

Identification of Walnut Tree Leaves Extractives Chemical Composition and the Effect of Growth Time

Mohammadreza Sabzehparvar¹, Ahmad Jahan Latibari^{2*} and Shademan Pourmousa³

1- M.Sc., Wood and Paper Science and Technology, Dept. Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

2*- Corresponding author, Professor, Wood and Paper Science and Technology, Dept. Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran, Email: latibari.aj@gmail.com

3-Associate Prof., Wood and Paper Science and Technology, Dept. Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

Received: February 2023

Revised: April 2023

Accepted: May 2023

Abstract

Background and Objectives: Plant extractives show unique properties. They impart colors and change the color of wood and generates attractive appearance. Since early days, societies have been utilizing plant extractives in industrial, medical and even as fungicides and biocides. In early times this application was based on the professional experiences, but as the sciences were advanced, then the technical and experimental identification and utilization was employed. In general, people look at walnut tree wood and fruit as its economic values. However, scientific research has proved the values of walnut tree extractives. In this study the chemical composition of walnut tree extractives and its variation in two periods of spring and summer as well as the impact of the drying on quantity and quality of the extractive components are investigated.

Methodology: Walnut tree leaves from a selected location of an old walnut tree (100 years old) in mountain region of Karaj were collected in spring and summer. One part of the samples was air dried and another portion was used at green moisture condition. Totally four samples were obtained. Ethanol-acetone extraction was according to Tappi T204-05 procedure. The extractive was analyzed using GC-MASS spectroscopy and the chemical components in the extractives were identified and tabulated.

Results: The results revealed that the dried leaves contain fewer chemical compounds compared to green samples which can be an indication that some of the compounds in green sample are volatile and vaporize upon drying. Furthermore, the extractives chemical composition and content varies between spring and summer samples. The major chemical compounds identified were 2-methylneptaline, tri-decan, tetradecan, 2,3-dimethyl naptaline and methylcyclobenzen.

Conclusion: The results indicated the seasonal variation of walnut tree extractives. These is also considerable variation in wet and dry samples which can be attributed to the presence of volatile compounds. The odor of walnut leaves is the consequence of the presence of such volatile compounds. The absence of some of the compounds in summer samples indicate the seasonal changes of the extractives.

Keywords: Extractives, GC-Mass, leaves, 2,3-dimethylnaptaline, methyl cyclobenzen, 2-methyl neptaline, tetradecan, tri-decan, walnut.

شناسایی و تأثیر زمان رویش بر ترکیب‌های شیمیایی مواد استخراجی برگ درخت گردو

محمد رضا سبزه‌پرور^۱، احمد جهان‌لثیاری^{۲*} و شادمان پورموسی^۳

۱- کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع چوب و کاغذ، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، کرج، ایران

۲- نویسنده مسئول، استاد، گروه علوم و صنایع چوب و کاغذ، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، کرج، ایران، پست الکترونیک: latibari.aj@gmail.com

۳- دانشیار، گروه علوم و صنایع چوب و کاغذ، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، کرج، ایران

تاریخ دریافت: بهمن ۱۴۰۱

تاریخ اصلاح نهایی: اردیبهشت ۱۴۰۲

تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۴۰۲

چکیده

سابقه و هدف: مواد استخراجی گیاهان ویژگی‌های منحصر به فردی دارند. ایجاد رنگ کرده و رنگ چوب را تغییر داده و رنگ‌های جذاب و متنوعی ایجاد می‌کنند. خاصیت ضد حشره داشته و نقش حفاظت‌کنندگی دارند. خاصیت دارویی داشته و در طب سنتی به عنوان دارو استفاده می‌شوند. بدین جهت انسان از روزگار گذشته همواره از عصاره‌های گیاهی و مواد استخراجی در کاربردهای صنعتی- دارویی و حتی مبارزه با آفات استفاده کرده است. در گذشته استفاده از این مواد به صورت تجربی بود ولی با پیشرفت علوم جایگاه علمی پیدا کرد. با وجودی که اغلب میوه و یا چوب درخت گردو به عنوان ارزش اقتصادی آن در نظر گرفته می‌شود، ولی بررسی‌های انجام شده بر روی ویژگی مواد استخراجی درخت گردو اثبات کرده است که این مواد به عنوان عوامل ضد مخرب چوب و گاهاً سمی طبقه‌بندی می‌شوند. در این مطالعه شناسایی ترکیب‌های شیمیایی برگ درخت گردو و تغییرات آن در دو دوره بهار و تابستان و همچنین اثر خشک شدن بر این تغییرات مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: برگ‌های یک ناحیه از درخت گردو با سن تقریبی ۱۰۰ ساله در یکی از مناطق کوهستانی شهرستان کرج در دو فصل بهار و تابستان جمع‌آوری و مواد استخراجی برگ‌های هر دوره به دو شکل تر و هوا خشک جمعاً ۴ نمونه مورد ارزیابی قرار گرفتند. عصاره‌گیری بر طبق دستورالعمل T204-05 آیین‌نامه Tappi انجام گرفت. شناسایی ترکیب‌های شیمیایی موجود در عصاره برگ‌ها و تغییرات آن با استفاده از طیف‌سنجی کروماتوگرافی گازی- طیف‌سنجی جرمی (GC-MS) انجام شد.

نتایج: نتایج نشان دادند که در برگ خشک نمونه بهار ترکیب‌های زیاده‌تری در مقایسه با نمونه تر همان برگ وجود دارد که مؤید فرار بودن ترکیب‌های موجود در برگ تر بهار است. همچنین تفاوت محسوسی بین ترکیب‌های موجود در برگ بهار و تابستان مشاهده شده است. ترکیب‌های اصلی شامل: ۲- متیل نپتالین، تری دکان و تترا دکان و ۳-۲- دی متیل نپتالین و اتیل سیکلو بنزن در برگ تابستانی شناسایی شده‌اند. نپتالین-۲-متیل و ۲،۱- بنزینیدی کربوکسیلیک اسید، دی آزو اوکتیل استر در نمونه‌های خشک و تر بهاره مشاهده شده است. با وجودی که نپتالین ۳،۲ دی متیل در برگ خشک تابستانه و دکان در برگ تر تابستانه وجود دارد، ولی تری دکان، دو دکان، تری دکان و تترا دکان در هر دو نمونه خشک و تر تابستانه مشاهده شده است و اتیل سیکلو هگزان در برگ تر تابستانه شناسایی شده است.

