تأثیر حلالهای مختلف بر استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی و فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه هندوانه ابوجهل

صدیقه اسمعیل زاده بهابادی[1*]، فروغ یوسف زائی[2]

۱- استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه زابل، زابل، ایران
۲- دانش آموخته فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
(تاریخ دریافت: ۹۵/۰۹/۰۲ تاریخ پذیرش: ۹٦/۰۸/۰۱)

چکیده

گیاهان منبع غنی از ترکیبات فنولی هستند که مهمترین ضد اکسایش‌های طبیعی به شمار می‌آیند. با توجه به خواص ضد اکسایشی گیاه هندوانه ابوجهل، بهینه سازی استخراج ترکیبات فنولی و فعالیت ضداکسایشی آن ضروری به نظر می‌رسد. در این پژوهش محتوای ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و فعالیت ضداکسایشی عصاره قسمت‌های مختلف هندوانه ابوجهل (برگ، پوست میوه،گوشت میوه و دانه) تحت تاثیر حلال‌های مختلف (متانول ۷۰٪ ، استون، هگزان، کلروفرم و اتیل استات) بررسی گردید. مقدار فنول کل عصاره‌ها توسط روش فولین سیوکالتیو و میزان کل فلاونوئیدها به روش رنگ سنجی آلومینیوم کلرید سنجیده شد. فعالیت آنتی اکسیدانی به سه روش دی فنیل پیکریل هیدرازین (DPPH)، احیای آهن (FRAP) و پراکسید هیدروژن (H2O2) اندازه گیری شد. نتایج از نظر آماری مطابق آزمون توکی در سطح ۵٪ نشان داد، نوع حلال مورد استفاده تاثیر معنی‌داری بر میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی و فعالیت ضداکسایشی عصاره‌ها دارد. بیشترین میزان فنل در عصاره متانولی برگ(۲۷/۰۱ میلی‌گرم بر وزن خشک) و کمترین میزان در عصاره کلروفرمی گوشت میوه (۱/۱۱ میلی گرم بر وزن خشک) مشاهده شد. بیشترین میزان ترکیبات فلاونوئیدی در عصاره متانولی و استونی برگ مشاهده شد. فعالیت ضداکسایشی اندازه‌گیری شده توسط روش‌های مختلف نشان داد عصاره متانولی و استونی بیشترین فعالیت ضداکسایشی دارد. به طور کلی نتایج این تحقیق نشان می‌دهد حلال‌های متانولی و استونی، حلال‌های مؤثرتری در استخراج ترکیبات فنولی می‌باشند. همچنین همبستگی مثبتی بین میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی با فعالیت ضداکسایشی وجود دارد. بر اساس نتایج این تحقیق برگ هندوانه ابوجهل با توجه به مقادیر بالای ترکیبات فنولی به عنوان یک مکمل غنی ازضداکسایش‌های طبیعی معرفی می‌گردد.

