Archive of SID

مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 12:59 IRDT on Sunday June 20th 2021

بررسی اثر حلال و روش استخراج بر محتوی فیتوشیمیایی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ مورینگا الیفرا

عباس عسگری کفرانی[۱*]، محمد فضیلتی[۲]، حبیب اله ناظم[۲]

۱- دکترا بیوشیمی دانشگاه پیام نور مرکز اصفهان

۲- استاد، عضو هیئت علمی دانشگاه پیام نور مرکز اصفهان

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۹۷ /۱۱/۰۱

تاریخ پذیرش: ۹۹/۰٤/۰۱

کلمات کلیدی:

مورینگا الیفرا،

فنل،

فلاونوئید،

DPPH،

فعالیت آنتی اکسیدانی.

DOI: 10.29252/fsct.18.05.12

* مسئول مکاتبات:

abbasasgari98@yahoo.com

چکیده

گیاهان منبع غنی از ترکیبات فنلی هستند که مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به شمار می‌روند. هدف از این تحقیق بررسی تأثیر روش‌های استخراج و اثرحلال های مختلف بر راندمان استخراج، محتوی فنل کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره برگ گیاه مورینگا الیفرا بود. بدین منظور برگ‌ها بعد از خشکاندن آسیاب شد و عصاره با استفاده از حلال‌های آب مقطر، استون و متانول با روش‌های خیساندن، سوکسله و امواج غیرمستقیم اولتراسونیک با فرکانس ۷۰ کیلوهرتز استخراج شد. محتوی کل ترکیبات فنلی با روش فولین –سیوکالتیو و محتوی تام ترکیبات فلاونوئیدی با روش رنگ سنجی کلرید آلومینیوم اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها از روش مهار رادیکال‌های آزاد ۲ و ۲ دی فنیل ۱-پیکریل هیدرازیل (*DPPH استفاده*) شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با اسید آسکوربیک مقایسه گردید. بالاترین راندمان استخراج مربوط به عصاره استحصال شده با حلال استون و روش استخراج سوکسله (۰.۳٤±۲٤.٤۰ درصد) بود. متانول در روش استخراج سوکسله بالاترین تاثیر را بر محتوی فنل کل (۱.۳۵±۲٤.۷۹ میلی گرم گالیک اسید در گرم عصاره خشک) و فلاونوئید کل (۱.٤۵±۸۱.۱٤ میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره خشک) نشان داد. در همه نمونه‌ها با افزایش غلظت عصاره، میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH افزایش یافت و بالاترین قدرت حذف رادیکال‌های آزاد در عصاره متانولی حاصل از روش استخراج سوکسله (۰.٦۵±٤۹.۹۷۵=$IC_{۵۰}$ میکروگرم در میلی‌لیتر) مشاهده شد. در نهایت می توان نتیجه گرفت متانول بهترین حلال و استخراج با سوکسله بهترین روش برای استخراج ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی از برگ مورینگا الیفرا می باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 12:59 IRDT on Sunday June 20th 2021

۱- مقدمه

امروزه بسیاری از متخصصین تغذیه برای تأمین آنتی‌اکسیدان‌های موردنیاز بدن، مصرف گیاهان، میوه‌ها و سبزی‌ها را توصیه می‌نمایند، زیرا معمولاً مصرف آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی عوارض جانبی کمتری داشته و درمان بهتری ایجاد می‌نمایند [۱]. نظر به این‌که گیاهان یکی از منابع مهم آنتی‌اکسیدان‌ها می‌باشند، تحقیقات در این زمینه رو به افزایش است. گیاهانی که غنی از ترکیبات آنتی‌اکسیدان هستند می‌توانند باعث حفاظت سلول‌ها از آسیب‌های اکسیداتیو شوند [۲]. آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی باعث افزایش قدرت آنتی‌اکسیدان‌های پلاسما و کاهش ابتلا به بعضی بیماری‌ها مانند سرطان، بیمارهای قلبی و سکته مغزی می‌شوند. متابولیت های ثانویه مشتق از گیاهان مانند فنول و فلاونوئید ها دارای پتانسیل قوی برای پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد می‌باشند که در قسمت‌های مختلف گیاهی مانند برگ، میوه، دانه، ریشه و پوست وجود دارند [۳]. با توجه به شیوع بالای بیماری‌های مزمن و فرسایشی منطقی است که برای تأمین آنتی‌اکسیدان‌های موردنیاز بدن از گیاهان استفاده شود. به‌خصوص گیاهانی که فنول و فلاونوئید تام بالایی داشته باشند [٤]. فنل ها از ترکیبات بسیار مهم گیاهی هستند. این ترکیبات به دلیل داشتن گروه‌های هیدروکسیل توانایی حذف رادیکال‌های آزاد را دارند [۵]. ترکیبات فنلی موجود در گیاهان توانایی حذف رادیکال‌های آزاد و کلات کردن یونهای فلزی را دارند. همچنین می توانند در تنظیم بیان ژنها شرکت کنند [٦]. به نظر می‌رسد که رابطه نزدیکی میان خاصیت آنتی‌اکسیدانی با مقادیر ترکیبات فنلی وجود داشته باشد [۷]. یافتن آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به‌ویژه از منابع گیاهی و استفاده از آن‌ها در پزشکی، کشاورزی و صنایع دارویی بسیار مطلوب است تا علاوه برداشتن اثرات بیولوژیک وسیع، احتمال ایجاد اثرات جانبی و مسمومیت با آن‌ها به‌خصوص در دوزهای کنترل‌شده کاهش یابد [۸]. در سال‌های اخیر مطالعات وسیعی بر روی گیاهان عالی و عطرمایه‌ها و عصاره‌های حاصل از آن‌ها برای یافتن ترکیبات آنتی‌اکسیدان انجام شده است [۹]. میزان متابولیت های ثانویهٔ گیاهی مانند فنول و فلاونوئید تام و ویژگی آنتی‌اکسیدانی آن‌ها به عوامل متعددی از قبیل آب‌وهوا، گونه، روش استخراج و روش اندازه‌گیری آنتی‌اکسیدان بستگی دارد [۲]. این تغییرپذیری به تفاوت در پیوندهای درونی این ترکیبات و به‌خصوص به قطبیت مولکول‌های تشکیل‌دهنده حلال بستگی دارد [۱۰]. ازاین‌رو معرفی یک حلال با غلظت مشخص که دارای حداکثر عملکرد در استخراج ترکیبات فنلی بوده و بتواند بیشترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی را در مورد گیاه معینی نشان دهد کارساده ای نخواهد بود.

