مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

ارزیابی روش های مختلف استخراج ترکیبات فیتوشیمیایی و آنتی اکسیدانی عصاره برگ مورینگا *الیفرا*

سعید دغاغله[۱]، علیرضا کیاست[۲]، سید محمد صفی الدین اردبیلی[۳*]، رویا میرزاجانی[٤]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده علوم پایه، گروه شیمی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

۲- استاد، دانشکده علوم پایه، گروه شیمی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

۳- استادیار، دانشکده کشاورزی، گروه مهندسی بیوسیستم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

٤- دانشیار، دانشکده علوم پایه، گروه شیمی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۲۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۱۱

کلمات کلیدی:

مورینگا الیفرا،

استخراج،

محتوای فنولی،

خواص آنتی‌اکسیدانی.

DOI: 10.52547/fsct.18.121.13

DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.121.28.2

* مسئول مکاتبات:

m.safieddin@scu.ac.ir

چکیده

مورینگا *الیفرا* (Moringa oleifera) به عنوان یک منبع غنی و مقرون به‌صرفه از ترکیبات فیتوشیمیایی شناخته شده می‌باشد و دارای کاربردهای فراوانی در صنعت، تصفیه‌آب، داروسازی و تولید سوخت‌های زیستی است، برگ گیاه مورینگا *الیفرا* توسط مرکز گیاهی تایوان از میان ۱۲۰ نوع گونه مواد غذایی مورد مطالعه به عنوان گیاهی دارای بالاترین محتوای تغذیه‌ای معرفی شد. در این پژوهش تاثیر روش‌های مختلف استخراج از قبیل ماسراسیون و سوکسله برمیزان محتوای فنولی، فلاونوئیدی و خواص آنتی‌اکسیدانی، همچنین اثر این عصاره‌ها بر روی سلول‌های سرطانی A549 ریه به وسیله آزمون MTT بررسی گردید. طبق نتایج بدست آمده از برگ گیاه مورینگا *الیفرا* بیشترین بازده استخراج مربوط به عصاره‌گیری به روش سوکسله بود. بیش‌ترین محتوای فنولی و فلاونوئیدی مربوط به روش استخراج ماسراسیون بود. نتایج حاصل از بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره نشان داد که بیشترین خواص آنتی‌اکسیدانی مربوط به عصاره حاصل از روش سوکسله بود. آزمون MTT نشان داد که از بین عصاره‌های مختلف کم‌ترین IC50 مربوط به عصاره استخراجی توسط روش سوکسله می‌باشد. این مطالعه نشان می دهد که برگ های مورینگا *الیفرا* یک منبع تغذیه ای مناسب است.

۱-مقدمه

گیاهان دارویی به عنوان منبع طبیعی ترکیبات فعال بیولوژیکی مورد استفاده قرار می گیرند[۱, ۲]. طبق گفته WHO، بیش از ۸۰ درصد از جمعیت کشورهای در حال توسعه از داروهای گیاهی و دیگر داروهای سنتی برای درمان بیماری خود استفاده می کنند[۳, ٤]. قرن‌های متمادی بشر درمان بیماری‌هایش را در طبیعت جستجو می‌کرد و دانشمندان بزرگ پزشکی در دانشگاه گندی شاپور و بقراط در سرزمین یونان و ابن سینا و رازی در ایران اسلامی آزموده‌های پزشکی را عالمانه تدوین و در اختیار بشر قرار دادند [۵].

مورینگا الیفرا درختی خزان شونده از خانواده مورینگاسه است. دارای رشد بسیار سریع، بومی شمال هند و پاکستان و نپال می‌باشد [٦, ۷]. این درخت با کم آبی تطبیق پیدا کرده است و به بارندگی بین ۷٦۰ تا ۲۵۰۰ میلی‌متر نیاز دارد [۸, ۹]. از مشخصات این گیاه برگ‌هایی شانه‌ای مضاعف، مرکب از برگچه‌های کوچک و متقابل و گل‌هایی سفید به قطر ۲۵ میلی‌متر می‌باشد. غلاف‌هایی به شکل چوب طبل، دانه‌ها سه گوش، بالدار، تیره رنگ و گرد آن را در برگرفته است [۱۰]. ارتفاع این درخت تا ۱۲ متر می‌رسد [۱۱]، دمای بهینه برای رشد *مورینگا الیفرا* ۲۸/۵- ۱۸/۷ درجه سانتی‌گراد می‌باشد، اما تا دمای ٤۸ درجه سانتی‌گراد و یخ زدگی را تحمل می‌کند [۱۲]. کاربردها و پتانسیل‌های متعدد آن در دوره‌های گذشته توجه کشاورزان و محققان را به خود جلب کرده است.