کلید واژگان: استخراج، ضداکسایش، ترکیبات فنولی، حلال، هندوانه ابوجهل

* مسئول مکاتبات: esmaeilzadeh@uoz.ac.ir

۱- مقدمه

هندوانه ابوجهل (*Citrullus colocynthis*) از تیره کدوئیان گیاهی علفی است که به صورت خودرو در استان سیستان و بلوچستان می‌روید. مصرف این گیاه از دیر باز به عنوان داروی سنتی در درمان بیماری‌های کبدی، دیابت و ... استفاده می‌شود [۱]. نظر به ارزش و اهمیت گیاهان دارویی در امور درمانی و بهداشتی که از زمان‌های قدیم رایج بوده و امروزه نیز علی رغم پیشرفت‌های چشمگیری که در صنعت داروسازی نصیب بشر گردیده ویژگی‌های خود را در این روند نه تنها از دست نداده بلکه بیش از پیش توجه محافل علمی و پزشکی را به خود معطوف داشته است. اکسیداسیون فرایندی ضروری برای بسیاری از موجودات زنده جهت تولید انرژی و فرایندهای بیولوژیکی است با این حال، رادیکال‌های آزاد در طول فرایند اکسیداسیون در سیستم‌های زیستی تشکیل می‌شوند و باعث پراکسیداسیون مواد از جمله لیپیدها و تشکیل موادی از جمله مالون‌دی‌آلدهید می‌شوند که در نتیجه‌ی آن ساختار غشایی آسیب‌پذیر می‌شود و باعث از بین رفتن سلول می‌شود که در این گونه موارد ضداکساینده‌ها نقش حفاظت کننده دارند. ضداکساینده‌های مصنوعی سنتز شده نیز به هرحال می‌توانند منجر به ایجاد عوارض خاصی در سیستم‌های زیستی شوند، بنابراین تلاش محققان برای کشف و استفاده از ضداکساینده‌های طبیعی افزایش یافته است [۲]. ضداکسایش‌ها، از عوامل اصلی خنثی کننده رادیکال های آزاد می‌باشند که از آسیب اکسایشی به مولکول هدف جلوگیری می‌کند و یا آن را به تاخیر بیاندازد. بنابراین تامین ذخایر ضداکسایشی از منابع طبیعی به منظور کاهش آثار آسیب اکسایشی امر مهمی تلقی می‌شود [۳]. ترکیبات فنلی ازجمله متابولیت‌های ثانوی گیاهان هستند که از هسته‌های آروماتیک و یک یا چند گروه OH ساخته شده‌اند و به فنل‌های ساده، فنولیک اسیدها، کومارین‌ها، فلاونوئیدها، تانن‌های متراکم، لیگنان‌ها و لیگنین‌ها تقسیم می‌شوند. این ترکیبات به دلیل خصوصیات اکسایش کاهش خود می‌توانند به عنوان عوامل کاهنده در پاکسازی اکسیژن یکتایی دخالت کرده و به دلیل ساختار شیمیایی متنوع، تفاوت‌هایی را در فعالیت ضداکسایشی نشان دهند فلاونوئیدها از ترکیبات پلی‌فنلی با وزن مولکولی کم گروه بزرگی از این متابولیت‌های ثانوی هستند که تقریبا در همه گیاهان وجود دارند. تعداد و موقعیت گروه‌های OH– فنلی، فعالیت ضداکسایشی این ترکیبات را تحت تاثیر قرار می‌دهد [٤]. گزارش شده است هندوانه ابوجهل حاوی میزان بالای ترکیبات فنولی، تانن و فلاونوئید است [۵]. با توجه به تاثیر ویژه شرایط محیطی بر متابولیت‌های ثانویه گیاهان، بررسی ترکیبات و خواص ضداکسایشی در هر منطقه ضروری به نظر می‌رسد. از طرفی بهینه‌سازی روش استخراج و حلال‌های مورد استفاده که باعث جداسازی نوع خاصی از ترکیبات شیمایی می‌گردد یک عامل تعیین کننده و تاثیر گذار در اندازه‌گیری فعالیت ضداکسایشی عصاره‌های گیاهی است.

در مطالعه‌ای محتوای ترکیبات فنلی عصاره آلوی (بخارا، طرقبه، شمس و تبریزی) تحت تاثیر حلال‌های مختلف (متانول، اتانول، استون و آب) اندازه‌گیری گردید. نتایج نشان داد در بین حلال‌های مورد استفاده بیشترین میزان استخراج در تمام نمونه‌ها مربوط به متانول و کم ترین میزان مربوط به آب بود [٦].

در پژوهشی دیگر اثر حلال‌های مختلف (آب، استون، اتانول و هگزان) بر راندمان استخراج، محتوای فنولی کل و فعالیت ضد اکسایشی عصاره غلاف نخود فرنگی مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج نشان داد بیشترین میزان ترکیبات فنولی و فعالیت ضد اکسایشی مربوط به عصاره استخراج شده با اتانول بود [۷]

Kumar و همکاران [۸] گزارش کردند عصاره متانولی میوه هندوانه ابوجهل حاوی مقادیر قابل توجه ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی می‌باشد.

پژوهشی که توسط Chekroun و همکاران [۹] روی فعالیت ضداکسایشی و ترکیبات فنولی کل عصاره‌های آبی و بوتانولی میوه هندوانه ابوجهل و ریشه *Bryonia dioica* از تیره کدوئیان در الجزایر انجام گردید، نشان داد که این ۲ جنس حاوی تانن‌ها، فلاونوئیدها، ترپنوئیدها، ساپونین‌ها و کوئینون‌ها بوده و بیشترین مقدار فنل و فلاونوئید کل در عصاره بوتانولی ریشه *B. dioica* بود. جستجو دقیق در منابع داخل کشور نشان می‌دهد تا کنون میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی و خواص ضداکسایشی عصاره متانولی اندام های مختلف هندانه ابوجهل در کرمان [۱۰] و خوزستان [۱۱] بررسی شده است و گزارشی در رابطه با برسی ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی و خواص ضداکسایشی گیاه هندوانه ابوجهل تحت تاثیر حلال های مختلف در منطقه سیستان انجام نشده است. لذادر این تحقیق اثر حلال های مختلف (متانول ۷۰ ٪، استون، هگزان، اتیل استات و کلروفرم) بر میزان ترکیبات فنولی

و فلاونوئیدی و خواص ضداکسایشی قسمت‌های مختلف گیاه هندوانه ابوجهل در منطقه سیستان بررسی شده است.