گیاه مورینگا الیفرا یک درخت سریع الرشد با بلندی حدود ۱۰ متر از خانواده *Moringaceae* می‌باشد. این گیاه بومی کشور هندوستان می‌باشد و به‌طور وسیع در مناطق گرمسیر همچون شمال شرقی پاکستان، شمال شرقی بنگلادش، سریلانکا، غرب آسیا، غرب و شرق آفریقا، جنوب فلوریدا، مرکز و جنوب آمریکا از مکزیک و تا پرو، برزیل و پاراگوئه پراکنش دارد. این گیاه در همه خاک‌ها رشد می‌کند ولی بهترین رشد در شمال و جنوب هند مشاهده شده است [۱۱]. گونه‌ای از این گیاه در استان‌های جنوبی ایران شامل سیستان و بلوچستان و بوشهر رشد می‌کنند [۱۲]. تقریباً تمامی قسمت‌های گیاه خواص تغذیه‌ای فراوان داشته و عصاره استخراج شده از قسمت‌های مختلف گیاه خاصیت دارویی دارد. این مطلب توسط افراد مصرف‌کننده این گیاه و انجمن‌های علمی تائید شده است [۱۳]. خاصیت ضد درد [١٤]، ضد سرطان [١٥]، ضد انعقاد [١٦]، ضد قارچ [١٧]، ضدالتهاب [١٨]، این گیاه تاکنون به اثبات رسیده است. مطالعات متعددی در خصوص خواص سم‌زدایی و آنتی‌اکسیدانی گیاه مورینگا الیفرا انجام شده است [١٩]. امروزه تحقیقات وسیعی بر روی عصار ه های گیاهی صورت گرفته تا به نمونه‌هایی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا دست یابند. چندین روش برای تهیه عصاره گیاهی وجود دارد و هر روش در مقایسه با دیگر روش‌ها از محدودیت‌ها و مزایای منحصربه‌فرد برخوردار می‌باشد. در سال‌های اخیر توجه فراوانی به ارائه روش‌های جدید استخراج شده است، به‌گونه‌ای که بیش‌ترین اجزای اصلی، در کوتاه‌ترین زمان ممکن با کم‌ترین قیمت به دست آید [۲۰]. یکی از روش های رایج استخراج ترکیبات آنتی اکسیدان از گیاهان، استفاده از حلال می باشد. بازده استخراج و میزان فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره استخراج شده به میزان زیادی متاثر از نوع حلال می باشد. حلال های آلی با نقطه جوش پایین مثل متانول و استون

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 12:59 IRDT on Sunday June 20th 2021

و همچنین آب به دلیل ارزان بودن و سهولت دسترسی به طور عمده برای استخراج ترکیبات زیست فعال از منابع گیاهی مورد استفاده قرار می گیرند [۲۱]. تحقیق در منابع نشان می‌دهد که تاکنون پژوهش مبنی بر بررسی و شناسایی روش‌های استخراج ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی از گیاه مورینگا الیفرا در ایران انجام نشده است. با توجه به خواص آنتی‌اکسیدانی این گیاه و همچنین رویش آن در اقلیم‌های گرمسیر ایران ضرورت دارد تا روش‌های استخراج عصاره از این گیاه مورد بررسی قرار گیرد. این تحقیق به‌منظور بررسی تأثیر روش استخراج و نوع حلال بر میزان استخراج ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی و همچنین قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ گیاه مورینگا الیفرا انجام شد.

۲-مواد و روش‌ها

۲-۱-مواد

مواد شیمیایی موردنیاز شامل استاندارد کوئرستین و اسید گالیک، متانول، استون، معرف فولین سیوکالتیو، کربنات سدیم، کلرید آلومینیوم، ۲ و ۲ دی فنیل- ۱ پیکریل هیدرازیل (DPPH) از شرکت شیمی آزمون خریداری شد.

۲-۲- آماده سازی نمونه و استخراج عصاره

برگ گیاه مورینگا الیفرا از رویشگاه‌های طبیعی آن واقع در استان بوشهر و در اواخر اردیبهشت سال ۱۳۹۷ جمع‌آوری و بعد از خشک‌کردن در سایه به محل آزمایشگاه تحصیلات تکمیلی دانشگاه پیام نور مرکز اصفهان جهت عصاره گیری منتقل و توسط آسیاب برقی پودر گردید.

۲-۲-۱-تهیه عصاره

به منظور تهیه عصاره با روش خیساندن، ۱۰ گرم از پودر برگ خشک گیاه به ترتیب با ۵۰ میلی‌لیتر متانول، استون و آب مقطر مخلوط شد. مجموعه به مدت ۲٤ ساعت رها گردید. روز بعد حلال جدا و مجدداً حلال جدید اضافه شد. این عمل برای سه بار تکرار شد. جهت تهیه عصاره با روش اولتراسوند، از امواج غیرمستقیم اولتراسونیک با فرکانس ۷۰ کیلوهرتز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت استفاده شد. ۱۰ گرم برگ پودر شده گیاه به همراه حلال‌های متانول، استون و آب مقطردر بشر قرار داده شد. جهت جلوگیری از تقطیر روی بشرها با فویل آلومینیوم پوشانده شد. مجموعه به مدت یک ساعت در حمام اولتراسونیک قرار گرفت. جهت تهیه عصاره با روش استخراج مداوم (سوکسله) ۱۰ گرم برگ پودر شده گیاه در کاغذ صافی واتمن قرار داده شد و سپس در دستگاه سوکسله قرار گرفت. عمل استخراج با حلال‌های متانول، استون و آب مقطر به مدت ۲٤ ساعت ادامه پیدا کرد. در پایان هریک از روشهای استخراج، مجموعه حلال توسط دستگاه تبخیرکننده چرخان (روتاری) در دمای ۵۰°C حذف گردید [۲۲،۲۳،۲٤]. عصاره حاصل تا زمان استفاده، درون بطری دربسته در دمای ٤°C نگهداری شد.

۲-۳-اندازه گیری راندمان عصاره گیری

راندمان عصاره گیری با حلال های مختلف در روشهای مختلف استخراج از طریق معادله (۱) محاسبه گردید [۲۵].

معادله (۱)

$$\text{درصد عملکرد عصاره گیری} = M_2 / M_1 \times 100$$

که در آن M_1 وزن نمونه آسیاب شده مورد استفاده جهت استخراج و M_2 وزن عصاره خشک استخراج شده می باشد. میزان رطوبت هر دو نمونه یکسان می باشد.

۲-٤-تعیین محتوی فنول کل

به منظور تعیین محتوی فنل کل، ۲۰ میکرو لیتر از هر عصاره با ۱.۱٦ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱ میلی‌لیتر معرف فولین مخلوط شد. بعد از ۸ دقیقه ۳۵۰ میکرو لیتر محلول کربنات سدیم (W/v٪۲۰) اضافه شد. مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ٤۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در ادامه میزان جذب مخلوط در طول‌موج ۷٦۵ نانومتر با استفاده از اسپکتروفوتومتر مدل شیمادزو اندازه‌گیری شد. برای رسم منحنی استاندارد از گالیک اسید استفاده شد. بدین منظور محلول پایه‌ای از اسید گالیک با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه گردید. از این محلول پایه، غلظت‌های مختلف (۱۰،۲۰،۳۰... میکروگرم بر میلی‌لیتر) آماده گردید و پس از انجام مراحل مختلف مطابق روش ذکرشده در بالا مقدار جذب نمونه‌ها خوانده شد. پس از رسم منحنی کالیبراسیون اسید گالیک (شکل ۱) میزان ترکیبات فنلی با استفاده از معادله به‌دست‌آمده از منحنی (معادله ۲) بر مبنای اسید گالیک و به صورت میلی‌گرم در گرم عصاره بیان گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 12:59 IRDT on Sunday June 20th 2021

(معادله ۲)

$y=۰.۰۰۶۱x +۰.۰۰۱۹$ $R2= ۰.۹۹۱۲$

که در این معادله X میزان جذب نمونه و y مقدار معادل اسید گالیک می‌باشد (Mg/gr).