مورینگا الیفرا به درخت زندگی شناخته شده است. یکی از مفیدترین درختان جهان به حساب می آید زیرا می توان از هر قسمت از درخت *مورینگا الیفرا* برای مصارف دارویی، غذایی و صنعتی استفاده کرد. به طور خاص برگ های تازه ی *مورینگا الیفرا* را می توان در سالاد استفاده کرد یا آن ها را پخته یا به صورت پودر خشک بدون اینکه ارزش غذایی آن از بین برود برای ماه ها نگهداری کرد. عصاره برگ *مورینگا الیفرا* حاوی ترکیبات پیچیده ی فیتوشیمیایی می باشد. که به طور عمده شامل اسیدهای فنولیک و فلاونوئیدهای متفاوت است ترکیبات فنولی متابولیت های ثانویه گیاه هستند که در مقاومت گیاه نقش دارند[۱۳]. فنول ها از متنوع ترین گروه های مواد فعال گیاهی هستند. این ها ترکیبات طبیعی مهمی هستند که دارای فعالیت آنتی اکسیدانی هستند. آنتی اکسیدان ها نقش مهمی در مهار رادیکال های آزاد بازی می کنند. درحال حاضر تحقیقات به سمت بدست آوردن آنتی اکسیدان های طبیعی حاصل از گیاهان هدایت می شود. برگ های *مورینگا الیفرا* جمع آوری شده از مناطق مختلف جغرافیایی در جهان می تواند تفاوت هایی در فعالیت های آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی و همچنین در محتویات فنولی و فلاونوئیدی کل نشان دهد . همچنین محتویات ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی اکسیدانی برگ های *مورینگا الیفرا* می تواند طبق روش استخراج متفاوت باشد[١٤]. باوجود شواهد مبنی براینکه برگ *مورینگا الیفرا* منبع مهمی از ترکیبات با فعالیت آنتی اکسیدانی هستند و اینکه ترکیبات فنلی بسته به عوامل مختلف از جمله منشا جغرافیایی و شرایط استخراج مورد استفاده ممکن است به طور قابل توجهی متفاوت باشد، ر پژوهش حاضر برای اولین بار در ایران با هدف ارزیابی روش های مختلف استخراج ترکیبات فیتوشیمیایی و آنتی اکسیدانی عصاره برگ *مورینگا الیفرا* صورت گرفت.

۲-مواد و روش‌ها

۲-۱-مواد

مواد مورد استفاده در این پژوهش شامل، اتانول، معرف فولین-سیوکالتیو، سدیم کربنات، سدیم نیتریت، تری آلومینیوم کلرید و سدیم هیدروکسید از شرکت مرک آلمان و همچنین گالیک اسید و کوئرستین از شرکت سیگما بود. علاوه بر این، رده سلولی A549 سرطان ریه تهیه شده از انستیتو پاستور تهران و در آزمایشگاه کشت سلول گروه ژنتیک دانشگاه شهید چمران اهواز کشت داده شد.

۲-۲- تهیه نمونه گیاهی

برگ تازه *مورینگا الیفرا* از شرکت کشت و صنعت ملکه در قشم تهیه و پس از شناسایی توسط هرباریوم گروه زیست شناسی دانشگاه شهید چمران اهواز، در دمای محیط و دور از نور آفتاب خشک شد و سپس نمونه با استفاده از آسیاب پودر شد.

۲-۲-۱-عصاره گیری به روش خیساندن

۳ گرم برگ گیاه *مورینگا الیفرا* به صورت خشک و پودر شده به یک ارلن منتقل و به آن ۱۲۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد (V/V) اضافه شد. پودر گیاه به مدت ۷۲ ساعت در تماس با حلال بر روی همزن مغناطیسی (Shaker Rotator FR

602) قرار گرفته و بعد از مدت زمان تعین شده آن را توسط کاغذ صافی واتمن صاف کرده و به منظور تغلیظ کردن آن را از دستگاه تقطیر کننده دوار Heidolph استفاده شد. سپس عصاره به دست آمده به منظور خشک شدن به فریز درایر FD-8505 منتقل شد. عصاره خشک به دست آمده در یک ظرف تیره و در دمای ٤ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

۲-۲-۲-عصاره گیری به روش سوکسله

۳گرم برگ *مورینگا الیفرا* به صورت خشک و پودر شده درون انگشتانه قرار داده شد. سپس ۱۲۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد درون بالن ریخته و سپس بالن درون حمام روغن و تحت شرایط تقطیر برگشتی قرار داده شد. عمل عصاره گیری توسط سوکسله به مدت ٢٤ ساعت ادامه یافت. بعد از اتمام این فرآیند عصاره بدست آمده توسط تقطیر کننده دوار Heidolph تغلیظ شد. در ادامه عصاره حاصله جهت خشک شدن به فریز درایر FD-8505 منتقل شد.

۲-۳-روش آزمایشات

۲-۳-۱-بازده استخراج

بازده استخراج توسط رابطه (۱) اندازه گیری و بدست آمد.

۱۰۰×وزن پودر خشک /وزن عصاره حاصله=بازده عصاره گیری

۲-۳-۲-بررسی های فیتوشیمیایی

۱۲/۵ میلی‌گرم از عصاره‌های مورد نظر را در ۲۵ میلی‌لیتر اتانول حل نموده و سپس آزمون‌های فیتوشیمیایی بر روی عصاره‌های محلول انجام شد. وجود و عدم وجود متابولیت‌های ثانویه در حضور محلول شاهد مورد مقایسه و بررسی قرار گرفت.

۲-۳-۳-اندازه گیری میزان فنول کل

برای اندازه گیری ترکیبات فنولی از روش Oldoni و همکاران با اصلاحات جزئی استفاده شد [١٤]. محلول‌هایی با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در اتانول از عصاره‌های مختلف ساخته شد. به ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره‌ها، ۲/۵ میلی‌لیتر فولین سیوکالتو ۱۰٪ و بعد از ۵ دقیقه ۲ میلی‌لیتر Na2CO3 ٤٪ اضافه شد و سپس به مدت ۲ ساعت در دمای محیط و در تاریکی روی دستگاه لرزاننده Shaker Rotator FR 602 قرار داده شد. سپس جذب آن‌ها توسط دستگاه GB UV-Vis مدل Cintra 101 در ۷۵۰ نانومتر ثبت و به کمک منحنی استاندارد گالیک اسید (mg/L ۵-۱۰۰) محتوی فنولی عصاره‌ها بر حسب میلی‌گرم بر لیتر گزارش شد.

۲-۳-٤-اندازه‌گیری مقدار کل ترکیبات فلاونوئیدی

محتوی فلاونوئیدی کل با استفاده از روش رنگ سنجی آلومینیوم کلرید ژیشن و همکاران با اعمال تغییراتی انجام شد[١٦].