۲- مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی و حلال‌های مورد استفاده در این تحقیق از شرکت مرک و رادیکال آزاد DPPH از شرکت سیگما خریداری شدند و دارای بالاترین درصد خلوص بودند.

۲-۱- تهیه عصاره

گیاه هندوانه ابوجهل از استان سیستان و بلوچستان شهرستان زابل جمع‌آوری گردید و در هرباریوم دانشگاه زابل برای تایید مورد بررسی قرار گرفت. پس از جمع‌آوری گیاه، قسمت‌های مختلف آن (برگ، پوست میوه، گوشت میوه و دانه) در دمای اتاق خشک گردیده و جهت تهیه عصاره با آسیاب پودر شد. برای تهیه عصاره ۰/۲ گرم از پودر قسمت‌های مختلف گیاه آسیاب شده در ۱۰ میلی لیتر از حلال‌های مختلف (متانول ۷۰ ٪، استون، هگزان، اتیل استات و کلروفرم) قرار داده شد و به مدت ۲٤ ساعت برروی شیکر قرار گرفت، بعد از۲٤ ساعت عصاره به وسیله کاغذ واتمن[1] صاف و تا زمان انجام ازمایش در یخچال با دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

۲-۲- سنجش محتوای ترکیبات فنلی کل

مقادیر ترکیبات فنلی در نمونه‌های عصاره گیاهی با اندکی تغییر توسط روش فولین سیکالتیو اندازه‌گیری گردید [۱۲]. بر طبق این روش، در لوله آزمایش به ۱۰۰ میکرولیتر عصاره، ۵۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیکالتو (رقیق شده با آب مقطر به نسبت ۱ به ۱۰) و ٤۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۷ درصد اضافه و مخلوط شد. بعد از ۳۰ دقیقه نگهداری در دمای محیط آزمایشگاه، جذب نوری آن توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۷٦۵ نانومتر قرائت شد. مقادیر ترکیبات فنلی در نمونه‌های عصاره با استفاده از منحنی استاندارد بر حسب میلی گرم اسید گالیک در گرم عصاره بیان گردید.

۲-۳- سنجش محتوای فلاونوئیدی کل

میزان کل فلاونوئیدها به روش رنگ سنجی آلومینیوم کلرید اندازه‌گیری خواهد شد. در این روش ۰/۵ میلی لیتر از محلول عصاره با ۱/۵ میلی لیتر اتانول ۹۵ درصد، ۰/۱ میلی لیتر آلومینیوم کلرید ۱۰ درصد، ۰/۱ میلی لیتر استات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی لیتر آب مقطر مخلوط شد. بعد از نگه‌داری نمونه‌ها در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه، جذب مخلوط در طول موج ٤۱۵ نانومتر خوانده شد. به منظور رسم منحنی استاندارد از کوئرستین استفاده شد [۱۳].

٤-۲- ارزیابی فعالیت ضداکسایشی به وسیله دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH)

توانایی مهار رادیکال آزاد به روش Shimada و همکاران (۱۹۹۲) انجام شد [۱٤]. برای این منظور، محلول DPPH ۱میلی مولار در حلال متانول آماده گردید. سپس ۲۵۰ میکرولیتر از آن با ۷۵۰ میکرولیتر از عصاره مخلوط شده و به شدت هم زده شد. لوله‌های آزمایش به مدت ۳۰ دقیقه در محل تاریک قرار گرفت. بعد از این مدت میزان جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد.

۲-۵- تعیین فعالیت ضداکسایشی با روش FRAP

فعالیت ضداکسایشی احیاکنندگی آهن بر اساس روش Benzie انجام شد [۱۵]. طبق این روش به عصاره بدست آمده ۳ میلی لیتر معرف FRAP اضافه گردید. مخلوط حاصل ورتکس و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. جذب محلول‌ها در ۵۹۳ نانومتر نسبت به شاهد خوانده شد. به منظور رسم منحنی استاندارد از $FeSo_4.7H_2O$ استفاده شد.

میزان جمع‌آوری رادیکال هیدروژن پراکسید

برای مشخص کردن قدرت جمع‌آوری رادیکال هیدروژن پراکسید توسط عصاره‌های هندوانه ابوجهل از روش Ruch و همکاران (۱۹۸۹) با کمی تغییر استفاده شد [۱٦]. ۰/۱ میلی لیتر عصاره با ۳/٤ میلی لیتر محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار (pH= ۷/٤) و ٦۰۰ میکرولیتر از محلول ٤۳ میلی مولار هیدروژن پراکسید (تهیه شده در همان بافر) مخلوط شد. غلظت هیدروژن پراکسید در ۲۳۰ نانومتر اندازه گیری شد.