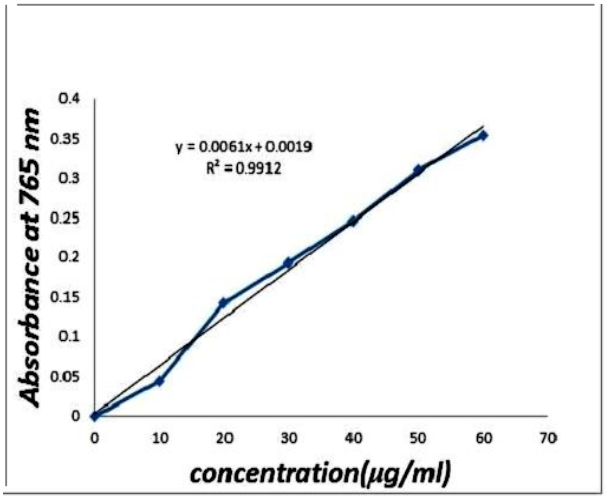

Fig 1: Standard calibration curve of Gallic acid for the determination of total phenolic content

۲-۵-تعیین محتوی فلاونوئید کل

جهت تعیین محتوی فلاونوئید عصاره برگ مورینگا الیفرا، ۰.۵ میلی‌لیتر محلول ALCL3(۲ درصد) تهیه‌شده در حلال متانول به ۰.۵ میلی‌لیتر از هریک از عصاره‌ها اضافه شد. مخلوط در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت. سپس جذب مخلوط به‌وسیله اسپکتروفوتومتر مدل شیمادزو در طول‌موج ٤١٧ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای رسم منحنی استاندارد از کوئرستین استفاده شد. بدین منظور محلول پایه‌ای از کوئرستین با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه گردید. از این محلول پایه، غلظت‌های مختلف (۱۰،۲۰،۳۰،...) میکروگرم بر میلی‌لیتر آماده شد و پس از انجام مراحل مختلف مطابق روش ذکرشده مقدار جذب نمونه‌ها خوانده شد. پس از رسم منحنی کالیبراسیون کوئرستین (شکل ۲) مقدار کل فلاونوئید عصاره با استفاده از معادله به‌دست‌آمده از منحنی (معادله ۳) بر مبنای کوئرستین و به صورت میلی‌گرم در گرم عصاره بیان گردید.

(معادله ۳)

$y= ۰.۰۱۹۸x +۰.۵۱۰۱$ $R2= ۰.۹۸٦$

که در این معادله X میزان جذب نمونه و yمقدار معادل کوئرستین می‌باشد. (Mg/gr)

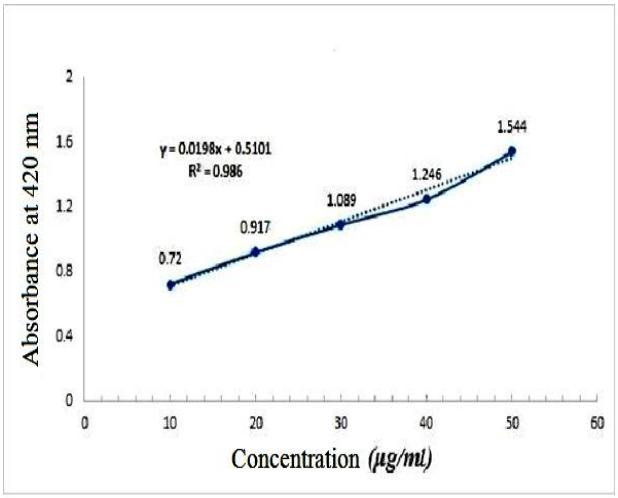

Fig 2: Standard calibration curve of quercetin for the determination of total flavonoids content.

۲-٦-سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدان با روش DPPH (۲ و ۲ دی فنیل -۱ پیکریل هیدرازیل)

به منظور سنجش ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره، ۱۰ میلی‌گرم از عصاره برگ را وزن نموده و در ۲۵ میلی‌لیتر حلال متانول (به‌صورت جداگانه) حل شد. سپس از محلول تهیه شده از هر عصاره ۵ غلظت متفاوت تهیه گردید (۱۰-۲۰-٤٠-۸۰-۱٦۰-۳۲۰) (µg/mL). در ادامه جهت تهیه محلول DPPH، ٤ میلی‌گرم از DPPH در ۱۰ میلی‌لیتر متانول حل شد (۰.۱ میلی مولار). سپس درون ۵ لوله آزمایش ۱ میلی‌لیتر محلول DPPH ریخته و سپس ٤ میلی‌لیتر عصاره تهیه‌شده با غلظت‌های متفاوت اضافه شد. لوله‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در محیط تاریک قرار گرفت. علاوه بر لوله‌های مذکور یک لوله به عنوان شاهد انتخاب گردید که فقط حاوی ۱ میلی‌لیتر DPPH و ۲ میلی‌لیتر متانول بود. این لوله ماکزیمم جذب را در طول‌موج ۵۱۷ نانومتر نشان داد. از متانول برای صفر کردن دستگاه UV-VIS استفاده شد. در ادامه میزان جذب تمامی نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر UV-VIS مدل شیمادزو اندازه‌گیری شد. رنگ لوله‌ها در جهت افزایش غلظت عصاره از ارغوانی به زرد بود؛ یعنی غلیظ‌ترین عصاره، زرد و کمترین غلظت ارغوانی بود. میزان

جذب نمونه‌ها با استفاده از معادله (٤) تبدیل به درصد مهار شدند.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 12:59 IRDT on Sunday June 20th 2021

معادله ٤)

$$Y= Abc-Abs / Abc \times 100$$

که در آن y برابر میزان فعالیت از بین برندگی رادیکال‌های آزاد (درصد) و Abc میزان جذب کنترل و Abs میزان جذب نمونه می‌باشد. میزان $IC_{۵۰}$ به معنی غلظتی از هر عصاره که لازم است تا ۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد را پاک‌سازی نماید (Mg/mL)، برای هر عصاره تعیین گردید. با استفاده از اعداد به‌دست‌آمده (درصد مهار) علیه غلظت منحنی استاندارد ترسیم کرده و از این منحنی استاندارد جهت محاسبه میزان $IC_{۵۰}$ استفاده شد [۲٦].