محلول‌هایی با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در اتانول از عصاره‌های مختلف ساخته شد و به ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره‌های با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، ۲ میلی‌لیتر آب دیونیزه و ۰/۱۵ میلی‌لیتر NaNO2 افزوده شد. بعد از گذشت ۵ دقیقه ۰/۱۵ میلی‌متر محلول ۱۰ درصد AlCl3 در آب به آن اضافه و بعد از گذشت ٦ دقیقه ۱ میلی‌لیتر سود یک مولار به آن افزوده و با آب دیونیزه به حجم ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. محلول‌ها بهم زده شد و سپس جذب آن‌ها توسط دستگاه GB UV-Vis مدل Cintra 101 در ۵۱۰ نانومتر ثبت شد. سپس به کمک منحنی استاندارد کوئرستین (mg/L ۲۵-۲۵۰) محتوای فلاونوئیدی عصاره‌ها برحسب میلی‌گرم بر لیتر گزارش شد.

۲-۳-۵-اندازه گیری خاصیت آنتی اکسیدانی

برای اندازه گیری خاصیت آنتی اکسیدانی از روش Vikas و همکاران با اعمال تغییراتی استفاده شد[۷]. محلول‌هایی با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در اتانول از عصاره‌های مختلف ساخته شد و به ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره‌های با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، ۰/۵ میلی لیتر DPPH ۰/۵ میلی مولار در اتانول افزوده شد. محلول ها به مدت ۳۰ دقیقه با پوشش فویل بر روی دستگاه لرزاننده Shaker Rotator FR 602 قرار داده شد جذب آن‌ها توسط دستگاه GB UV-Vis مدل Cintra 101در۵۱۷ نانومتر اندازه گیری شد. با جذب های حاصله میزان بازداری برای هر عصاره محاسبه و سپس به کمک منحنی استاندارد ترولاکس (۱۵-۱۵۰ میلی مولار) میزان خاصیت آنتی اکسیدانی بر حسب میکرمول/لیترهم ارز ترولاکس گزارش شد.

۲-۳-٦-کشت سلولی

رده سلولی آدنوکارسینومای آلوئولار بازال اپی تلیال A549 سرطان ریه از انستیتیو پاستور ایران خریداری شد. جهت کشت رده‌ی سلولی A549 سرطان ریه در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد پن استرپت (پنیسیلین/استرپتومایسین) درون فلاسک در انکوباتور حاوی ۵ درصد کربن دی‌اکسید، رطوبت ۹۵٪ و دمای ۳۷ درجه

سانتی‌گراد نگهداری شدند.

۲-۳-٦-۱-بررسی تیمار و سمیت عصاره‌های سوکسله و ماسراسیون برگ *مورینگا الیفرا* به روش MTT assay

به منظور بررسی اثر عصاره های برگ *مورینگا الیفرا* بر رشد و تکثیر سلول های سرطانی و تعیین IC_{50} این ترکیبات، از روش رنگ سنجی MTT استفاده شد.

جهت انجام این آزمون از ماده تترازولیوم بروماید استفاده شد. در این روش نمک تترازولیوم بروماید توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول های زنده به فورمازان نامحلول احیا می شود. سلول های A549 سرطان ریه در پلیت های ۹٦ خانه ای و هر خانه حاوی ۵×۱۰^{۳} سلول در حجم ۱۰۰ میکرولیتر محیط DMEM کشت داده شدند. سپس تیمار سلول ها با غلظت های ۳۱/۲۵، ٦۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم برلیتر عصاره های سوکسله و ماسراسیون برگ *مورینگا الیفرا* به مدت ٤۸ ساعت انجام شد.

پس از ٤۸ ساعت محیط کشت هر خانه در زیر هود لامینار در شرایط استریل حذف شد. سپس به هر خانه از پلیت ۹٦ خانه ایی ۳۰ میکرولیتر محلول MTT با غلظت نهایی ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر اضافه گردید، سپس محلول ها به مدت ٤ ساعت در انکوباتور قرار داده و سپس ۱۲۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکسید (DMSO) به عنوان حلال بلورهای فورمازان به هر خانه اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه شدند و جذب نمونه ها را توسط دستگاه ELISA: BIO-RAD Model 680در طول موج ۵۷۰ نانومتر نسبت به گروه کنترل گزارش شد. سپس با استفاده از نرم افزار Graph pad prism V.6 نموداری که بیانگر میزان تکثیر و مرگ و میر سلولی سلول ها در حضور دوزهای مختلف تیمار با عصاره های برگ *مورینگا الیفرا* بود ترسیم شد.

۳-آنالیز آماری

به منظور آنالیز آماری داده ها از نرم افزار Spss نسخه ۱٦ استفاده شد .تمام داده ها بر اساس میانگین±انحراف معیار نشان داده شدند. سطح معنی داری تست های آماری در مورد همه تست ها $P<0.05$ در نظر گرفته شد. برای بررسی اختلاف آماری بین میانگین پارامترهای مختلف در گروه های مورد آزمایش از آزمون های دانکن استفاده شد.

٤-یافته‌ها

نتایج بدست آمده از بررسی‌های مقدماتی فیتوشیمیایی، حضور ترکیب‌های فلاونوئیدها، تاننی، آلکالوئیدی و قندهای ساده را در عصاره حاصل از برگ *مورینگا الیفرا* تایید می‌کند. در حالی که ترکیب‌های ساپونینی و گلیکوزیدها در این گیاه یافت نشد.

٤-۱-میزان بازده عصاره

یافته‌های حاصل از بررسی میزان بازده استخراج عصاره در جدول ۱ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود، میزان بازده دو عصاره مورد بررسی از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری ($p <$ ۰/۰۵) با یک دیگر داشتند. بیشترین میزان بازده استخراج توسط روش سوکسله گزارش شد.