٦-۲- تجزیه و تحلیل داده‌ها

همه آزمایش ها با ۳ تکرار از حداقل ۳ نمونه مستقل انجام گرفت. مقایسه میانگین ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۸ و آزمون توکی برای تعیین معنی‌دار بودن تفات ها در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

۳- نتایج

۳-۱- محتوای فنل کل

از پنج حلال (متانول ۷۰ ٪، استون، هگزان، اتیل استات و

1. whatman

کلروفرم) جهت استخراج ترکیبات فنلی برگ و بخش‌های مختلف میوه هندوانه ابوجهل استفاده گردید. بیشترین محتوای فنل کل در عصاره متانولی ۷۰٪ برگ به میزان ۲۷/۰۱ میلی گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک عصاره مشاهده گردید، در حالی که کمترین میزان ترکیبات فنلی در عصاره کلروفرمی پوست میوه (۰/۸۹ میلی گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک) مشاهده شد (شکل ۱) .

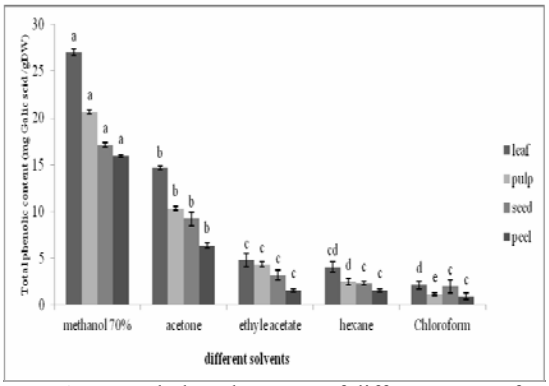

Fig 1 Total phenol content of different parts of *Citrullus colocynths* (leaf, seed, fruit pulp and fruit peel) by different solvent (Methanol 70%, Acetone, Hexane, Chloroform, Ethyl acetate). Different values with the same letter are not significantly different in different solvents at p<0.05.

میزان ترکیبات فنلی در عصاره حلال های هگزان و کلروفرم تفاوت معنی‌داری نداشت.

در شکل ۲ محتوای ترکیبات فلاونوئیدی استخراج شده از بخش‌های مختلف گیاه هندوانه ابوجهل با استفاده از پنج حلال مختلف نشان داده شده است. نتایج نشان داد عصاره‌های متانولی ۷۰ ٪ و استونی برگ بالاترین محتوای فلاونوئیدی را دارا بودند. به طور کلی کمترین میزان فلاونوئید استخراج شده در پوست میوه هندوانه ابوجهل مشاهده شد. میزان فلاونوئیدها در عصاره حلال های هگزان و کلروفرم تفاوت معنی‌داری نداشت.

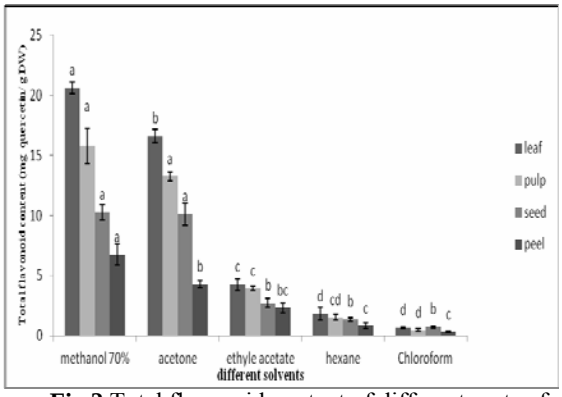

Fig 2 Total flavonoid content of different parts of *Citrullus colocynthis* (leaf, seed, fruit pulp and fruit peel) by different solvent (Methanol 70%, Acetone, Hexane, Chloroform, Ethyl acetate). Different values with the same letter are not significantly different in different solvents at p<0.05.

۲-۳- ارزیابی خاصیت ضداکسایشی با روش DPPH

نتایج خاصیت ضداکسایشی نشان داد عصاره متانولی ۷۰٪ و استونی برگ گیاه هندوانه ابوجهل دارای بیشترین فعالیت ضداکسایشی بودند (جدول ۱). معمولا جهت مقایسه فعالیت ضداکسایشی عصاره‌های مختلف از فاکتوری تحت عنوان IC_{50} استفاده می شود.هرچه این غلظت کمتر باشد، نشان دهنده این است که عصاره مورد نظر فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری دارد. در این مطالعه کمترین میزان IC_{50} را عصاره متانولی دارا بود (جدول ۲).