۲-۷- تجزیه و تحلیل آماری

تمامی اندازه‌گیری‌ها ۳ با تکرار شده و کلیه داده‌ها به صورت Mean ± SD گزارش شد. تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون پارامتریک واریانس یک‌سویه (one way ANOVA) انجام شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح اطمینان ۵ درصد استفاده شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- راندمان عصاره گیری

گیاهان حاوی ترکیبات متعددی هستند که ساختارهای مولکولی متفاوت دارند. استخراج این ترکیبات به عوامل متعددی بستگی دارد که مهم‌ترین آن‌ها انتخاب حلال مؤثر و روش استخراج مناسب می‌باشند. انتخاب حلال و روش استخراج بستگی به اندام‌های مختلف گیاه و نیز مواد تشکیل‌دهنده آن دارد. انتخاب حلال مخصوص هر دسته از ترکیبات گیاهی کار مشکلی است؛ زیرا همراه با این ترکیبات، مواد دیگری نیز وجود دارند که بر روی درجه حلالیت این مواد تأثیر می‌گذارند [۲۷]. هدف از انجام این تحقیق به دست آوردن روش مناسب جهت استخراج ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی به صورت تام و با روش رنگ سنجی بوده است، لذا می‌بایست حلال مناسب برای استخراج این ترکیبات مشخص شود. با توجه به اینکه ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی شامل گروه وسیعی از ترکیبات هستند که ساختمان‌های متفاوت و اغلب قطبی دارند، ممکن است به علت اتصال گروه‌های غیر قطبی به مولکول آن‌ها، دارای ساختمان غیر قطبی شده و در حلال‌هایی با قطبیت کمتر نیز حل‌شده باشند [۲۸]. ازاین‌رو، حلال‌هایی با قطبیت متفاوت مورد بررسی قرار گرفت. پس از انجام عملیات عصاره گیری، عصاره‌ها توزین شده و بازده هر یک از آن‌ها محاسبه شد. این مقادیر در جدول شماره ۱ آمده است. مقایسه بین مقادیر عصاره‌ها نشان داد که بین مقادیر عصاره حاصل از روش سوکسله و بقیه روش‌ها اختلاف معنی‌دار وجود داشت ($P<۰.۰۵$). سوکسله (۲٤.٤ درصد) بالاترین و خیساندن در آب مقطر (۳.۲۵ درصد) پایین‌ترین میزان کارایی استخراج را به خود اختصاص دادند. استفاده از حلال متانول در تمامی روش‌های استفاده‌شده بالاترین راندمان و آب مقطر پایین‌ترین راندمان را نشان داد. با توجه به قطبیت ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی و حلالیت این ترکیبات در حلال‌های قطبی نظیر متانول و استون، می‌توان بالا بودن راندمان استخراج در روش‌های مختلف هنگام استفاده از این حلال‌های قطبی را توجیه نمود. نتایج تحقیقات مزدستان و همکاران (۲۰۱۵) در بررسی تأثیر روش‌های مختلف استخراج بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه مورد (Myrtus) نشان داد که استفاده از متانول در روش استخراج با دستگاه سوکسله بالاترین راندمان (۳٦.٦ درصد) را نشان داد [۲۹]. همچنین نتایج صالح‌آبادی و همکاران (۲۰۱۵) در بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و سنجش ترکیبات فنلی عصاره‌های متانولی، دی کلرومتانی و اتیل استاتی اندام‌های هوایی گیاه روناس (*Rubia tinctorum*) نشان داد که عصاره متانولی بالاترین راندمان استخراج را داشته است [٤]. مشاهدات Nobosse و همکاران (۲۰۱۸) در بررسی تأثیر سن و حلال بر روی استخراج ترکیبات فنلی و قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره مورینگا الیفرا نشان داد که استفاده از متانول به عنوان حلال بالاترین راندمان استخراج و عصاره آبی پایین‌ترین کارایی را دارد [۲۰]. بررسی تأثیر روش‌های متفاوت عصاره گیری نظیر کاربرد اولتراسونیک، سوکسله و خیساندن در استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی گیاه Potentilla Atrosanguinea توسط Kaliaو همکاران (۲۰۰۸) نشان داد که عصاره حاصل از روش‌های سوکسله و اولتراسونیک در مقایسه با روش‌های دیگر بیشترین بازدهی را دارد [۳۰]. نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش در راستای تحقیقات ذکرشده می‌باشد. به نظر می‌رسد ترکیبات فیتوشیمیایی گیاهی متناسب با قطبیت خود در حلال‌های متفاوت حل‌شده و راندمان استخراج بالاتری را نشان می‌دهند. البته باید در نظر داشت همیشه بالاتر بودن بازده استخراج دلیل بر بیشتر بودن ترکیبات فنلی و بیشتر بودن فعالیت آنتی اکسیدانی نیست [۳۱].

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 12:59 IRDT on Sunday June 20th 2021

Table1 Effect of different solvents and extraction methods on extraction yield of *Moringa oleifera* leaf extract

Extraction method	Extraction yield(%)
Soaking in water	3.25 ± 0.89^{i}
Soaking in methanol	12.5 ± 1.15^{ef}
Soaking in aceton	11.45 ± 1.78^{fg}
(solvent=water) Ultrasound	7.90 ± 1.02^{h}
(solvent= methanol) Ultrasound	21.35 ± 1.14^{a}
(solvent= aceton) Ultrasound	18.15 ± 1.35^{cd}
(solvent=water)Soxhlet	10.1 ± 0.96^{fg}
(solvent= methanol)Soxhlet	19.25 ± 0.65^{cd}
(solvent=aceton)Soxhlet	24.40 ± 0.34^{b}

All results are expressed as mean ± SD.
Values in column which have different letters are significantly different ($p<0.05$).