Table 1 Extraction efficiency

Extraction method	Extraction efficiency %
maceration	27.8±0.46[a]
soxhlet	32.30±0.32[b]

Results of the average of 3 repetitions ± SD
Different letter between columns indicate significant statistical difference at level 5%

علت این اختلاف را می‌توان به تاثیر دما بر تخریب دیواره سلولی و همین طور افزایش نفوذپذیری حلال به درون سلول و در نتیجه افزایش ترکیبات درون سلولی نسبت داد[۱۷]. انتخاب روش مناسب عصاره‌گیری می‌تواند میزان استخراج ترکیبات موثره موجود در گیاه را افزایش دهد. بنابراین بیشتر تحقیقات بر بهینه سازی بهترین شرایط استخراج این ترکیبات از گیاه *مورینگا الیفرا* متمرکز شده است. عصاره‌گیری به روش خیساندن و سوکسله از روش‌های کلاسیک عصاره‌گیری می‌باشد که در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفت. طبق بررسی‌های انجام شده در این تحقیق، روش عصاره گیری سوکسله از برگ گیاه *مورینگا الیفرا* با ۳۲/۳ درصد بیشترین راندمان را داشت. باتوجه به اینکه در روش سوسکله گیاه به طور مداوم با حلال تازه در تماس است، تاثیر دما بر تخریب دیواره سلولی و افزایش نفوذ پذیری حلال به درون سلول راندمان بالاتر استخراج توسط روش سوسکله کاملا منطقی به نظر می‌رسد.

٤-۲-مقدار ترکیبات فنول

یافته‌های حاصل از بررسی محتوای ترکیبات فنولی کل عصاره‌ها با استفاده از استاندارد گالیک اسید در جدول ۲ نشان

داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود، دو عصاره مورد بررسی از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری (p <۰/۰۵) با یک دیگر داشتند. بیشترین مقدار ترکیبات فنولی توسط روش خیساندن استخراج گردید. و مقدار فنول کل آن تقریباً ۵/۳ برابر بیشتر از مقدار فنول کل عصاره حاصل از روش سوسکله بود.

Table 2 Total phenolic compounds

Extraction method	Total phenolic compounds (mgGA/L)
maceration	0.49^{a}±92.93
soxhlet	17.32±0.22^{b}

Results of the average of 3 repetitions ± SD
Different letter between columns indicate significant statistical difference at level 5%

از آن جایی که در روش خیساندن نسبت به روش سوکسله حرارت دخالت ندارد و در دمای محیط عمل استخراج انجام می شود و از طرفی پودر گیاه *مورینگا الیفرا* در روش ماسراسیون به مدت ۷۲ ساعت در حلال اتانول خیسانده شده فرصت کافی برای استخراج ترکیبات ثانویه را دارد. ترکیبات فنولی یک از مهم ترین ترکیبات ثانویه گیاهان می‌باشد که در تمام قسمت‌های گیاه وجود دارد[۱۸]. معرف فولین – سیوکالتیو واکنشگری است که برای اندازه‌گیری ترکیبات فنولی مورد استفاده قرار می‌گیرد. واکنشگر فولین – سیوکالتیو توسط گروه هیدروکسی فنول احیا می‌شود و ترکیب رنگی که در ۷۶۰ نانومتر جذب دارد را ایجاد می‌کند. براساس مطالعات صورت گرفته بیشترین میزان ترکیبات فنولی در برگ‌های *مورینگا الیفرا* می‌باشد[۱۹]. گل‌ها و دانه ها نیز حاوی ترکیبات فنولی هستند اما غلظت بسیار کمتری نسبت به برگ‌های *مورینگا الیفرا* دارند[۱۹, ۲۰]. مقادیر کم ترکیبات فنولی، در عصاره حاصل از روش سوکسله نسبت به عصاره حاصل از روش ماسیراسیون می تواند حساسیت این ترکیبات به حرارت باشد. Pinelo و همکاران در سال ۲۰۰۴ در مطالعه خود که روند استخراج ترکیبات فنولیک را بررسی نمودند نتیجه گیری کردند که در دماهای بالا، میزان ترکیبات فنولیک کاهش می‌یابد، که دلیل این امر را واکنش‌های پلیمرازسیون ترکیبات فنولیک با خود می باشد. این موضوع با یافته‌های پژوهش حاضر مطابقت دارد. در مطالعه ی Rocchetti و همکاران در سال ۲۰۲۰ نشان دادند که عصاره برگ‌های *مورینگا الیفرا* منبع خوبی از پلی فنول‌هایی زیست فعال هستند که می‌توان از آن‌ها در برنامه غذایی استفاده کرد[۲۱].

٤-۳-مقدار ترکیبات فلاونوئیدی

یافته‌های حاصل از بررسی محتوای ترکیبات فلاونوئیدی کل عصاره‌ها با استفاده از استاندارد کوئرستین در جدول ۳ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود، دو عصاره مورد بررسی از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری (p< ۰/۰۵) با یک دیگر داشتند.

بیشترین مقدار ترکیبات فلاونوئیدی توسط روش خیساندن استخراج گردید. و مقدار فلاونوئیدی کل آن تقریبا بیشتر از مقدار فلاونوئیدی کل عصاره حاصل از روش سوسکله بود.