Table 1 Effect of different solvents on scavenging activity of DPPH radicals (٪)

Sample	Concentration mg /ml	methanol 70%	acetone	ethyle acetate	hexane	Chloroform
leaf	0.1	51.31±3.04 cde	44.45±2.32 ef	20.87±1.87hij	8.39±1.22klm	2.49±0.62m
	0.4	60.2.24abc	50.61±1.53de	26.20±1.08hi	14.38±1.64jk	4.59±1.24l
	0.8	63.33±2.91ab	50.81±2.41bcd	29.17±1.13gh	17.81±1.06ijk	5.89±1.09im
	1.2	68.83±1.99a	60.67±2.31abc	36.49±1.91fg	21.21±1.07hij	7.82±0.39lm
pulp	0.1	48.25±1.05bcd	39.89±1.73de	17.48±1.27fgh	6.85±1.60ijk	3.06±0.69jk
	0.4	56.61±0.89ab	44.02±2.01cd	21.57±1.22fg	10.65±0.64hik	3.06±0.69jk
	0.8	61.27±0.76a	52.61±2.14abc	24.27±0.95f	14.51±1.24ghi	4.76±0.61jk
	1.2	61.57±0.61a	55.97±1.07ab	34.56±1.51e	16.74±1.40fgh	4.82±0.79jk
seed	0.1	44.32±2.1bcd	35.09±1.61de	16.08±1.76gh	3.89±0.52ij	0.66±0.29j
	0.4	50.44±0.78abc	40.59±1.05cd	19.14±1.91fg	6.56±1.32hij	2.43±0.53j
	0.8	52.78±0.61ab	47.6±1.58abc	22.11±1.22fg	13.75±1.30ghi	3.62±0.93ij
	1.2	55.87±1.93a	51.84±0.97ab	28.33±0.89ef	15.08±0.92gh	5.46±1.17ij
peel	0.1	38.26±1.66c	31.13±1.18d	13.95±0.12fg	2.83±0.58ij	0.66±0.23ij
	0.4	39.09±1.15bc	38.82±2.21c	16.68±0.78efg	3.92±0.61ij	1.46±0.26ij
	0.8	45.18±2.10ab	40.32±0.71c	19.88±1.17ef	7.35±0.65hi	1.73±0.42ij
	1.2	5.08±0.74a	46.65±1.68a	22.57±1.91e	11.85±0.66gh	3.26±0.60ij

Different values with the same letter are not significantly different at p<0.05.

Table 2 Effect of different solvents on IC50 values (mg/ml)

	methanol 70%	acetone	ethyle acetate	hexane	Chloroform	Ascorbic acid (mg/ml)
leaf	0.12	0.42	2.24	3.70	10.11	
pulp	0.03	0.74	2.36	4.83	13.51	
seed	0.53	1.02	3.26	4.28	6.1	
peel	1.16	1.46	5.06	5.86	12.34	0.34

۳-۳- تعیین فعالیت ضداکسایشی با روش FRAP

نتایج حاصل از بررسی فعالیت ضداکسایشی عصاره‌های مختلف با روش FRAP در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که عصاره متانولی ۷۰٪ برگ نسبت به عصاره‌های دیگر فعال‌تر بوده و فعالیت ضداکسایشی بالایی را نشان داد. عصاره استونی نیز فعایت ضداکسایشی خوبی نسبت به عصارهای‌های اتیل استات، هگزان و کلروفرم داشت. عصاره‌های اتیل استات، هگزان و کلروفرم فعالیت مشابهی نشان دادند.

Table 3 Antioxidant activity of the different solvents using FRAP assay (Fe(II)/mg extract)

sample	methanol 70%	acetone	ethyle acetate	hexane	Chloroform
leaf	68.58 ± 1.54 a	50.11 ± 0.76 b	28.32 ±1.03C	13.19 ±1 d	9.84±0.55d
pulp	55.17 ± 0.28 a	36.49 ± 0.81 b	27.05 ± 0.42 b	12.58 ±1.46d	3.38 ± 1.10 c
seed	36.30 ± 0.87 a	33.51 ±0.6 ab	21.95 ± 1.10 C	8.89± 0.70 d	7.17 ± 0.39 d
peel	33.37 ± 0.66 a	27.55 ±0.57 b	16.34± 0.23 C	6.21 ± 0.44 d	4.32 ± 0.13 d

Different values with the same letter are not significantly different at p<0.05.