نتیجه‌گیری: نتایج به دست آمده نه تنها مؤید تغییرات فصلی مواد استخراجی برگ درخت گردو می‌باشد، بلکه تغییراتی بین نمونه خشک و تر بهاره ظاهر شده است که نشان‌دهنده فرار بودن بعضی از این ترکیب‌ها می‌باشد. این یافته بیانگر وجود بوی مشخصی از برگ‌های درخت گردو در فصل بهار است. ولی تغییرات قابل توجهی بین نمونه خشک و تر تابستانه مشاهده نمی‌گردد. احتمالاً مواد فرار در طی فصل بهار از برگ درخت گردو جدا شده است. ولی عدم وجود بعضی از ترکیب‌های موجود در برگ خشک و تر تابستانه می‌تواند نشان‌دهنده تغییر فصلی ترکیب‌های تشکیل‌دهنده مواد استخراجی برگ درخت گردو باشد.

واژه‌های کلیدی: اتیل سیکلو بنزن، برگ درخت گردو، تترا دکان، تری دکان، مواد استخراجی، ۲-۳-۲- دی متیل نپتالین، ۲- متیل نپتالین،

مقدمه

در فرایند زیستی رشد و نمو رستنی‌ها، عوامل متعدد طبیعی مانند نور آفتاب، آب و مواد مغذی خاک دخالت دارند. هر گیاهی در این شرایط زیستی طبیعی و حتی متأثر از تغییر شرایط طبیعی توسط انسان، انواع مواد شیمیایی تولید می‌کند و در این فرایند زیستی، طیف وسیعی از مواد حد وسط تشکیل می‌شود. این مواد حد وسط، نهایتاً به مواد اصلی گیاهی مانند مواد ساختاری نظیر سلولز، همی‌سلولزها، لیگنین و مواد غذایی تبدیل شده و بخشی به مواد ذخیره‌ای مانند نشاسته و بخشی نیز به میوه‌ها تبدیل می‌شوند. در این فرایند، مقدار کمی از مواد حد وسط در بخش‌های مختلف گیاه (ساقه، برگ و میوه) رسوب می‌کنند که مواد استخراجی نام دارند. طبق تعریف، مواد استخراجی موادی هستند که بدون تخریب ساختار اصلی دیواره سلول قابل جداسازی و استخراج می‌باشند.

مواد استخراجی ویژگی‌های منحصر به فردی دارند. ایجاد رنگ کرده و برای رنگرزی استفاده می‌شوند و یا اینکه رنگ چوب را تغییر داده و رنگ‌های جذاب و متنوعی ایجاد می‌کنند. خاصیت ضد حشره داشته و نقش حفاظت‌کنندگی دارند. خاصیت دارویی داشته و در طب سنتی به‌عنوان دارو استفاده می‌شوند. حتی مواد استخراجی بعضی از درختان مانند گردو در خاک اطراف ساقه درخت نیز تأثیرگذار هستند و باعث کم شدن حاصلخیزی خاک می‌گردند. ایجاد بو و احساس متفاوت در ساقه، برگ و میوه گیاهان نیز ناشی از مواد استخراجی است. انسان از گذشته‌های دور و به‌طور سنتی از ویژگی‌های مختلف مواد استخراجی بهره‌جسته است و از آنها در راه بهبود زندگی خود از طریق دارویی، آفت‌کشی و ... استفاده کرده است.

یکی از درختانی که از تمام اجزاء آن بهره‌برداری شده و در راستای بهبود کیفیت زندگی انسان از آن استفاده شده است، درخت گردو می‌باشد. میوه آن ارزش غذایی فوق‌العاده‌ای

دارد. چوب درخت گردو دارای رنگ و ویژگی‌های مقاومتی باارزشی است و در ساخت محصولات چوبی گران‌قیمت استفاده می‌شود و علاقه‌مندان به آن زیاد هستند. به‌علاوه، مقاومت چوب گردو در مقابل عوامل مخرب چوب عالی است.

فواید زیادی برای مواد استخراجی چوب، پوست و میوه درخت گردو بیان شده است. بررسی‌ها نشان داده‌اند که مواد استخراجی چوب بین دو بخش مغز گردو خاصیت ضد سرطانی و ضد دیابتی دارند و این نکته در مورد آزمایش‌های انجام شده بر روی موش به اثبات رسیده است. با وجودی آنکه بیشتر میوه و یا چوب درخت گردو به‌عنوان ارزش اقتصادی آن در نظر گرفته می‌شود، ولی بررسی‌های انجام شده بر روی ویژگی مواد استخراجی چوب و پوست درخت گردو اثبات کرده است که این مواد به‌عنوان عوامل ضد مخرب چوب و گاهی سمی طبقه‌بندی می‌شوند. از این رو، با توجه به این نکته لازم است مواد استخراجی چوب و پوست درخت گردو و برگ‌های این درخت مورد بررسی و ارزیابی بیشتری قرار گرفته و به خواص آن پی برده شود. واضح است که مواد استخراجی درخت گردو پس از شناسایی می‌توانند جایگاه ویژه‌ای در طب سنتی، داروهای گیاهی و مواد حفاظت‌کننده و به‌ویژه از بین بردن عوامل مخرب چوب داشته باشند.

جوگلان (Juglone) با فرمول ۵- هیدروکسی-۱،۴- نپتوکوانون به‌عنوان یک ماده شیمیایی درخت گردو، ترکیبی آلی است که به‌طور طبیعی در برگ، ریشه، پوسته میوه و پوست درختان خانواده گردو، به‌ویژه در گردوی سیاه (گردوی معمولی، *Juglans regia* L.) تشکیل می‌شود. بیشترین مقدار این ماده در پوست سبز گردو وجود دارد. جالب توجه اینکه، این ماده بر رشد گیاهان دیگر تأثیر می‌گذارد. برای نمونه، ذرت و سویا به این ماده حساس هستند و این ماده کاهنده رشد توت‌فرنگی است. به‌علاوه، برگ درخت گردو جوانه‌زنی و رشد بوته بعضی از گیاهان مانند هندوانه، گوجه‌فرنگی و ...