Table 3 Total Flavonoids compounds

Extraction method	Total Flavonoids compounds (mgQU/L)
maceration	138.5±0.35^{a}
soxhlet	0.22^{b}±52.25

Results of the average of 3 repetitions ± SD
Different letter between columns indicate significant statistical difference at level 5%

پلی‌فنول‌ها به ویژه فلاونوئیدها حساس به حرارت هستند، بنابراین در دماهای بالا پایداری آن‌ها کاهش می‌یابد. دمای بالا در استخراج توسط سوکسله می‌تواند برخی از ترکیبات فنولی که در محیط استخراج پراکنده شده‌اند و پایداری حرارتی کمتری دارند را تخریب کند. در برخی از مطالعات گزارش شده است که فلاونوئیدها گروه غالب از ترکیبات موجود در برگ *مورینگا الیفرا* می‌باشدکه نتایج مطالعه حاضر را تایید می‌کند. Vongsak و همکاران در سال ۲۰۱۳ محتوی فنولی و فلاونوئیدی برگ *مورینگا الیفرا* را بررسی کردند و از بین عصاره‌های مورد بررسی، عصاره ماسراسیون دارای بیشترین محتوی فنولی و فلاونوئیدی بود[۲۲]. در بررسی دیگر که توسط Nobsse و همکاران در سال ۲۰۱۸ انجام گرفت نشان دادند که عصاره اتانولی برگ *مورینگا الیفرا* دارای بیشترین مقادیر فلاونوئید می باشد[۲۳].

٤-٤-میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی

یافته‌های حاصل از بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره‌ها توسط استاندارد ترولاکس در جدول ٤ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود، دو عصاره مورد بررسی از لحاظ آماری اختلاف معنی داری (p< ۰/۰۵) با یک دیگر داشتند، و میزان خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره حاصل از روش سوکسله بیشتر از عصاره حاصل از روش ماسراسیون می باشد.

Table 4 Total amount of antioxidant capacity

Extraction method	Total amount of antioxidant capacity (µmol/L Trolax)
maceration	0.04^{a}±128.66
soxhlet	0.01^{b}±129.25

Results of the average of 3 repetitions ± SD
Different letter between columns indicate significant statistical difference at level 5%

فعالیت به دام اندازی رادیکال دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH) روشی آسان و گسترده برای بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیبات طبیعی یا عصاره های گیاهی در محیط آزمایشگاهی می باشد[۲٤]. DPPH رادیکالی آزاد به رنگ بنفش می باشد. این ترکیب با ترکیبات آنتی اکسیدان هیدروژن دهنده واکنش داده و به مولکول پایدار زرد رنگ دی فنیل پیکریل هیدرازین تبدیل می شود و در ۵۱۷ نانومتر قابل ردیابی هست. در این مطالعه فعالیت مهار رادیکال DPPH عصاره برگ *مورینگا الیفرا* با استاندارد ترولاکس مقایسه شد. در تحقیق حاضر میزان خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره برگ *مورینگا الیفرا* در روش سوکسله ۱۲۹/۲۵ (میکرومول/لیتر ترولاکس) به دست آمد که از نظر آماری با میزان خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره حاصل از روش ماسیراسیون اختلاف معنی داری داشت ($p<۰/۰۵$). طبق بررسی های صورت گرفته در این مطالعه، عصاره برگ *مورینگا الیفرا* حاصل از روش سوکسله با وجود استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی کمتر نسبت به عصاره برگ *مورینگا الیفرا* حاصل از ماسیراسیون، میزان خاصیت آنتی اکسیدانی بیشتری نسبت به عصاره ماسیراسیون از طریق مهار رادیکال آزاد DPPH از خود نشان داد. عدم وجود همبستگی بین محتوی ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی با خاصیت آنتی اکسیدانی در این پژوهش احتمالا به دلیل حضور برخی ترکیبات فیتوشیمیایی دیگر مانند توکوفرول ها و رنگدانه ها بوده که به عنوان اثرات هم افزایی میان آن ها به کمک خاصیت آنتی اکسیدانی می آید. Biswas و همکاران ۲۰۱۲ هم نتایج مشابه را گزارش و بیان کردند که فعالیت آنتی اکسیدانی نعناع صرفاً به دلیل وجود پلی فنول ها نمی باشد[۲۵].

٤-۵-نتایج مورفولوژی سلول‌های تحت تیمار

بررسی مورفولوژی سلول‌های A549 با استفاده از میکروسکوپ اینورت (شکل۱) نشان داد که سلول‌های A549 تیمار با غلظت‌های ۱۲۵و ٦۲/۵ میلی‌گرم برلیتر از عصاره‌های ماسراسیون و سوکسله در مدت ٤۸ ساعت، از نظر ظاهری با سلول‌های گروه کنترل تفاوت داشتند. بدین صورت که در سلول‌های A549 تحت تیمار عصاره‌ها، چروکیدگی و کاهش حجم سلول، از دست دادن ارتباط و تعامل سلولی و ایجاد ظاهر سلول‌های منفرد دیده شد که بیانگر این مسئله است که غلظت‌های ذکر شده از عصاره‌ها دارای اثر سمی بوده و منجر به مرگ سلولی سلول‌ها شده‌اند.