۳-٤- جمع‌آوری رادیکال هیدروژن پراکسید

پراکسیدهیدروژن یک‌اکسنده ضعیفی است که می‌تواند برخی آنزیم‌ها را به طور مستقیم از طریق اکسیداسیون گروه‌های تیول (-SH) غیر فعال کنند. همچنین می‌تواند به سرعت از غشاء سلول عبور کند وارد سلول شود. پراکسید هیدروژن احتمالا با یون‌های به شکل رادیکال هیدروکسیل واکنش می‌دهد که ممکن است منشاء بسیاری از اثرات سمی آن باشد [۱۷]. اندازه‌گیری میزان جمع‌آوری رادیکال هیدروژن پراکسید نشان داد میزان این فاکتور در حلال‌های مختلف تفاوت قابل توجهی دارد. به طوری‌که عصاره متانولی ۷۰٪ برگ دارای بالاترین میزان جمع‌آوری وعصاره کلروفرمی گوشت دارای کمترین میزان جمع‌آوری رادیکال هیدروژن پراکسید بود (جدول٤).

Table 3 Effect of different solvents on scavenging activity of hydrogen peroxide (H2O2)

sample	methanol 70%	acetone	ethyle acetate	hexane	Chloroform
leaf	3.43±0.57a	1.92±0.17b	0.50±0.12c	0.28±0.04c	0.24±0.02c
pulp	2.80±0.28a	1.29±0.27ab	0.39±0.09c	0.22±0.05c	0.2±0.07c
seed	2.27±0.05a	1.84±0.21b	0.35±0.09a	0.20±0.04c	0.13±0.04c
peel	1.17±0.03a	1.04±0.02a	0.24±0.9c	0.15±0.06c	0.10±0.04c

Different values with the same letter are not significantly different at p <0.05.

٤- بحث

بررسی منابع داخل کشور نشان می‌دهد مطالعات محدودی در زمینه خواص ضداکسایشی گیاه هندوانه ابوجهل در ایران انجام شده است. میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی و خواص ضداکسایشی عصاره متانولی ریشه، برگ، و گوشت میوه هندانه ابوجهل در منطقه کرمان بررسی شده است [۱۰]. مطالعات آنها نشان داد عصاره متانولی برگ دارای بیشترین میزان ترکیبات فنولی و خواص ضداکسایشی بود. در منطقه خوزستان میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی و خواص ضداکسایشی در عصاره متانولی برگ، ساقه و میوه هندانه ابوجهل بررسی شده است نتایج آنها نشان داد عصاره متانولی ساقه دارای بیشترین میزان ترکیبات فنولی و خواص ضداکسایشی بود [۱۱].

مطالعه Marzouk و همکاران (۲۰۱۰) روی فعالیت ضداکسایشی و قابلیت پاکسازی رادیکال‌های آزاد هندوانه ابوجهل نشان داد که در میان عصاره‌های اندام‌های مختلف گیاه ابوجهل (ساقه، برگ، ریشه، میوه، بذر)، عصاره بذر نسبت به عصاره‌های دیگر، دارای بیشترین قابلیت پاکسازی رادیکال آزاد می‌باشد [۱۸]. در پژوهشی که توسط Abdullah و همکاران (۲۰۱۳) روی میزان ترکیبات فنولی و فعالیت

ضداکسایشی عصاره‌های اتانولی و هگزانی ریشه، برگ و میوه گیاه هندوانه ابوجهل در پاکستان انجام گردید، مشاهده شد که مقدار فنول کل و ترکیبات فلاونوئیدی کل به ترتیب در عصاره‌های اتانولی ریشه، برگ و میوه بیشترین مقدار است [۱۹]. در تحقیق حاضر، نتایج نشان داد عصاره متانولی ۷۰ ٪ و استونی برگ دارای بیشترین مقدار ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی بوده و میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی اندازه‌گیری شده در عصاره ها به ترتیب زیر می‌باشد: متانول ۷۰٪> استون> اتیل استات> هگزان> کلروفرم. بر این اساس می‌توان نتیجه‌گیری کرد که میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی عصاره های مذکور با افزایش قطبیت حلال افزایش می‌یابد. محققین تفاوت‌های مشاهده شده بین عصاره‌های مختلف را به تفاوت در قطبیت حلال‌های مورد استفاده مربوط می‌دانند. به طورکلی حلالیت پلی فنول‌ها به حضور و موقعیت گروه‌های هیدروکسیل و اندازه و طول زنجیره هیدروکربنی بستگی دارد. ترکیبات فنلی اغلب در حلال هایی که دارای قطبیت بیشتر هستند استخراج می‌شوند [۲۰]. تولید و تجمع ترکیبات در بخش های مختلف یک گیاه متفاوت است و به نوبه خود فعالیت ضداکسایشی و خواص بیولوژیکی عصاره گیاه را تحت تاثیر قرار می‌دهد [۲۱]. فعالیت ضداکسایشی نمونه‌ها با مقدار ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی کل رابطه مستقیم نشان داد به طوری که عصاره متانولی ۷۰٪ و استونی برگ با بالاترین میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی دارای بالاترین خاصیت ضداکسایشی در هر سه روش FRAP و DPPH و جمع‌آوری رادیکال هیدروژن پراکسید است.