را کم می‌کند.

Forino و همکاران (۲۰۱۶) زیست‌سنجی اجزای آنتی‌هایپرگلیکامیک (ضد افزایش قند خون) برگ‌های درخت گردو را مورد تحقیق و بررسی قرار دادند. در آزمایش‌ها مشخص شد که برگ‌های درخت گردو قابلیت کاهش قند خون در انسان را دارد؛ اما مطالعات نهایی با هدف شناسایی مولکول مسئول برای فعالیت ضد دیابتی برگ‌های درخت گردو هنوز انجام نشده است. در این تحقیق درباره جداسازی زیستی مواد استخراجی برگ‌های درخت گردو که به جداسازی و تعیین دو ترکیب متعلق به دسته اصلی مولکول‌های ضد دیابت این مواد استخراجی براساس NMR منجر می‌شود، تحقیقات و آزمایش‌هایی انجام شد. در ارزیابی دقیق‌تر، ظرفیت آنها برای تأثیر در جذب گلوکز در HepG2 و CaCo2 در پوشش سلولی نیز انجام شد. نتایج امکان استفاده منطقی از نوشیدنی‌های بر پایه برگ درخت گردو را در درمان دیابت نشان می‌دهد.

Jabli و همکاران (۲۰۱۷) ارزیابی ویژگی‌های شیمیایی عصاره متانولی برگ و ساقه درخت گردو تونسی را انجام دادند. پس از آن، کل مقدار ترکیب‌های فنولیک، کل مقدار فلاونوئید و غلظت مورد نیاز برای جداسازی ۵۰ درصد از ترکیب ۱ و ۱- دی نیل - ۱- پیکریل هیدرازیل تعیین گردید. قابلیت غیرفعال کردن گونه‌های واکنش‌پذیر از طریق آزمایش فعالیت رادیکالی ۱ و ۱- دی فنیل - ۱- پیکریل هیدرازیل اندازه‌گیری شد. در این بررسی بالاترین مقدار کل ترکیبات فنولی اجزای برگ به دست آمد، در حالی که بیشترین مقدار IC50 با استفاده از مواد استخراجی بخش ساقه به دست آمده بود. ترکیبات اصلی بخش ساقه با استفاده از کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی آنالیز گردید و فعالیت‌های ضد باکتریایی آنها در مقابل تهدیدات پاتوژنیک گزارش شد.

Vaysi و Habib Porian (۲۰۲۲) ترکیب‌های آلی موجود در چوب و پوست ممرز و انجیلی را با استفاده از فنون کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی انجام داده‌اند. در

چوب و پوست ممرز به ترتیب ۶۶ و ۱۸ ترکیب قابل شناسایی است که اکتامتیل سیکلوآکسان و بیس (اتیل هگزیل) فتالات به‌عنوان مهمترین ترکیب‌های مشترک بین چوب و پوست ممرز هستند. در چوب و پوست انجیلی به ترتیب ۱۹ و ۲۵ ترکیب قابل شناسایی است که دکان دودکان تترادکان ۱ و ۲- بنزن کربوکسیلیک اسید و بیس (اتیل هگزیل) فتالات به‌عنوان مهمترین ترکیب‌های مشترک بین چوب و پوست انجیلی هستند.

Gradt و همکاران (۲۰۱۷) ترکیب شیمیایی برگ‌ها، شاخه‌ها و پوست چند گونه سنجد تلخ (Sea buckthorn) را بررسی و مطالعه کردند. طبق نظر این محققان برگ‌ها، شاخه‌ها و به‌ویژه پوست سنجد تلخ ترکیب شیمیایی شبیه میوه آن دارند. به این منظور تجزیه کاملی بر روی نمونه‌های مربوط به روسیه (هفت گونه) و آلمان (چهار گونه) انجام شد. اجزای بسیار کمیاب مانند مقدار فنول کل، فلزات، ویتامین‌های محلول در آب و چربی نیز مطالعه شدند. نتایج تجزیه و تحلیل آنها برخی جنبه‌های جالب را درباره تفاوت بین پایه‌های نر و ماده نشان داد. به‌علاوه، آنها تفاوت‌هایی بین وارنیه‌های روسی و آلمانی سنجد تلخ مشاهده کردند. بررسی ترکیبات نشان داد که ویتامین‌ها به مقدار خیلی اندک (کمتر از ۰/۱ درصد) وجود دارند.

Solar و همکاران (۲۰۰۵) تغییرات فصلی فلاونوئیدها، اسیدهای فنولیک و کینون‌ها را در شاخه‌های جوان یک‌ساله گردوی معمولی (*Juglans regia L.*) مورد تحقیق و بررسی قرار دادند. غلظت فنول‌ها به‌طور قابل ملاحظه‌ای تحت تأثیر نوع گونه، تاریخ نمونه‌برداری و برهم‌کنش زمان نمونه‌برداری بود. کاتکین و میریستین که متعلق به گروه فلاونوئیدها هستند از چرخه رشد بهاره در ماه می تا تراز تابستانی رشد در آگوست افزایش داشتند. نتایج تحقیقات آنان نشان داد که اسیدهای فنولیک (وانیلیک، سیرینزیک، الاژیک و کلوروژنیک) منحنی فصلی معکوسی در مقایسه با فلاونوئیدها دارند. تغییرات فصلی در ترکیبات فنولیک تأثیر بیشتری روی

و دو ترکیب تقریباً فنولیک (مشتقات کوئرستین ۳- پنتوسید و کامپفرول ۳- پنتوسید) شناسایی شدند. تعیین کمی ترکیبات فنولیک با استفاده از HPLC-DAD انجام شد، این روش نشان داد که کوئرستین ۳- گالاکتوسید جزء ترکیب‌های اصلی است، در حالی که ۴-p- کوماریول کوئینیک اسید دارای کمترین مقدار بود. بالاترین مقدار ترکیبات فنولیک در ماه می و جولای مشاهده شدند.