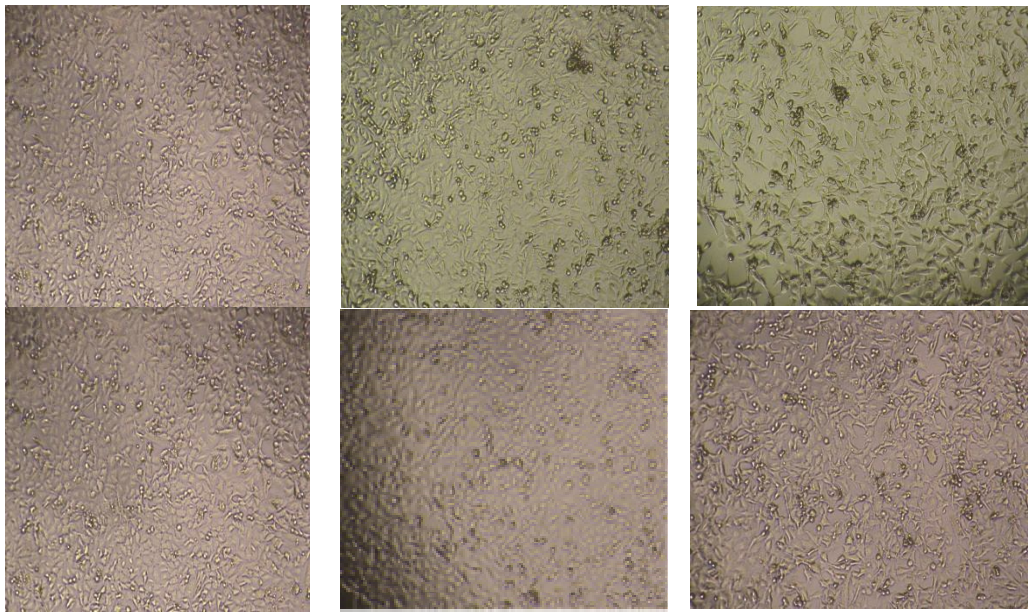

Fig 1 Results of morphological examination of A549 cells at concentrations of 125 mg/ml (right), 62.5 mg/ml (middle) and control (left) for maceration (a) and Soxhlet (b) extracts of Moringa oleifera leaves .

٤-٦-تعیین غلظت IC50 عصاره هـای بـرگ *مورینگا الیفرا* در سلول A549

مقدار جذب نوری به دست آمده از سلول‌هایی که تحت تـاثیر غلظت‌های مختلف عصاره ماسراسیون و سوکسله قرار گرفتند، با مقدار جذب نوری سلول‌هایی که تحت تـاثیر تیمـار نبودنـد مقایسه شدند. نتایج جذب که در سه گروه تکرار شده بودند در نـرم افـزار Graphpad prism وارد شـد و پـس از تبـدیل غلظت¬های مختلف عصاره به مقادیر لگاریتمی و نرمالایزسیون مقادیر جذب و تبدیل آنها به درصد به نحوی که بیشترین مقدار جذب ۱۰۰٪ و کمترین مقدار جـذب ۵۰٪ در نظر گرفته شد؛ مقادیر IC50، با استفاده از این نـرم افـزار بـه دست آمد.

بر این اساس، مقدار IC50 عصاره ماسراسیون برای سلول‌های A549 در مدت زمان ٤٨ ساعت، ۱۰۹/۱ میلی‌گرم بـر لیتـردر نظر گرفته شد. و مقدار IC50 عصاره سوکسله برای سـلول-های A549 در مدت زمان ٤٨ ساعت،٤٦/٣٠ میلی‌گرم بر لیتر در نظر گرفته شد. (شکل۲)

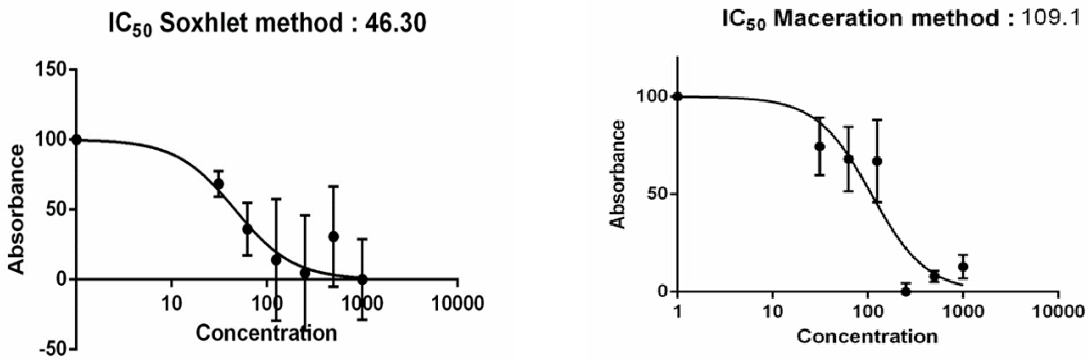

Fig 2 Data from Graphpad software for Maceration and Soxhlet extracts

با توجه به داده‌های حاصل از نرم افزار Graphpad، عصاره سوکسله دارای بیشترین سمیت بر روی سلول‌های A549 بود. این اثر را می‌توان به میزان راندمان بالاتر عصاره سوکسله نسبت به بازده عصاره دیگر ارتباط داد. در واقع اثر ضدسرطانی عصاره‌های حاصل، ارتباط مستقیم و همسانی با محتوی فنول کل، فلاونوئید کل و فلاونول کل در عصاره ندارد. در نتیجه اثر ضدسرطانی این عصاره همانند خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن به دلیل حضور برخی ترکیبات فیتوشیمیایی دیگر مانند توکوفرول‌ها، بتاکاروتن‌ها، کارتنوئیدها و تری ترپن‌ها باشد [٢٦, ٢٧]. در مطالعه ی بارلی و همکاران (٢٠١٦) نشان دادن که عصاره اتانولی برگ *مورینگا الیفرا* دارای خاصیت آنتی اکسیدانی و ضد سرطانی روی سلول های روده بزرگ دارد[٢٨].

٥-بحث و نتیجه گیری

مطالعات مختلفی از حضور ترکیبات فعال زیستی در اجزای مختلف گیاه *مورینگا الیفر* گزارش شده است. برگ‌های *مورینگا الیفرا* به دلیل دارا بودن ترکیبات طبیعی مانند فنول‌ها، فلاونوئیدها و ویتامین C به عنوان داروی گیاهی و مکمل غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. پلی فنول‌ها یکی از گروه‌های مهم فیتوشیمیایی هستند که در ساختار خود دارای یک حلقه فنول (ترکیبات فنولی) یا بیش از یک حلقه فنول (فلاونوئیدها) می‌باشند.. فلاونوئیدها گروه دیگری از پلی فنول‌ها با بیش از ۳۰۰۰ ساختار و یکی از مهم ترین ترکیبات ثانویه در گیاهان به شمار می‌آید.حدود ٤٠٠٠ نوع ترکیب متعلق به فلاونوئیدها در گیاهان وجود دارد، که شامل آنتوسیانین‌ها، فلاونول‌ها و فلاون ها هستند[٢٩, ٣٠].