۳-۲-محتوی تام فنل

محتوی کل ترکیبات فنلی با استفاده از روش ولف و همکاران (۲۰۰۳) و با استفاده از معرف فولین سیوکالتیو انجام شد [۳۲]. اساس این روش بر پایه احیاء معرف فولین توسط ترکیبات فنلی موجود در عصاره در محیط قلیایی و ایجاد ترکیب آبی‌رنگ می‌باشد. این ترکیب بالاترین میزان جذب را در طول‌موج ۷٦۵ نانومتر نشان می‌دهد. محتوای ترکیبات فنلی عصاره‌ها به صورت معادل میلی‌گرم گالیک اسید ((GAE در گرم عصاره خشک در جدول شماره ۲ آمده است. بالاترین میزان ترکیبات فنلی در عصاره استخراج شده با روش سوکسله و حلال متانول (۱.۳۵±۲٤.۷۹ میلی‌گرم اسید گالیک بر گرم عصاره خشک) مشاهده شد. خیساندن در آب مقطر تأثیر چندانی بر استخراج ترکیبات فنلی نداشت (۲.۰۱±۷.۵۵ میلی‌گرم اسید گالیک بر گرم عصاره خشک). نتایج نشان داد که روش استخراج و نوع حلال تأثیر معنی‌داری بر میزان ترکیبات فنلی پودر برگ مورینگا الیفرا داشته است ($P<0.05$). بیشترین مقدار ترکیبات فنلی در عصاره استخراج شده با روش سوکسله و حلال متانول به دست آمد. نتایج تحقیقات اسماعیل‌زاده و همکاران (۲۰۱٤) نشان داد که روش اولتراسوند تأثیر مثبت بر استخراج عصاره اتانولی و اتانولی- آبی کنجد (*Sesamum indicum*) داشته و باعث استخراج مقادیر بیشتر ترکیبات فنلی می‌گردد. روش اولتراسوند با تخریب دیواره سلول‌های زیستی سبب خروج بیشتر ترکیبات فنلی و زیست فعال می‌شود [۳۳]. در این روش امواج فراصوت به داخل ماده نفوذ کرده و موجب ایجاد کشیدگی و جمع شدن‌های مداوم شده که درنتیجه آن حفراتی در دیواره سلول گیاهی ایجاد می‌شود. این حفرات به صورت نامتقارن به‌هم‌پیوسته و موجب خروج مواد از داخل سلول به خارج می‌شوند. استخراج ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی از عصاره آبی اندام‌های مختلف گیاه مورینگا الیفرا در مطالعات متعدد گزارش شده است [۲٤،۳٤،۳۵]. تحقیقات Sultana و همکاران (۲۰۰۹) در مقایسه بین تأثیر متانول و اتانول در استخراج ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی برگ و ریشه مورینگا الیفرا نشان داد که متانول حلال بهتری برای استخراج این ترکیبات می‌باشد [۳٦]. تفاوت در میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی استخراج شده به‌وسیله حلال‌های متفاوت را می‌توان با تفاوت در قطبیت، قدرت نفوذ حلال، پیچیدگی ساختاری و حلالیت انتخابی ترکیبات فیتوشیمیایی در یک حلال خاص، تفسیر نمود. حلالیت پلی فنول ها به‌طور عمده بستگی به حضور و موقعیت گروه هیدروکسیل و اندازه مولکولی و طول زنجیره هیدروکربنی تشکیل‌دهنده آن دارد. ترکیبات فنلی اغلب در حلال‌های قطبی در مقادیر بالاتری استخراج می‌شوند. تحقیقات نشان داده که عصاره‌های آبی (PI=۹[1]) تأثیر چندانی بر استخراج ترکیبات فنلی ندارد. معمولاً هنگام استفاده از آب مقطر به عنوان حلال از دماهای بالا جهت بهتر شدن شرایط استخراج استفاده می‌شود. این امر باعث تجزیه حرارتی برخی از آنتی‌اکسیدان‌های فنلی می‌شود [۳۷]. استفاده از آب به عنوان حلال باعث ایجاد یک محیط کاملا قطبی می شود؛ و این امر موجب کاهش استخراج بعضی از ترکیبات با درجه قطبیت کمتر می شود. در تحقیقی که توسط ژانگ و همکاران (۲۰۰۱) انجام شد، دلیل کمتر بودن میزان فنول کل در عصاره آبی در مقایسه با عصاره های الکلی، فعالیت بیشتر آنزیم پلی فنل اکسسیداز و کاهش ترکیبات پلی فنولی در عصاره آبی بیان شد [۳۸]. برخلاف مشاهدات ما، *Owusu* و همکاران (۲۰۱۱) دریافتند که آب حلال بهتری

1. Polarity index

www.SID.ir

Archive of SID

نسبت به متانول و اتانول برای استخراج ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی پودر برگ مورینگا الیفرا بوده است [۳۹]. نتایج نشان داد که حلال‌هایی با قطبیت متفاوت نظیر متانول (PI=٦.٦) و استون (PI=٥.٤) تأثیر معنی‌داری در میزان استخراج ترکیبات فنلی داشتند. در چارچوب این مشاهدات، باید اشاره نمود که ترکیبات فنلی اغلب با سایر مولکول‌های بیولوژیک (پلی ساکارید ها، پروتئین‌ها، ترپن ها، کلروفیل، ترکیبات معدنی) همراه هستند و یک حلال مناسب برای استخراج ترکیبات خاص باید بر اساس ویژگی‌های ساختاری و سطح حلالیت آن مولکول در آب انتخاب شود [٤۰].

Table 2 Effect of different solvents and extraction methods on total phenolic content (TPC) and total flavonoid content (TFC) of *Moringa oleifera* leaf extracts.

Extraction method	TPC (mg GAE/g dry sample)	TFC (mg QU/g dry sample)
Soaking in water	7.55±2.01^{e}	11.61±1.24^{e}
Soaking in methanol	17.95±1.67^{c}	41.41±2.15^{c}
Soaking in aceton	15.00±2.35^{d}	39.72±1.41^{c}
(solvent=water) Ultrasound	8.12±1.15^{e}	11.48±1.75^{e}
(solvent= methanol) Ultrasound	22.57±1.84^{b}	78.80±1.15^{a}
(solvent= aceton) Ultrasound	18.25±2.31^{c}	66.86±1.55^{b}
(solvent=water)Soxhlet	15.29±0.75^{d}	18.50±1.94^{d}
(solvent= methanol)Soxhlet	24.79±1.35^{a}	81.14±1.45^{a}
(solvent=aceton)Soxhlet	23.15±2.08^{b}	66.65±1.95^{b}

All results are expressed as mean ± SD.
Values in each column which have different letters are significantly different ($p<0.05$).

۳-۳- محتوی تام فلاونوئید

اساس کار رنگ سنجی بر ویژگی مکانیسم‌های مولکولی کمک‌کننده به حلال جهت استخراج ترکیب خاص استوار است. در روش رنگ سنجی آلومینیوم، یک ترکیب اسیدی پایدار بین کلرید آلومینیوم وکربن شماره ٤ گروه کتو و همچنین کربن شماره ٥ گروه هیدروکسیل متعلق به ترکیب فلاونوئید، تشکیل می‌گردد. محتوی تام فلاونوئیدی به صورت میلی‌گرم معادل کوئرستین در گرم عصاره بر اساس منحنی استاندارد کوئرستین تعیین شد. نتایج نشان داد که استفاده از روش سوکسله به همراه حلال متانول بالاترین میزان فلاونوئید (۸۱.۱٤±۱.٤٥ میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره خشک) و خیساندن در آب مقطر کمترین میزان فلاونوئید (۱۱.٦۱±۱.۲٤ میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره خشک) استخراج گردید. (جدول ۲). Ilokiو همکاران (۲۰۱٥) در بررسی تأثیر حلال بر روی محتوی فنل و فلاونوئید گیاه *Bucidda buceras* دریافتند که حلال متانول بالاترین تأثیر را در استخراج ترکیبات فلاونوئیدی برگ این گیاه داشت. این در حالی بود که آن‌ها در تحقیقات خود متوجه شدند که استون در استخراج ترکیبات فلاونوئیدی ساقه اثر بیشتری دارد [۳۷]. استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از مواد گیاهی به حلالیت این ترکیبات در حلال‌های مختلف بستگی دارد. به‌علاوه قطبیت حلال‌های مورداستفاده نقش کلیدی را در افزایش حلالیت این ترکیبات بازی می‌کند [٤۱]. مطالعات سلمانیان و همکاران (۲۰۱۳) در بررسی تأثیر حلال در میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی گیاه زولنگ (*Eryngium campestre*) نشان داد که نوع حلال مورد استفاده تأثیر معنی‌داری ($P<۰.۰٥$) بر مقدار و نوع ترکیبات فلاونوئیدی عصاره‌های اتانولی و متانولی این گیاه داشته است [٤۲]. هیچ‌یک از روش‌های رنگ سنجی نمی‌تواند همه انواع فلاونوئیدها را شناسایی کند ولی در روش رنگ سنجی کلرید آلومینیوم، تنها فلاون ها و فلاونول ها می‌توانند ترکیب پایدار با کلرید آلومینیوم تشکیل دهند و ازنظر کمی اندازه‌گیری شوند [٤۳]. نتایج سلمانیان و همکاران (۲۰۱۳) نشان داد که میزان فلاون ها در عصاره متانولی زولنگ بالاتر از سایر ترکیبات فلاونوئیدی است و به این دلیل فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH نیز بالاتر بود [٤۲]. نتایج تحقیق حاضر در راستای پژوهش‌های ذکرشده می‌باشد. حلال های متانول واستون نسبت به آب برای استخراج ترکیبات فلاونوئیدی مناسب تر می باشند. دلیل این امر حلالیت بالای ترکیبات فلاونوئیدی در حلال های آلی می باشد.