Santos و همکاران (۲۰۱۳) عملکردهای متفاوت برگ‌ها و جوشانده *Juglans regia L.* را براساس ترکیبات فعال زیستی و آنتی‌اکسیدان آزمایشگاهی و اثرهای ضد تومور مطالعه کردند. برگ‌های *Juglans regia L.* به‌عنوان منبعی از مولکول‌های فعال زیستی مانند ترکیبات آنتی‌اکسیدان فنولی گزارش شده‌اند. در این تحقیق اسیدهای ارگانیک، مونو و اولیگوساکاریدها و توکوفرول‌ها در برگ‌ها و عصاره آنها آنالیز شدند. به‌علاوه، ترکیب فنولیک و فعالیت زیستی برگ‌های درخت گردو در جوشانده آن و در عصاره‌گیری متانولی تعیین گردیدند. مالیک اسید، سوکروز، توکوفرول و ۳-۵- کافئول کوئینیک اسید و کوئرستین ۳- پنتوسید به ترتیب فراوان‌ترین اسید آلی، دی ساکارید، ایزومر توکوفرول و ترکیبات فنولیک بودند. استخراج متانول ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و ضد توموری بالاتری را نسبت به جوشانده داشت و هر دو نمونه سمیتی برای سلول‌های اولیه تومور کبد نشان ندادند.

Oliveira و همکاران (۲۰۰۸) مقدار کل فنول‌ها، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت ضد میکروبی پوسته‌های سبز گردو (*Juglans regia L.*) را مورد تحقیق و بررسی قرار دادند. آنان مقدار مواد فنولی و فعالیت ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی پوسته سبز گردو را از طریق آزمایش سنجش رنگ و مقدار آنها و اثرهای حذف بر DPPH (1,1 دی فنیل ۱- پیکریل هیدرازیل) رادیکالی و سیستم مدل بی- کروتین ارزیابی کردند. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در همه مواد استخراجی آزمایش شده کمتر از ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. این محققان شروع به غربالگری

حساسیت‌پذیری ریشه‌ها برای عدم رشد باکتریایی در مقایسه با غلظت مواد فنولیک داشت. هیچ‌یک از دو فلاونوئید بررسی شده روی آلودگی باکتریایی ریشه‌ها تأثیری نداشتند.

Slatnar و همکاران (۲۰۱۵) در تحقیقی کیفیت ترکیبات فنولیک در مغز دانه، روغن و تفاله درخت گردوی معمولی (*Juglans regia L.*) را مطالعه کردند. در این بررسی مقدار کل مواد فنولیک و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در مغز دانه، روغن و تفاله (باقی‌مانده پرس روغن) کشت‌های مختلف گردو ارزیابی شدند. بیست و هفت ترکیب فنولیک در مغز دانه و تفاله با استفاده از فن طیف‌سنجی جرمی- کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا شناسایی شدند. عمده ترکیب پلی فنولیک شامل تانن‌های قابل هیدرولیز بود که تقریباً ۶۰/۸۰ درصد (در مغز دانه) و ۶۱/۶۶ درصد (در پسماند) از کل ترکیبات فنولیک شناسایی شده بود. روغن گردو از نظر ترکیبات پلی فنولیک ضعیف بود و تنها شش ترکیب مختلف از آن به دست آمد اما به دلیل مقدار کم آنها (از ۰/۱۵ تا ۱/۴۴ میکروگرم در گرم) تنها دو ترکیب شناسایی شد. مقایسه مقدار میانگین کل ترکیبات فنولیک نشان داد که ترکیبات فنولیک موجود در روغن گردو (۰/۰۵ میلی‌گرم) ۱۵۴ واحد کمتر از مغز دانه (۷/۷ میلی‌گرم) یا تفاله (۷/۹ میلی‌گرم) هستند.

Amaral و همکاران (۲۰۰۴) پروفیل فنولی را در کنترل کیفیت گردو (*Juglans regia L.*) بررسی و تجزیه و تحلیل کردند. کمیت و کیفیت ترکیبات فنولی بر روی نمونه‌های برگ شش گونه مختلف گردو با شرایط اقلیمی، کشاورزی و جغرافیایی مشابه تعیین شدند. تغییر مقدار ترکیبات فنولیک اصلی از ماه می تا سپتامبر کنترل شد. در این بررسی، دو روش استخراجی آزمایش گردید و بهترین نتایج با استفاده از آب اسیدی شده و مرحله تصفیه ستون استخراج فاز جامد به دست آمد. در همه نمونه‌ها هفت ترکیب فنولیک (اسیدهای ۳- کافئیل کوئینیک، ۳-p- کوماریول کوئینیک و ۴-p- کوماریل کوئینیک، کوئرستین ۳- گالاکتوز کوئرستین، ۳- ارایبنوسید، کوئرستین ۳- زایلوسید، کوئرستین ۳- رامنوسید)

سمی ترین ترکیبات ژوگلون (۵/۱۵ درصد) و ۲، ۷-دی متیل فناترن (۵/۸۱ درصد) بوده است.

Sharafetichaleshtre و همکاران (۲۰۱۰) اثر ضد میکروبی عصاره اتانولی برگ درخت گردو را بر روی پروپیونی باکتریوم آکنه مطالعه کردند. جوش جوان یکی از مشکلات پزشکی است و پروپیونی باکتریوم آکنه به عنوان عامل اصلی در این بیماری مورد توجه می باشد. برگ گردو اثر آنتی اکسیدانی داشته، بنابراین اگر دارای اثر ضد باکتریایی بر روی پروپیونی باکتریوم آکنه نیز باشد، می تواند به عنوان یک داروی جایگزین برای درمان این بیماری مطرح گردد. عصاره اتانولی برگ درخت گردو در هر دو روش آگار دیفیوژن و ماکرودایلوژن بر روی باکتری پروپیونی باکتریوم آکنه دارای اثر مهارکننده بود. بیشترین هاله عدم رشد در غلظت ۱۵۰ میلی گرم در میلی لیتر برابر $1/7 \pm 25$ میلی متر، مقدار MIC برابر ۱۲/۵ میلی گرم در میلی لیتر و مقدار MBC برابر ۱۵ میلی گرم در میلی لیتر بود. نتایج نشان داد که عصاره اتانولی برگ درخت گردو دارای اثر ضد میکروبی بر روی پروپیونی باکتریوم آکنه بوده و می تواند به عنوان فراورده آنتی باکتریال در درمان عفونت های خارجی حاصل از این میکروارگانیسم مطرح شود.