باتوجه به نتایج بدست آمده از این پژوهش محتوی ترکیبات فنولی، فلاونوئیدها و فلاونول‌ها در هر دو عصاره (ماسیراسیون و سوکسله) تفاوت معنی داری ($p<۰/۰۵$) را از خود نشان داده و در مقایسه مقادیر ترکیبات فنولی، فلاونوئیدها و فلاونول‌ها بیشترین و کمترین مقدار به ترتیب در عصاره ماسیراسیون و سوکسله مشاهده شده است.

مورینگا الیفرا (Moringa oleifera) به عنوان یک منبع غنی و مقرون به‌صرفه از ترکیبات فیتوشیمیایی شناخته شده می‌باشد و دارای کاربردهای فراوانی در صنعت، تصفیه‌آب، داروسازی و تولید سوخت‌های زیستی است. در این پژوهش تاثیر

روش‌های مختلف استخراج از قبیل ماسراسیون و سوکسله برمیزان محتوای فنولی، فلاونوئیدی، فلاونولی و خواص آنتی‌اکسیدانی این گیاه مورد بررسی قرار گرفت.

طبق نتایج بدست آمده از برگ گیاه *مورینگا الیفرا* بیشترین بازده استخراج مربوط به عصاره‌گیری به روش سوکسله بود. بیش‌ترین محتوای فنولی، فلاونوئیدی و فلاونولی مربوط به روش استخراج ماسراسیون بود. نتایج حاصل از بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره نشان داد که بیشترین خواص آنتی‌اکسیدانی مربوط به روش استخراج سوسکله می باشد.

برگ های *مورینگا الیفرا* منبع غنی از ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی می باشد. نتایج نشان می دهند که میزان استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی به میزان قابل توجهی تحت تأثیر روش استخراج می باشد. البته برای دستیابی به تمام فواید و خواص گیاه *مورینگا الیفرا* به مطالعات بیشتری نیاز است.

٦- تشکر و قدردانی

بدینوسیله نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به لحاظ تأمین منابع مالی انجام این پژوهش (شماره پژوهانه: SCU.AA98.29840) سپاسگزاری می‌نمایند.

۷- منابع

[1] H. Zhang, Z. Ma, X. Luo, X. Li, Effects of mulberry fruit (Morus alba L.) consumption on health outcomes: A mini-review, Antioxidants, 7 (2018) 69.

[2] Z. Ma, J. Ahmad, H. Zhang, I. Khan, S. Muhammad, Evaluation of phytochemical and medicinal properties of Moringa (Moringa oleifera) as a potential functional food, South African Journal of Botany(2019).

[3] W.H. Organization, Regulatory situation of herbal medicines: a worldwide review, in, Geneva: World Health Organization, 1998.

[4] F. Alhakmani, S .Kumar, S.A. Khan, Estimation of total phenolic content, in–vitro antioxidant and anti–inflammatory activity of flowers of Moringa oleifera, Asian Pacific journal of tropical biomedicine, 3 (2013) 623-627.

[5] U. Kleeberg, J.-T. Tews, T. Ruprecht, M. Höing, A. Kuhlmann, C. Runge, Patient satisfaction and quality of life in cancer outpatients: results of the PASQOC* study, Supportive care in cancer, 13 (2005) 303-310.

[6] A. Ferreira, C. Proença, M. Serralheiro, M. Araujo, The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal, Journal of ethnopharmacology, 108 (2006) 31-37.

[7] V. Jaitak, K. Sharma, K. Kalia, N. Kumar, H. Singh, V. Kaul, B. Singh, Antioxidant activity of Potentilla fulgens: An alpine plant of western Himalaya, Journal of Food Composition and Analysis, 23 (2010) 142-147.

[8]M.C. Palada, Moringa (Moringa oleifera Lam.): A versatile tree crop with horticultural potential in the subtropical United States, HortScience, 31 .794-797 (1996)

[9] W. Nouman, S.M.A. Basra, M.T. Siddiqui, A. Yasmeen, T. Gull, M.A.C. Alcayde, Potential of Moringa oleifera L. as livestock fodder crop: a review, Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 38 (2014) 1-14.

[10] A. Meena, S. Ayushy, K. Ramanjeet, P. Bhavana, S. Brijendra, Moringa oleifera: a review, Journal of Pharmacy Research, 3 (2010) 840-842.

[11] J.F. Morton, The horseradish tree, Moringa pterygosperma (Moringaceae)—a boon to arid lands?, Economic botany, 45 (1991) 318-333.

[12] M. Palada, L.-C. Chang, Suggested cultural practices for Moringa, International Cooperators' Guide AVRDC. AVRDC pub, (2003) 03-545.

[13] C. Rodríguez-Pérez, R. Quirantes-Piné, A. Fernández-Gutiérrez, A. Segura-Carretero, Optimization of extraction method to obtain a phenolic compounds-rich extract from Moringa oleifera Lam leaves, Industrial Crops and Products, 66 (2015) 246-254.

[14]T.L.C. Oldoni, N. Merlin, M. Karling, S.T. Carpes, S.M. de Alencar, R.G.F. Morales, E.A. da Silva, E.J. Pilau, Bioguided extraction of phenolic compounds and UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS characterization of extracts of Moringa oleifera leaves collected in Brazil, Food Research International, 125 (2019) 108647.