۳-٤- حذف رادیکال‌های آزاد DPPH

به دام اندازی رادیکال‌های آزاد DPPH به‌طور وسیع برای ارزیابی قدرت حذف رادیکال آزاد در عصاره‌های گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد. خصوصیت به دام اندازی رادیکال‌های

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 12:59 IRDT on Sunday June 20th 2021

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 12:59 IRDT on Sunday June 20th 2021

آزاد و مقادیر IC_{50} بیانگر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد [٤٤]. عصاره‌های گیاهی به علت دارا بودن ترکیبات فنلی دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ظرفیت بالایی برای اهدای اتم هیدروژن یا الکترون می‌باشند. توانایی مهارکنندگی فنل ها و فلاونوئیدها به دلیل داشتن گروه‌های هیدروکسیل (-OH) و گروه‌های قابل تعویض متوکسی (-OCH3) در مولکول آن‌ها است. خصوصیات آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنلی وابسته به توانایی آن‌ها در دادن الکترون برای به دام انداختن رادیکال‌های آزاد و تشکیل ترکیبات پایدار فنوکسیل می‌باشد [٣]. در تحقیق حاضر، روش استخراج و نوع حلال تأثیر قابل‌ملاحظه‌ای بر قدرت به دام اندازی رادیکال آزاد DPPH داشت. بالاترین قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH در عصاره متانولی استخراج شده با روش سوکسله مشاهده گردید (٠.٦٥±٤٩.٩٧) (جدول٣). در مقابل در روش استخراج خیساندن پایین‌ترین میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH مشاهده شد (١.٩٥ ± ٢٧٤.١٥). نتایج نشان داد با افزایش غلظت عصاره میزان مهار رادیکال های آزاد DPPH افزایش یافت. نتایج نشان داد در روش‌های مختلف عصاره گیری و همچنین حلال‌های مختلف، با افزایش غلظت عصاره میزان مهار رادیکال آزاد DPPH به‌طور معنی‌داری ($P<0.05$) افزایش یافت. (شکل ٣). علت بالا بودن میزان مهار رادیکال آزاد DPPH با افزایش غلظت عصاره‌ها را می‌توان به علت بالا بودن ترکیبات فنلی دانست. در غلظت‌های بالاتر ترکیبات فنلی به دلیل افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل موجود در محیط واکنش، احتمال دادن هیدروژن به رادیکال‌های آزاد و به دنبال آن قدرت مهارکنندگی عصاره افزایش می‌یابد. نتایج نشان داد که اسید اسکوربیک به عنوان یک آنتی اکسیدان طبیعی بالاترین قدرت حذف رادیکال های آزاد را در مقایسه با عصاره های استخراج شده با روش های متفاوت، دارد. از شاخص IC_{50} که تابعی از غلظت عصاره می‌باشد و بیانگر غلظتی از هر عصاره می‌باشد که لازم است تا ٥٠ درصد رادیکال‌های آزاد را پاک‌سازی نماید، به‌منظور بیان قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد استفاده شد. پایین‌تر بودن میزان IC_{50} بیانگر قدرت مهارکنندگی بالاتر می‌باشد. در برخی از مطالعات قبلی ارتباط خطی بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فنول تام در بسیاری از گیاهان گزارش شده است [٤٥].

در مطالعه حاضر عصاره‌های حاوی مقادیر بالاتر ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری نیز نشان دادند. نتایج تحقیقات قاسم‌زاده و همکاران (٢٠١٤) در بررسی فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH توسط عصاره برگ درخت *Murraya Koenigii* نشان داد که بیشترین فعالیت مهار مربوط به عصاره متانولی بود [٤٦]. این نتایج با یافته‌های تحقیق حاضر مشابه بود. بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره جوانه گندم‌سیاه (*Fagopyrum esculentum*) توسط Zhu و همکاران (٢٠١١) نشان داد که نوع حلال و روش استخراج تأثیر مهمی بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره دارد [٢٥]. مطالعات Peschel و همکاران (٢٠٠٦) در بررسی اثر پنج حلال آب، متانول، اتانول، استون و هگزان در استخراج عصاره از ١٣ نوع میوه و سبزی نشان داد که حلال‌های قطبی نظیر متانول بیشترین بازده استخراج ترکیبات فنلی و بالاترین تأثیر را در مهار رادیکال‌های آزاد DPPH داشتند [٤٧]. نتایج بررسی تأثیر روش‌های مختلف استخراج بر ترکیبات فنلی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ توت سفید (*Morus Alba*) توسط صداقت و همکاران (٢٠١٨) نشان داد در تمامی غلظت‌های مورد بررسی، عصاره‌های استخراج شده با روش اولتراسوند بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و عصاره‌های استخراج شده با روش غرقابی کمترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را داشتند [٤٨].

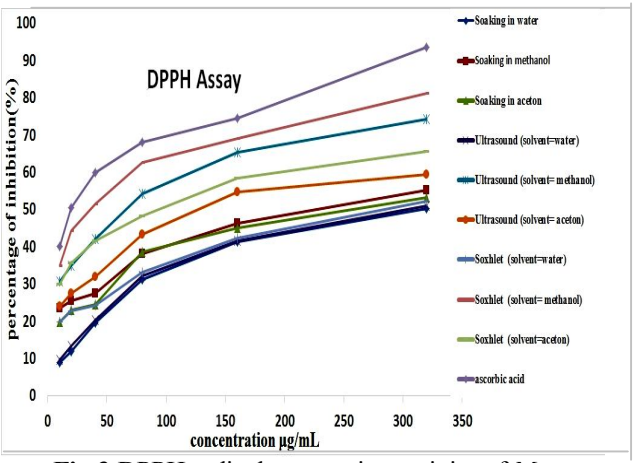

Fig 3 DPPH radical scavenging activity of *Moringa oleifera* leaf extract in different concentration and different extraction methods.
All results are expressed as mean ± SD

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 12:59 IRDT on Sunday June 20th 2021

Table 3 Antioxidant activity of leaf extract of *Moringa oleifera* in different methods and solvents.