۵- نتیجه گیری

با توجه به خواص ضداکسایشی گیاه هندوانه ابوجهل، بهینه سازی استخراج ترکیبات فنولی و فعالیت ضداکسایشی این گیاه ضروری به نظر می‌رسد. لذا در این تحقیق تاثیر حلال‌های مختلف بر استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی و فعالیت ضداکسایشی قسمت‌های مختلف گیاه هندوانه ابوجهل در منطقه سیستان انجام شد. در تحقیق حاضر، نتایج نشان داد عصاره متانولی ۷۰ ٪ برگ دارای بیشترین مقدار ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی بود. بیشترین فعالیت ضداکسایشی نیز در عصاره متانولی برگ مشاهده شد.

٦- تشکر و قدردانی

مقاله حاضر، با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه زابل انجام شده است. کد طرح: ۳-۹۵

۷- منابع

[1] Konoshima, T., Takasaki, M., Kozuka, M., Nagao, T., Okabe, H. and Irino, N. (1995). Inhibitory effects of cucurbitane triterpenoids on Epstein-Barr virus activation and two-stage carcinogenesis of skin tumor. II. Biological and pharmaceutical bulletin, 18(2): 284-287.

[2] Senevirathne, M., Kim, S.-H., Siriwardhana, N., Ha, J.-H., Lee, K.-W. and Jeon, Y.-J. (2006). Antioxidant potential of ecklonia cavaon reactive oxygen species scavenging, metal chelating, reducing power and lipid peroxidation inhibition. Food Science and Technology International, 12(1): 27-38.

[3] Kamkar, A., Shariatifar, N., Jamshidi, A. H. and Mohammadian, M. (2010). Study of Antioxidant Functional of the Water, Methanol, and Ethanol Extracts of Endemic *Cuminum cyminum* L.and *Cardaria draba* Lin the in-vitro Systems. Quarterly of Horizon of Medical Sciences Journal, 3(16): 37-45.

[4] Karaman, S., Tutem, E., Bas-Kan, K. S. and Apak, R. (2010). Comparison of total antioxidant capacity and phenolic composition of some apple juices with combined HPLC-CUPRAC assay. Food Chemistry, 120: 1201-9.

[5] Gurudeeban, S., Rajamanickam, E., Ramanathan, T. and Satyavani, K. (2010). Antimicrobial activity of *Citrullus colocynthis* in Gulf of Mannar. International Journal of Current Research, 2: 78-81.

[6] Bahramiyan, F., Ghiassi Tarzi, B., Yaghmaei, S. and Bahonar, A. (2012). Extraction of plum phenolic Compounds Using Different solvents, The Antimicrobial Effect of the Extracts on the growth of *E. coli* and *S. aureus*. Food Technology & Nutrition, 1(9): 73-80.

[7] Gohorbani, M., Ganjloo, A. and Bimakr, M. (2017). Evaluation the effect of different solvents on total phenolic content and antioxidant activity of pea (*Pisum sativum*

L.) pod Extract. Journal of Food Science and Technology, 64(14):83-92.

[8] Kumar, S., Kumar, D., Jusha, M., Saroha, K., Singh, N., and Vashishta, B. (2008). Antioxidant and free radical scavenging potential *of Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. methanolic fruit extract. Acta Pharmaceutica, *58* (2), 215-220.

[9] Chekroun, E., Benariba, N., Adida, H., Bechiri, A., Azzi, R. and Djaziri, R**.** (2015). Antioxidant activity and phytochemical screening of two Cucurbitaceae: *Citrullus colocynthis* fruits and *Bryonia dioica* roots. Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 5 (8): 632-637.

[10] Mohadjerani, M. and Saljoghi, S. (2014). Evaluation of antioxidant activity of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. extracts and their effect on urease activity. Ethno-Pharmaceutical products, 1 (1):53.