[15] N. Azwanida, A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation, Med Aromat Plants, 4 (2015) 2167-0412.1000196.

[16] J. Zhishen, T. Mengcheng, W. Jianming, The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals, Food chemistry, 64.555-559 (1999).

[17] N. Rezaei, A. Salimi, G. Shemshadi, M.

Kazemzadeh, A. Jebeli Javan, Optimization of extraction conditions of antioxidant and polyphenolic compounds of Ferula Persica extract by using response surface methodology, Food Science and Technology,151-164 (2019) 15.
[18] F. Makari, A. E. Gholam Alipour, K. J. Bayat, Phytochemical Analysis of Various Organs of Rheum Ribes Weed at The Phonological Stage of Flowering (Case Study: Heights of Karizak Village of Kashmar) , (2016).
[19] Z. Ma, J. Ahmad, H .Zhang, I. Khan, S. Muhammad, Evaluation of phytochemical and medicinal properties of Moringa (Moringa oleifera) as a potential functional food, South African Journal of Botany, 129 (2020) 40-46.
[20] F. Alhakmani, S. Kumar, S.A. Khan, Estimation of total phenolic content, in-vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of flowers of Moringa oleifera, Asian Pacific journal of tropical biomedicine, 3 (2013) 623.
[21] G. Rocchetti, J.P. Pagnossa, F. Blasi, L. Cossignani, R.H. Piccoli, G. Zengin, D. Montesano, P.S. Cocconcelli, L. Lucini, Phenolic profiling and in vitro bioactivity of Moringa oleifera leaves as affected by different extraction solvents, Food Research International, 127 (2020) 108712.
[22] B. Vongsak, P. Sithisarn, S. Mangmool, S. Thongpraditchote, Y. Wongkrajang, W. Gritsanapan, Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of Moringa oleifera leaf extract by the appropriate extraction method, Industrial Crops and Products, 44 (2013) 566-571.
[23] P. Nobossé, E.N. Fombang, C.M. Mbofung, Effects of age and extraction solvent on phytochemical content and antioxidant activity of fresh Moringa oleifera L. leaves, Food Science & Nutrition, 6 (2018) 2188-2198.
[24] B.K. Tiwari, Ultrasound: A clean, green extraction technology, TrAC Trends in Analytical Chemistry, 71 (2015) 100-109.
[25] A. Biswas, M. Chatli, J. Sahoo, Antioxidant potential of curry (Murraya koenigii L.) and mint (Mentha spicata) leaf extracts and their effect on colour and oxidative stability of raw ground pork meat during refrigeration storage, Food Chemistry, 13467-472 (2012) 3.
[26]F.Q. Yang, M. Liu, W. Li, J.P. Che, G.C. Wang, J.H. Zheng, Combination of quercetin and hyperoside inhibits prostate cancer cell growth and metastasis via regulation of microRNA- 21, Molecular medicine reports, 11 (2015) 1085-1092.
[27] L. Li, J. Lin, G. Sun, L. Wei, A. Shen, M. Zhang, J. Peng, Oleanolic acid inhibits colorectal cancer angiogenesis in vivo and in vitro via suppression of STAT3 and Hedgehog pathways, Molecular medicine reports, 13 (2016) 5276-5282.
[28] B. Sanganna, H.R. Chitme, K. Vrunda, M.J. Jamadar, Antiproliferative and antioxidant activity of leaves extracts of Moringa oleifera, Int J Curr Pharm Res, 8 (2016) 54-56.
[29] J.-R. Morelló, M.-P. Romero, T. Ramo, M.-J. Motilva, Evaluation of L-phenylalanine ammonia-lyase activity and phenolic profile in olive drupe (Olea europaea L.) from fruit setting period to harvesting time, Plant Science, 168 (2005) 65-72.
[30] S. Siriamornpun, M. Suttajit, Microchemical components and antioxidant activity of different morphological parts of Thai wild purslane (Portulaca oleracea), Weed Science, 58 (2010) 182-188.

Iranian Journal of Food Science and Technology

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Evaluation of different extraction methods of phytochemical and antioxidant compounds of Moringa oleifera leaf extract

Daghaghele, S. [1], Kiasat, A. R. [2], Safieddin Ardebili, S. M. [3*], Mirzajani, R. [4]

1. MSc, Student in Phytochemistry, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
2. Professor, Department of Chemistry, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
3. Assistant Professor, Department of Biosystems Engineering, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
4. Associate Professor, Department of Chemistry, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

ARTICIE INFO

Article History:

Received 2021/ 09/ 14
Accepted 2021/ 11/ 02

Keywords:

Moringa oleifera,
Extraction,
Flavonoid content,
Antioxidant properties.

DOI: 10.52547/fsct.18.121.13

DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.121.28.2

*Corresponding Author E-Mail:
m.safieddin@scu.ac.ir

ABSTRACT

Moringa oleifera is known as a rich and cost-effective source of phytochemical compounds and has many applications in industry, water treatment, pharmacy and biofuels The leaves of Moringa oleifera were introduced by the Taiwan Plant Center as one of the 120 food species studied as the plant with the highest nutritional content. In this study, the effect of different extraction methods such as Maceration and Soxhlet on phenolic content, flavonoid content and antioxidant properties, The effect of these extracts on A549 lung cancer cells was also evaluated by MTT assay. This plant was studied. According to the results obtained from the leaves of Moringa oleifera, the highest extraction efficiency was related to Soxhlet extraction. The highest phenolic and flavonoid content was related to Maceration extraction method. The results of studying the antioxidant properties of the extract showed that most of the antioxidant properties were related to the extract obtained by Soxhlet method. MTT test showed that among the various extracts, the lowest IC50 was related to the extract extracted by Soxhlet method. This study shows that Moringa oleifera leaves are a good nutritional source.