Extraction method	DPPH (IC_{50}) µg/ml
Soaking in water	274.15±1.95[a]
Soaking in methanol	239.46±1.65[a]
Soaking in aceton	254.40±1.14[b]
(solvent=water) Ultrasound	273.95±2.11[a]
(solvent= methanol) Ultrasound	103.95±1.19[d]
(solvent= aceton) Ultrasound	191.90±1.45[b]
(solvent=water)Soxhlet	273.83±2.45[a]
(solvent= methanol)Soxhlet	49.97±0.65[e]
(solvent=aceton)Soxhlet	137.16±1.05[c]
Ascorbic acid	8.28±1.68[f]

All results are expressed as mean ± SD.
Values in column which have different letters are significantly different ($p<0.05$).

۳-۵-ضریب همبستگی بین میزان ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره

ارتباط خطی بین فعالیت آنتی اکسیدانی و ترکیبات فنلی در شکل (٤) نشان داده شده است. ضریب همبستگی بالایی بین داده های مربوط به محتوی ترکیبات فنلی و فعالیت بازدارندگی رادیکال های آزاد DPPH وجود داشت (R2=۰.۷۳۱). نتایج حاضر با نتایج حاصل از تحقیق Sroka و همکاران (۲۰۰۳) در بررسی تاثیر اسیدهای فنلی بر روی درصد مهار رادیکال های آزاد DPPH مشابهت دارد. نتایج آنها نشان داد که ضریب همبستگی بالایی بین اسیدهای فنولیک و درصد مهار رادیکال های آزاد DPPH وجود دارد. آنها قابلیت مهار رادیکال های آزاد توسط این ترکیبات را به گروههای کربونیل و استیل فنولیک اسیدها و گروههای هیدروکسیل متصل شده به حلقه های آروماتیک در این ترکیبات نسبت دادند [٤۹].

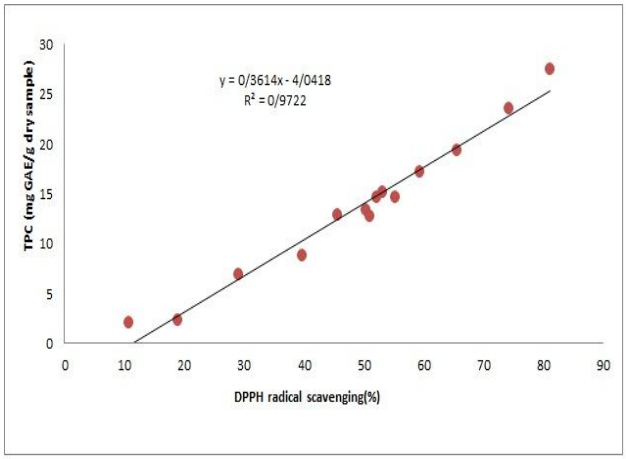

Fig 4 Relationship between total phenolic content (TPC) and DPPH antioxidant activity of Moringa oleifera leaf extract

مطالعات انجام شده در این زمینه نشان داده اند که همبستگی بالایی بین میزان ترکیبات فنولی و فعالیت ضداکسایشی آنها وجود دارد. همچنین این تحقیقات نشان داده اند که حلال های قطبی نظیر متانول و اتانول به دلیل توانایی بیشتر در استخراج ترکیبات فنلی به عنوان موثرترین حلال معرفی شده اند. البته میزان ترکیبات فنلی استخراج شده معلولی از نوع گیاه و حلال می باشد و به نوع ترکیبات موثره موجود در نمونه و قطبیت آنها نیز بستگی دارد [۵۰،۵۱].

٤- نتیجه گیری

از مجموع نتایج به‌دست‌آمده می‌توان استنباط نمود که قدرت فعالیت آنتی‌اکسیدانی به میزان قابل‌توجهی تحت تأثیر ماهیت حلال و روش استخراج و تعامل این دو قرار دارد. بااین‌حال، قدرت استخراج حلال، مهم‌ترین فاکتور مؤثر بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی محصول می‌باشد. نتایج این تحقیق نشان داد که نوع حلال و روش استخراج بر میزان استخراج ترکیبات فنولیک اثر می‌گذارند. بیشترین میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در روش سوکسله با استفاده از حلال متانول به دست آمد. بین میزان ترکیبات مؤثره عصاره و فعالیت آنتی‌اکسیدانی رابطه خطی مستقیم وجود داشت. درمجموع می‌توان پیشنهاد نمود با توجه به رویش درخت مورینگا الیفرا در مناطق گرمسیر کشور و تطبیق شرایط رشد این گیاه با اقلیم ایران، برگ این گیاه می‌تواند به عنوان یک منبع ارزان‌قیمت برای تهیه آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی معرفی شود. لازم به ذکر می باشد بررسی های بیشتر جهت شناسایی مواد مضر احتمالی در گیاه ضروری می باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 12:59 IRDT on Sunday June 20th 2021

۵- سپاسگزاری

از همکاری مدیریت و کارکنان محترم آزمایشگاه تحصیلات تکمیلی دانشگاه پیام نور مرکز اصفهان تشکر و قدردانی می‌نماییم.

٦- منابع

[1] Frankel, E. N. (1991). Recent advances in lipid oxidation. J. Sci. Food Agric, 54(4), 495-511.

[2] Kumaran, A. (2006). Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of Coleus aromaticus. Food chem, 97(1): 109-114.

[3] Mathew, S., & Abraham, T. E. (2006). In vitro antioxidant activity and scavenging effects of Cinnamomum verum leaf extract assayed by different methodologies. Food Chem Toxicol, 44(2): 198-206. doi:10.1016/j.fct.2005.06.013

[4] Salhe Abadi S, M. S. A. M. (2015). Evaluation of the antioxidant activity and total phenols, flavonoids in methanolic, dichloromethane and ethyl acetate extracts of aerial parts of Rubia florida. J North Khorasan Univ Med Sci, 7(1): 112-101.

[5] Gulcin, I., Oktay, M., Kufrevioglu, O. I., & Aslan, A. (2002). Determination of antioxidant activity of lichen Cetraria islandica (L) Ach. J Ethnopharmacol, 79(3): 325-329.

[6] Neergheen, V. S., Bahorun, T., Jen, L.-S., & Aruoma, O. I. (2007). Bioefficacy of Mauritian endemic medicinal plants: Assessment of their phenolic contents and antioxidant potential. Pharm. Biol, 45(1): 9-17.

[7] Davarynejad, G. H., & Tamash, N. P. (2012). Investigation of antioxidant capacity and some bioactive compounds of Iranian pistachio (Pistachio vera L.) cultivars. Not. Sci. Biol, 4:62-64

[8] Hauskrecht, M. (2000). Value-function approximations for partially observable Markov decision processes. J Artif Intell Res, 13:33-94.