[11] Rashedi, H., Amiri, H. Gharzi, A. (2014). Evaluation of antioxidant properties and total phenolic and flavonoids content of C*itrullus colocynthis(L.) Schrad* in khozestan. The second Conference medicinal plants and agriculture.

[12] McDonald, S., Prenzler, P. D., Autolovich, M., and Robards, K. (2001). Phenolic content and antioxidant activity of *olive* extracts. Food Chemistry, 73:73-84.

[13] Chang, C., Yang, M., Wen, H. and Chern, J. (2002) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of Food and Drug Analysis,10: 178-182.

[14] Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K. and Nakamura, T. (1992). Antioxidative properties of xanthin on auto oxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. Agricultural and Food Chemistry, 40: 945-948.

[15] Benzie, I.F.F and Strain, J.J. (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods Enzymology, 299:15-27.

[16] Ruch, RJ., Cheng, S.J and Klainig, J. E. (1989). Prevention of cytotoxicity and inhibition of intracellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. Carcinogen, 10: 1003-1008.

[17] Miller, M.J., Sadowska-Krowicka, H., Chotinaruemol, S., Kakkis, J.L. and Clark, D.A. (1993). Amelioration of chronic ileitis by nitric oxide synthase inhibition. Journal Pharmacology and Experimental Therapeutic, 264(1):11-16.

[18] Marzouk, Z., Marzouk, B., Mahjoub, M. A. A, Haloui, E., Mighri, Z., Aouni, M., and Fenina, N. (2010). Screening of the antioxidant and the free radical scavenging potential of Tunisian *Citrullus colocynthis* Schrad. from Mednine. Journal of Food Agricuture and Environment, 8 (2): 261 - 265.

[19] Abdullah, I. H., Ashfaq, A, Edward, J. J., Fiaz ud din, A., Hassaan, A. R., Munavvar, Z. A. S. and Shahzad, A. S. Ch. (2013). Phenolic profile and antioxidant activity of various extracts from *Citrullus colocynthis* (L.) from the Pakistani flora. Industrial Crops and Products, 42: 416– 422.

[20] Jaffery, E., Brown, A., Kurilich, A., Keek, A., Matusheski, N., Klein, B. (2003). Variation in content of bioactive components in broccoli. Journal Food Compos Anal,16:323–30.

[21] Rafat, A., Philip, K. and Muniandy, S. (2010). Antioxidant potential and content of phenolic com-pounds in ethanolic extracts of selected parts of *Andrographis paniculata*. Journal of Medicinal Plants Research,4:197–202.

.

Effect of different solvents on extraction of phenolic and flavonoid compounds and antioxidant activity of *Citrullus colocynthis*

Esmaeilzadeh Bahabadi, S. [1*], Yosefzaei, F. [2]

1. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Zabol, Zabol, Iran
2. MSc, Department of Biology, Faculty of science, Urmia University, Urmia, Iran

(Received: 2016/11/22 Accepted:2017/11/22)

Plants are rich sources of phenolic compounds which are important sources of antioxidants. Due to the antioxidant properties of *Citrullus colocynthis*, optimizing the extraction of phenolic compounds and antioxidant activity is important. The objective of this research was to study effect of different solvents (methanol, acetone, ethyl acetate, hexane and chloroform) in the extraction efficiency of phenolic and flavonoid compounds from different parts (leaf, seed, fruit pulp and fruit peel) of *C. colocynthis*. Phenolic and flavonoid contents were measured by Folin–Ciocalteu and Aluminum chloride methods respectively. Antioxidant activity of extracts was determined using Diphenyl Picrylhydrazyl (DPPH) and Hydrogen peroxide (H2O2) and (FRAP) assays. According to Tukey test at 5% level**,** results showed the solvent used for extraction has significant effect on the phenolic, flavonoid content and antioxidant activity. The methanol extract of *C. colocynthis* leaf, showed the highest phenolic content (27.01 mg/g DW). The extraction of fruit pulp with chloroform yielded the least amount of phenolic compounds (1.11 mg/g DW). Significant amount of phenolic and flavonoid content was observed in leaf methanol and acetone extract. Methanol and acetone extract had highest antioxidant activity in all antioxidant assays. Overall, the results show that methanol and acetone, are more effective solvents for phenolic compounds extraction. There is a positive correlation between the amount of phenolic compounds and flavonoids with antioxidant activity. Base on the results of this study, *C. colocynthis* leaves due to the high levels of phenolic compounds, suggest as supplement rich in natural antioxidants.

Keywords: Extraction, Antioxidant, Phenolic compounds, Solvent, *Citrullus colocynthis*

*Corresponding Author E-Mail Address: esmaeilzadeh@uoz.ac.ir