Rezaei Arami (۲۰۱۱) استخراج ترکیبات فنولی از برگ و پوسته سبز دو واریته گردو (شهمیرزادی و توپسرکانی) با امواج مایکروویو را مورد مطالعه و تحقیق قرار داد و ویژگی های آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی ترکیبات حاصل را بررسی کرد. در این مطالعه از دو روش استخراج (غرقابی و مایکروویو) و ۴ حلال (متانول ۸۰٪، اتانول ۵۰٪، آب داغ و آب با دمای محیط) در روش سنتی و ۳ حلال (متانول ۸۰٪، اتانول ۵۰٪ و آب داغ) در روش استخراج با کمک امواج مایکروویو در زمان های مختلف استفاده شد. نتایج نشان دادند که در هر دو روش استخراج و با همه حلال ها برگ رقم شهمیرزادی و پوسته رقم توپسرکانی به ترتیب بیشترین و کمترین مقدار ترکیبات فنولی را دارند؛ اما در روش استخراج

ظرفیت ضد میکروبی در مقابل باکتری های گرم مثبت و گرم منفی و قارچ کردند و دریافتند که همه مواد استخراجی از رشد باکتری گرم مثبت ممانعت کردند. نتایج تحقیقات آنان نشان داد که پوسته سبز گردو ظرفیت فعالیت ضد میکروبی دارد.

Izadiyan و همکاران (۲۰۱۸) سمیت نانو ذرات اکسید آهن سنتزی در گیاهان را با استفاده از مواد استخراجی پوست سبز گردو *Juglans regia* مورد بررسی قرار دادند. آنان برای بررسی توانایی مواد استخراجی پوست سبز درخت گردو در کنترل اندازه ذرات نانو اکسید آهن، از روش هم رسوبی با مواد استخراجی گردو و بدون آن استفاده کردند. نتایج نشان داد که نانو ذرات سنتز شده اکسید آهن / مواد استخراجی گردو از اندازه کوچک تری نسبت به نانو ذرات ساخته شده از طریق روش هم رسوبی برخوردارند. به علاوه، ماده استخراجی پوست سبز نقش اصلی را در کنترل اندازه ذرات ایفا می کند. نتایج به دست آمده از پراش اشعه X میکروسکوپ الکترونی انتقالی با وضوح بالا، میکروسکوپ روبشی الکترونی و پراش اشعه ایکس با یکدیگر تطابق خوبی داشتند و خلوص بالای نانو ذرات تولید شده با استفاده از مواد استخراجی گردو را تأیید می کنند.

Hosseini Hashami و Jahan Latibari (۲۰۱۱) شناسایی ترکیبات شیمیایی موجود در مواد استخراجی محلول در اتانول-تولون چوب درون گردو شمال ایران را به روش کروماتوگرافی گازی-طیف سنجی جرمی بررسی و بیان کردند که میانگین مقدار مواد استخراجی چوب درون گردو حدود ۱۰ درصد بوده و سیزده ترکیب با درصدهای متفاوتی مورد شناسایی قرار می گیرند. فراوان ترین ترکیب موجود در چوب درون گردو بنزوئیک اسید ۳-۴-۵ تریس (تری متیل سایلوکسی) (گالیک اسید) به میزان ۴۴/۵۷ درصد تعیین شده است. مهمترین اسیدهای شناسایی شده دیگر در چوب درون گردو این گونه، شامل پروپاتیویک اسید ۲- (تری متیل سایلوکسی) تری متیل (۱/۰۷ درصد) بنزوئیک اسید ۳، ۴- بیس (تری متیل سایلوکسی)، (۲/۰۶ درصد) است و

فصل بهار، ۲- خشک فصل بهار، ۳- تر فصل تابستان، ۴- خشک فصل تابستان انتخاب شدند.

برگ‌های تر پس از جمع‌آوری توسط خردکن خانگی به ذرات خیلی ریز تبدیل شده و پس از بسته‌بندی در کیسه پلاستیکی، در یخچال نگهداری شدند. عصاره‌گیری از این ذرات به همان صورت تر انجام شد.

برگ‌های نمونه خشک؛ در هوای اتاق (دمای معمولی) و در معرض دمش هوای پنکه قرار داده شد و تا رطوبت تعادل محیط خشک شدند. پس‌از آن، نمونه‌های خشک توسط آسیاب wiley به پودر تبدیل و بعد پودر عبور کرده از غربال ۴۰ مش و باقی‌مانده بر روی غربال ۶۰ مش جمع‌آوری و عصاره‌گیری از آنها انجام شد.

۲- عصاره‌گیری از نمونه‌ها

عصاره‌گیری از چهار نمونه برگ درختان گردوی تهیه شده، طبق دستورالعمل ASTM D1107 مشابه دستورالعمل T204-05 آیین‌نامه Tappi (2020) به شرح ذیل انجام شده است.

ابتدا در حدود ۲ گرم پودر کاملاً خشک از نمونه خشک و یا ذرات نمونه تر با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم توزین و به داخل کارتوش سوکسله ۵۰۰ میلی‌لیتری انتقال داده شد. پس‌از آن، محلول استخراج شامل ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول و ۱۰۰ میلی‌لیتر تولوئن به آن افزوده شده و میرد سوکسله روی آن قرار داده شد. دمای اجاق به طریقی تنظیم گردید که هر ۱۰ دقیقه یکبار سیفون شدن انجام شود. پس از شروع ریزش اولین قطره، زمان عصاره‌گیری به مدت ۸ ساعت ادامه یافت و در پایان این زمان، محتویات بالن جمع‌آوری و برای انجام مراحل بعد استفاده شد.

