بـرگ گـردو به عنوان منبعی از آنتـی‌اکـسیدان‌هـای طبیعـی، توانـایی واکـنش بـا رادیکال‌هـای حاصـل از اکـسایش لیپیـدها را داشـته و موجـب قطـع واکنش‌های زنجیری می‌شود می‌توان عصاره حاصل از بـرگ گـردو را پس از آزمایشات تکمیلی به مواد غذایی افزود.

منابع

قره خانی، م.، رفیعی، ز.، قربانی، م .و جعفری، س .م.، ۱۳۸۸ . سیستم مایکروویو محفظه باز برای اسـتخراج ترکیبـات مـؤثره از گیاهـان دارویـی، ۵۹۳۲۱.

کامکار، ا. ۱۳۸۸. مطالعه فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره شوید ایرانی. فصلنامه دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی گناباد، ۱۵: ۲، ص ۱۱-۱۷.

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

Arabshahi-Delouee, S. and Urooj, A., 2007, Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. Food Chemistry, 102(4), 1233-1240.

Barreira, J. C. M., Ferreira, I. C. F. R., Oliveira, M. B. P. P., and Pereira, J. A., 2008, Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and fruit. Food Chemistry, 107(3): 1106-1113.

Besbes, S., Blecker, C., Deroanne, C., Bahloul, N., Lognay, G., Drira, N.-E., 2004, Date seed oil: Phenolic, tocopherol and sterol profiles. Journal of Food Lipids, 11, 251–265.

Bouaziz, M. and Sayadi, S., 2005, Isolation and evaluation of antioxidants from leaves of a Tunisian cultivar olive tree. European Journal of Lipid Science and Technology, 107: 497–504.

Cacace, J.E., Mazza, G., 2006, Pressurized low polarity water extraction of lignans from
whole flaxseed. J Food Eng, 77:1087-95.

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.

Chemat, S., Aït-Amar, H., Lagha, A. and Esveld, D.C., 2005, Microwave-assisted extraction kinetics of terpenes from caraway seeds. Chemical Engineering and Processing, 44(12), 1320-26.

Chirinos, R., Rogez, H., Campos, D., Pedreschi, R. and Larondelle, Y., 2007, Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz and Pavon) tubers. Separation and Purification Technology, 55, 217-225.

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, 809-816.

Contini, M., Baccelloni, S., Massantini, R. and Anelli, G., 2008, Extraction of natural antioxidants from hazelnut (*Corylus avellana* L.) shell and skin wastes by long maceration at room temperature. Food Chemistry, 110, 659–669.

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 andTechnology, 42: 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: 521-5.

Isabel, F., Almeida., Eduarda Fernandes., Jose, L. F. C., 2008, walnut (*Juglans regia*) leaf extracts are strong scavengers of pro-oxidant reactive species. Food Chemistry, 106: 1014-1020

Karpin, A., ska, M., Borowski, J. and Danowska- Oziewicz, M., 2001, Use of natural antioxidants in readyto-serve food. Food Chemistry, 72: 5-9

Kumaran, A. and Karunakaran, R.J., 2007, In vitro antioxidant ctivities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. LWT, 40: 344-352.

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.

Lujan, R. J., R. J., Rodriguez. and Castro, M. D. L., 2006, Multivariate optimisation of the microwave-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry, 385(4), 753-759.

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

Mir-Ahmadi, F., Fatemi, H., Sahari, M.A., 2006, Effect of green Tea extract on the inhibition ofsunflower oil oxidation. *IJFST*, 2 (4): 61 -70.

Olivera, I., Sousa, A., Valentao, P., Andrade, P., 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, 1018-1025.

Pan, X., Niu, G. and Liu, H., 2003, Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. Chemical Engineering and Processing, 42(2), 129-133.

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, 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.

Ramos, L., Kristenson, E.M. and Brinkman, U.A.T., 2002, Current use of pressurised liquid extraction and subcritical water extraction in environmental analysis. Journal of Chromatography A, 975, 3-29.

Rumbaoa, R.G.O., Cornago, D.F. and Geronimo, I.M., 2009, Phenolic content and antioxidant capacity of Philippine potato (*Solanum tuberosum*) tubers. Journal of Food Composition and Analysis, 22(6), 546-550.

Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J.A.and Saura-Calixto, F., 1999, Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. Food Research International, 32:407–412.

Singh, G. and Marimuthu, P.,2006, Antioxidant and biocidal activities of Carum nigrum (seed) essential oil, oleoresin, and their selected components. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 174-81.

Singh, G., Maurya, S. and Delampasona, M.P., 2007, A comparison of chemical antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. Food and Chemical Toxicology, 45, 1650-1661.

Shahsavari, N., Barzegar, M.A., Sahari, M.A. and Naghdibadi, H., 2008, Antioxidant activity and chemical characterization oil of *Bunium persicum*. Plant Foods Human Nutrition, 63, 183-88.

Shon, M.Y., Lee, J., Choi, J.H., Choi, S.Y., Nam, S.H., Seo, K.I., Lee, S.W., Sung, N.J., and Park, S.K., 2007, Antioxidant and free radical scavenging activity of methanol extract of chungkukjang. Journal of Food Composition and Analysis, 20(2): 113-118.

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.

Spigno, G., Tramelli, L. and De Faveri, D.M., 2007, Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. Journal of Food Engineering, 81(1), 200-208.

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.

Suzuki, M., Watanabe, T., Miura, A., Harashima, E., Nakagawa, Y. and Tsuji, K., 2002, An extraction solvent optimum for analyzing polyphenol contents by Folin-Denis assay. Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi, 49: 507-511

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.