در مرحله بعد، برای جداسازی حلال، ابتدا عصاره به داخل بالن به دستگاه تبخیرکننده چرخشی (Rotovapour) انتقال داده شده و این بالن داخل محفظه آب گرم قرار گرفت. در حالی که بالن در حال چرخش بود، دمای نقطه آب افزایش

با امواج مایکروویو عصاره متانولی برگ شه‌میرزادی و عصاره آبی پوسته توپسرکانی به ترتیب حاوی بیشترین و کمترین مقدار ترکیبات فنولی بودند ($p < 0.05$) که بیانگر کارایی بهتر استخراج به کمک امواج مایکروویو است. نتایج نشان دادند که غلظت ۱۰۰۰ppm عصاره برگ شه‌میرزادی بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را داشته و مؤثرتر از تمام آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی، فرایند اکسیداسیون را به تأخیر انداخته است. همچنین همه تیمارها در غلظت‌های مختلف به طور معنی‌داری مؤثرتر از نمونه شاهد عمل کردند. در نهایت کمترین غلظت کشندگی بر باسیلوس سرئوس مربوط به عصاره متانولی برگ شه‌میرزادی، کمترین غلظت کشندگی مربوط به عصاره متانولی برگ شه‌میرزادی و توپسرکانی و عصاره اتانولی برگ شه‌میرزادی و کمترین غلظت کشندگی بر روی اشرشیاکلی مربوط به عصاره متانولی برگ شه‌میرزادی و توپسرکانی و پوسته شه‌میرزادی و عصاره اتانولی برگ شه‌میرزادی بوده است. با توجه به مطالب بیان شده می‌توان برگ و پوسته سبز گردو را به‌عنوان منبع بالقوه‌ای از ترکیبات فنولی و آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی معرفی کرد.

مواد و روش‌ها

۱- نمونه‌برداری

نمونه‌های مورد استفاده به‌طور تصادفی از یک درخت گردوی منطقه مرکزی کرج، استان البرز تهیه شده‌اند. بدین منظور یک درخت قدیمی (طبق نظر اهالی حدود ۱۰۰ ساله) انتخاب و در دو دوره زمانی اردیبهشت و تیرماه نمونه‌برداری از برگ‌های یک ناحیه آن انجام شد. برگ‌های هر دوره از درخت برداشت شده و بخشی به‌صورت تر در زمان برداشت و بخش دیگر هوا خشک شده و بعد آزمون شدند.

با توجه به اینکه شناسایی مواد استخراجی برگ مورد نظر بود، ابتدا دمبرگ‌ها جدا شده و بخش اصلی برگ مورد استفاده قرار گرفت. برای هر آزمون حدود یک کیلوگرم برگ تر جمع‌آوری شده است. بدین ترتیب جمعاً چهار نمونه ۱- تر

حجم نمونه: یک میکرولیتر

داده شده و تبخیرکننده نیز به پمپ خلأ متصل گردید.

جداسازی حلال تا نقطه‌ای که محلول غلیظی در بالن در حال چرخش باقی مانده باشد ادامه یافته و پس از آن، چرخش متوقف شده و محتویات بالن در حال چرخش به ظرف نمونه انتقال داده شد. پس از آن، فضای بالای نمونه با گاز ازت پر شده و نمونه تا زمان طیف‌سنجی در یخچال نگهداری گردید.

۳- کروماتوگرافی گازی - طیف‌سنجی جرمی (GC-MS)

برای طیف‌سنجی و تشخیص ترکیب‌های موجود در عصاره برگ گردو، چهار نمونه و حلال‌ها به‌طور جداگانه توسط کروماتوگرافی گازی طیف‌سنجی جرمی ساخت شرکت Agilent کشور بلژیک آنالیز شدند. مشخصات دستگاه و تجهیزات مورد استفاده به شرح ذیل است.

نوع ستون: HP5 به طول ۳۰ سانتی‌متر

برنامه دمایی: ۵۰ تا ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد

سرعت افزایش دما: ۸ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه

زمان: ۵ دقیقه

سرعت جریان: یک میلی‌لیتر در دقیقه تا حداکثر ۳

میلی‌لیتر (یک میلی‌متر در دقیقه)

Run time: ۴۰ دقیقه

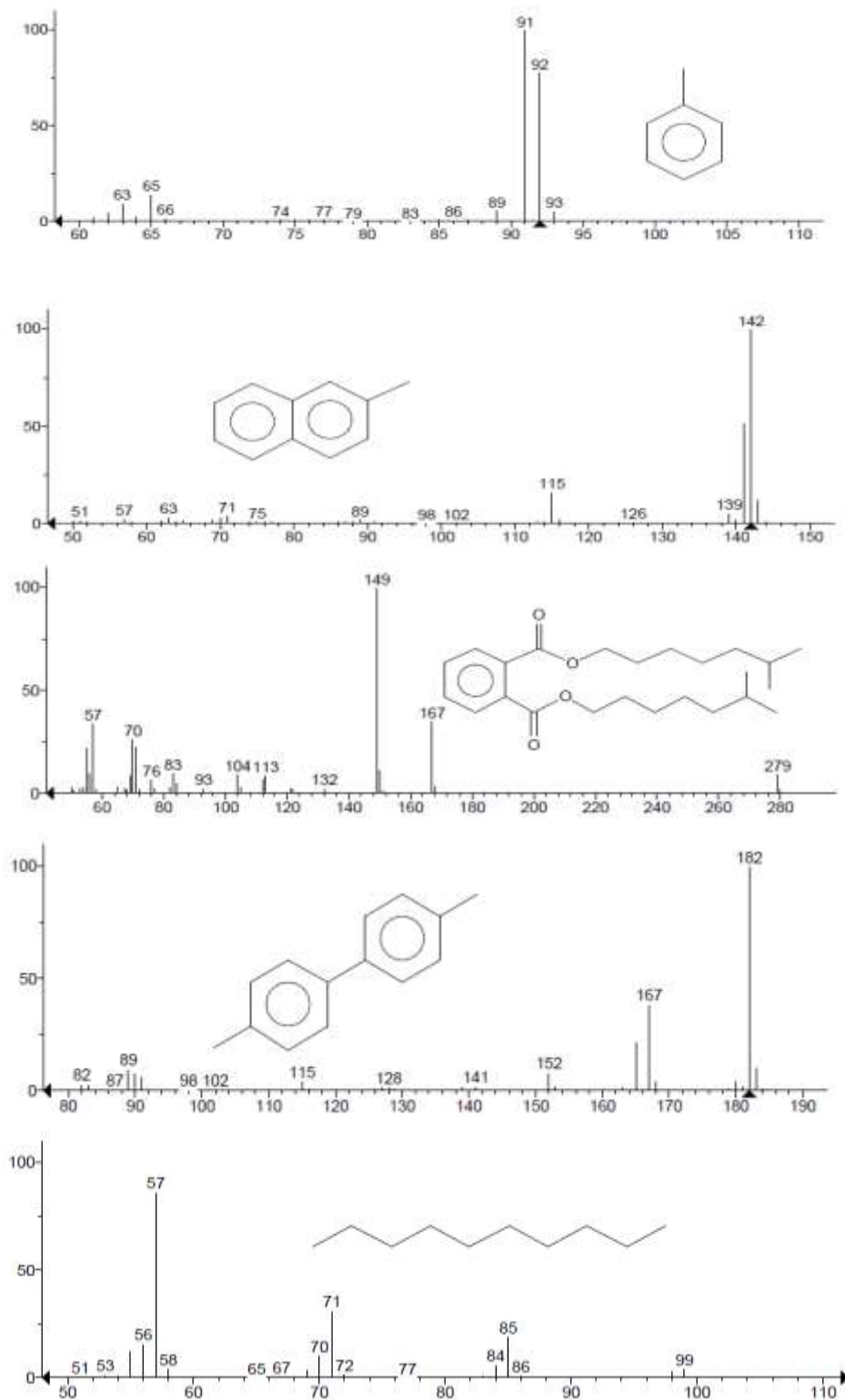
روش تزریق: splitless

نتایج

نتایج شناسایی و تعیین مقدار ترکیب‌های موجود در عصاره برگ درخت گردو در دو فصل بهار و تابستان و زمان خروج از GC-MS در جدول ۱ آورده شده است. در شکل ۱ نمونه‌هایی از طیف‌های GC-MS عصاره برگ درخت گردو نشان داده شده است.

بحث

مقادیر ارائه شده در جدول ۱ به‌صورت درصد آن مواد در عصاره می‌باشد. با توجه به اینکه برای اجتناب از تغییر احتمالی این ترکیب‌ها در اثر حرارت، نمونه به‌صورت کامل خشک نشده، بلکه به‌صورت هوا خشک عصاره‌گیری شد. مقادیر اجزاء موجود در حلال (اتانول و تولوئن) در جدول ۱ نشان داده شده است؛ بنابراین به‌منظور مقایسه نتایج و لحاظ کردن حضور حلال در نمونه‌ها، طیف GC-MS حلال نیز انجام شد و نتایج آن در ردیف‌های ۲۲ تا ۳۰ جدول ۱ آورده شده است. ترکیب‌ها و مقادیر نشان داده شده در ردیف‌های ۱ تا ۲۱ جدول ۱ حاصل از طیف‌سنجی چهار نمونه برگ درخت گردو می‌باشد.



شکل ۱- نمونه‌هایی از طیف‌های GC-MS عصاره برگ درخت گردو

Fig. 1. Samples of GC-MS spectra of walnut tree leaves extract

جدول ۱- مقایسه مقدار ترکیب‌های موجود در عصاره اتانول - تولوئن برگ گردو

Table 1. Comparison of the amount of different components in ethanol-toluene extract of walnut tree leaves

Item	Component	Spring leaves (%)		Summer Leaves (%)		Ethanol (%)	Toluene (%)
		Dry	Wet	Dry	Wet		
1	Toluene	99.927	99.983	98.788	99.018	0.007	99.648
2	Ethylbenzene	0.003	0.002	0.012	0.034		0.022
3	o-Xylene	0.004	-				
4	Undecane	0.003	-	0.079	0.014		0.014
5	Benzene, 1,2,3,5-tetramethyl-	0.004	-	-	0.054		
6	Nonane, 3-methyl-	0.001	-				
7	Benzene, pentamethyl-	0.000	-				
8	Naphthalene, 2-methyl-	0.002	0.001	0.080	-		
9	Naphthalene, 1-ethyl-	0.001	-				
10	1,1'-Biphenyl, 3-methyl-	0.002	-				
11	1,2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl ester	0.004	0.005				
12	4,4'-Dimethylbiphenyl	0.047	-				
13	Decane	-	0.002	-	0.018		0.004
14	Naphthalene, 1,2-dimethyl-	-	0.001				
15	2,2'-Dimethylbiphenyl	-	0.003				
16	p-Xylene			0.650	0.723		0.137
17	Dodecane			0.047	0.045		0.008
18	Tridecane			0.116	0.075		
19	Tetradecane			0.045	0.014		
20	Naphthalene, 2,3-dimethyl-			0.184	-		
21	Cyclohexane, ethyl-			-	0.004		
22	Ethanol					99.993	
23	Benzene, 1,3-dimethyl-						0.038
24	Benzene, 1-ethyl-3-methyl-						0.017
25	Benzene, 1,2,4-trimethyl-						0.009
26	Benzene, 1,2,4,5-tetramethyl-						0.007
27	Benzene, (1-butylpentyl)-						0.013
28	Naphthalene, 2,6-dimethyl-						0.036
29	Naphthalene, 2,7-dimethyl-						0.021
30	Naphthalene, 1-methyl-						0.025

*: Rows 22 to 30 are the results of ethanol and toluene spectroscopy.

ولی تغییرات قابل توجهی بین نمونه خشک و تر تابستانه مشاهده نمی‌گردد. احتمالاً مواد فرار در طی فصل بهار از برگ درخت گردو جدا شده است. ولی عدم وجود بعضی از ترکیب‌های موجود در برگ خشک و تر تابستانه می‌تواند نشان‌دهنده تغییر فصلی ترکیب‌های تشکیل دهنده مواد استخراجی برگ درخت گردو باشد.

منابع مورد استفاده

- Amaral, J.S., Seabra, R.M., Andrade, P.B., Valentao, P., Pereira, J.A. and Ferreres, F., 2004. Phenolic profile in the quality control of walnut (*Juglans regia* L.) leaves. *Journal of Food Chemistry*, 88:373-379.
- Forino, M., Stiuso, P., Lama, S., Ciminiello, P., Tenore, G.C., Noellino, E. and Tagliatalata-Scafati, O. 2016. Bioassay- Guided identification of the antihyperglycaemic constituents of walnut. *Journal of Functional Foods*. 26; 731-738.
- Gradt, I., Kuhn, S., Morsel, J.T. and Zvaigzne, G., 2017. Chemical composition of sea buckthorn leaves, branches and bark. *Proceeding of the Latvian academy of sciences. Section B*, 71:211-216.
- Hosseini Hashemi, S. Kh. and Jahan Latibari, A., 2011. Evaluation and identification of walnut heartwood extractives for protection of poplar wood. *Bio Resources*. 6(1); 59-69.
- Izadiyan, Z., Shameli, K., Miyake, M., Hara, H., Eva Binti Mohamad, S., Kalantari, K., Husnaa Mohd Tiab, S. and Rasouli, E. 2020. Cytotoxicity assay of plant-mediated synthesized iron oxide nanoparticles using *Juglans regia* green husk extract. *Arabian Journal of Chemistry*. 13(1); 2011-2023.
- Jabli, M., Sebeia, N., Baulares, M. and Faidi, K., 2017. Antibacterial potential, gas chromatography-mass spectroscopy and a full investigation of their dyeing properties. *Journal of Industrial Crops and products*. 108; 690-699.
- Oliveira, I., Sousa, A., Ferreira, I., Bento, A., Estevinho, L. and Pereira, J.A., 2008. Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. *Food and chemical Toxicology*. 46; 2326-2331.
- Rezaei Arami, S., 2011. Phenolic compounds extraction of two walnut varieties leaves and green bark using micro waves and investigation the antioxidant and anti-microbial activities of the compounds. *Food Industries Research*, Vol. 22, no.1:41-50.
- Santos, A., Barros, L., Calheta, R.C. and Duenas, M., 2013. Leaves and decoction of *Juglans regia* L.:

همان‌طوری که در جدول ۱ مشخص است تولوئن نزدیک به ۹۹٪ نمونه را تشکیل داده و بقیه مواد که در حدود ۲۱ ترکیب می‌باشند فقط یک درصد هستند. البته، احتمال اینکه بعضی از مواد به‌ویژه از گروه زایلن در تولوئن وجود داشته باشد نیز می‌باشد، ولی نوع زایلن در نمونه‌های مختلف متفاوت است. به‌علاوه، ترکیب‌های موجود در نمونه‌های مختلف نیز متفاوت بوده، بعضی ترکیب‌ها در یک نمونه وجود ندارند و در بعضی دیگر وجود دارد. همچنین بعضی از ترکیب‌ها در نمونه برگ خشک وجود داشته، ولی برگ تر فاقد آن است و یا اینکه بعضی از این ترکیب‌ها در برگ خشک وجود ندارند ولی در برگ تر وجود دارند. یافته‌های این بررسی نوید تغییرات فصلی و خشک یا تر بودن برگ می‌باشد.

مقایسه نتایج حاصل از طیف‌سنجی GC-MS چهار نمونه از برگ درخت گردو نشان می‌دهد که در برگ خشک نمونه بهار، ترکیب‌های زیادتری در مقایسه با نمونه تر همان برگ وجود دارد (ترکیب‌های ردیف‌های ۶، ۷، ۹، ۱۰ و ۱۲) که مؤید فرار بودن این ترکیب‌ها است. ولی نیتالین-۲-متیل و ۲،۱-بنزی نیدی کربوکسیلیک اسید و دی آزو اوکتیل استر در نمونه‌های خشک و تر بهار مشاهده شده است. نکته دیگر اینکه در نمونه تر فصل بهار، ترکیب‌های ردیف ۱۲ تا ۱۶ جدول وجود دارند، در حالی که این ترکیب‌ها در نمونه بهار مشاهده نشده‌اند.

با وجودی که نیتالین ۳،۲ دی متیل (ردیف ۲۰) در برگ خشک تابستانه و دکان (ردیف ۱۳) در برگ تر تابستانه وجود دارد، ولی تری دکان (ردیف ۱۸)، دو دکان (ردیف ۱۷)، تری دکان (ردیف ۱۸) و تترا دکان (ردیف ۱۹) در هر دو نمونه خشک و تر تابستانه مشاهده شده است. واتیل سیکلوهاگزان (ردیف ۲۱) در برگ تر تابستانه شناسایی شده است (جدول ۱). نتایج بدست آمده نه تنها مؤید تغییرات فصلی مواد استخراجی برگ درخت گردو می‌باشد، بلکه تغییراتی بین نمونه خشک و تر بهار ظاهر شده است که نشان‌دهنده فرار بودن بعضی از این ترکیب‌ها می‌باشد. این یافته بیانگر وجود بوی مشخصی از برگ‌های درخت گردو در فصل بهار است.

- acids and quinones in annual shoots of common walnut (*Juglans regia* L.). Journal of Plant Science. 170; 453-461 (In Persian).
- Technical Association of Pulp and Paper Industry, 2020. Tappi test methods T204-05. Tappi Press, Atlanta Georgia, United States of America.
- Vaysi, R. and Habib P., 2022. Identification and comparison of organic chemical components in wood and bark of hornbeam and ironwood by GC-MS methods. Iranian Journal of Wood and Paper Research Vol. 37, no. 2:150-163. (In Persian).
- Vaysi, R., Malekian, B. and Masoudifar, M., 2020. Identification and comparison of metallic ions and organic chemical components in wood and bark of mulberry tree by atomic absorption and GC-MS methods. Iranian Journal of Wood and Paper Research Vol. 35, no. 3:283-293 (In Persian).
- Different performances regarding bioactive compounds and in vitro antioxidant and antitumor effects. Industrial Crops and Products. 51; 430-436.
- Sharafetichaleshtre, A., Sharafetichaleshtre, R., Sharafetichaleshtre, F. and Rafiean, M., 2010. Investigating the anti-bacterial effect of ethanol extract of walnut tree leaves on *Peripeoni Bactereum Akne*. Research J. of Zanjan Medical Sciences University, vol. 16, no. 71:42-49 (In Persian).
- Slatnar, A., Mikulic-petkovsek, M., Stamper, F., Veberic, R. and Solar, A., 2015. Identification and Quantification of phenolic compounds in kernels, oil and bagasse pellets of common walnut (*Juglans regia* L.). A journal of the Canadian Institute of Food Science and Technology (CIFST).67; 255-263.
- Solar, A., Colaric, M., Usenik, V. and Stamper, F., 2006. Seasonal variations of selected flavonoids, phenolic