[9] Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., & Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. Food Chem, 97(4):654-660.

[10] Hayouni, E. A., Abedrabba, M., Bouix, M., & Hamdi, M. (2007). The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian Quercus coccifera L. and Juniperus phoenicea L. fruit extracts. Food Chem, 105(3): 1126-1134.

[11] Naeem, M., Khan, M. N., & Khan, M. M. A. (2013). Adverse effects of abiotic stresses on medicinal and aromatic plants and their alleviation by calcium. Plant Acclimation to Environmental Stress, Springer.pp 101-146.

[12] Mozaffarian, V. (1996). A dictionary of Iranian plant names: Latin, English, Persian: Farhang Mo'aser.

[13] Santos, N., Napoleão, T., Benevides, C., Albuquerque, L., Pontual, E., Oliveira, A.,... Paiva, P. (2018). Effect of gamma irradiation of Moringa oleifera seed lectin on its larvicidal, ovicidal, and oviposition-stimulant activities against Aedes aegypti. S. Afr. J. Bot.

[14] Ghasi, S., Nwobodo, E & ,.Ofili, J. O. (2000). Hypocholesterolemic effects of crude extract of leaf of Moringa oleifera Lam in high-fat diet fed wistar rats. J Ethnopharmacol, 69(1), 21-25.

[15] Hamza, A. A. (2010). Ameliorative effects of Moringa oleifera Lam seed extract on liver fibrosis in rats. Food Chem Toxicol, 48(1): 345-355. doi:10.1016/j.fct.2009.10.022

[16] He, Y., He, Z., He, F., & Wan, H. (2012). Determination of quercetin, plumbagin and total flavonoids in Drosera peltata Smith var. glabrata YZ Ruan. Pharmacogn. Mag, 8(32): 263.

[17] Hsu, C.-L., & Yen, G.-C. (2007). Effect of gallic acid on high fat diet-induced dyslipidaemia, hepatosteatosis and oxidative stress in rats. Br. J. Nutr, 98(4): 727-735.

[18] Kaffashi Elahi, R. (2013). Preventive effect of turmeric powder the development of fatty liver in rats fed a high fat diet. J. Comp. Pathol, 10(1): 889-898.

[19] Olatosin, T., Akinduko, D., & Uche, C. (2013). Evaluation of the hepatoprotective efficacy of Moringa oleifera seed oil on CCl4-induced liver damage in Wistar albino rats. Int J Eng Sci, 2:13-18.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 12:59 IRDT on Sunday June 20th 2021

activities of myrtle (Myrtus communis L). J. Mazandaran Univ. Med. Sci, 25(127):10-24.

[30] Kalia, K., Sharma, K., Singh, H. P., & Singh, B. (2008). Effects of extraction methods on phenolic contents and antioxidant activity in aerial parts of Potentilla atrosanguinea Lodd. And quantification of its phenolic constituents by RP-HPLC. J Agric Food Chem, 56(21): 10129-10134.

[31] Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, p. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S., and ju, Y. H.(2014).Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of limnophila aromatica. J. Food Drug Anal, 22(3), 296-302.

[32] Moyo, B., Oyedemi, S., Masika, P. J., & Muchenje, V. (2012). Polyphenolic content and antioxidant properties of Moringa oleifera leaf extracts and enzymatic activity of liver from goats supplemented with Moringa oleifera leaves/sunflower seed cake. Meat Sci, 91(4): 441-447.

[33] Esmaeilzadeh Kenari, R., Mohsenzadeh, F., & Amiri, Z. R. (2014). Antioxidant activity and total phenolic compounds of Dezful sesame cake extracts obtained by classical and ultrasound assisted extraction methods. Food Sci. Nutr, 2(4): 426-435.

[34] Siddhuraju, P., & Becker, K. (2003). Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (Moringa oleifera Lam.) leaves. J. Agric. Food Chem, 51(8): 2144-2155.

[35] Vongsak, B., Sithisarn, P., Mangmool, S., Thongpraditchote, S., Wongkrajang, Y., & Gritsanapan, W. (2013). Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of Moringa oleifera leaf extract by the appropriate extraction method. Ind. Crops Prod, 44: 566-571.

[36] Sultana, B., Anwar, F., & Ashraf, M. (2009). Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. Molecules, 14(6): 2167-2180.

[37] Iloki-Assanga, S. B., Lewis-Luján, L. M., Lara-Espinoza, C. L., Gil-Salido, A. A., Fernandez- Angulo, D., Rubio-Pino, J. L., & Haines, D. D. (2015). Solvent effects on phytochemical constituent profiles and

[20] Nobossé, P ,.Fombang, E. N., & Mbofung, C. M. (2018). Effects of age and extraction solvent on phytochemical content and antioxidant activity of fresh Moringa oleifera L. leaves. Food Sci. Nutr 00:1–11.

[21] Boulekbache-makhlouf, L., Medouni, L., Medouni-Arkoub, L., and Madani, K. (2013). Effect of solvents extraction on phenolic content and antioxidant activity of the byproduct of eggplant. Ind. Crops Prod, 49, 668-674.

[22] Enayati, N., Ghafarzadegan, R., Hajiaghaee, R., Vazirian, M. (2017). Comparison of Different Methods in Sennoside Extraction from Senna alexandrina. J. Med. Plants Res, 16(4): 160-170.

[23] Rabiei, K., Bekhradnia, S., Nabavi, S. M., Nabavi, S. F., & Ebrahimzadeh, M. A. (2012). Antioxidant activity of polyphenol and ultrasonic extracts from fruits of Crataegus pentagyna subsp. elburensis. Nat Prod Res, 26(24): 2353-2357. doi:10.1080/14786419.2012.658799

[24] Jamshidi, M., Shabani, E., Hashemi, Z., & Ebrahimzadeh, M. (2014). Evaluation of three methods for the extraction of antioxidants from leaf and aerial parts of Lythrum salicaria L. (Lythraceae). Int. Food Res. J, 21(2): 783-788.

[25] Zhu, K.X., Lian, C.-X ,.Guo, X.-N., Peng, W., & Zhou, H.-M. (2011). Antioxidant activities and total phenolic contents of various extracts from defatted wheat germ. Food chem, 126(3): 1122-1126.

[26] Ebrahimzadeh, M. A., Nabavi,S.M,Naba,S.F. (2008). Antioxidant and free radical scavenging activity of methanolic extract of Pterocarya fraxinifolia (Lam.) Spach leaves and bark. J Med Plants Res, 24(3): 374-384

[27] Okumu, M., Mbaria, J., Kanja, L., Gakuya, D., Kiama, S., & Ochola, F. (2016). Phytochemical profile and antioxidant capacity of leaves of Moringa oleifera (Lam) extracted using different solvent systems. J. Pharmacogn. Phytochem, 302(54): 302-308.

[28] Ghafar, F., Nazrin, T., Salleh, M., Hadi , N. N., Ahmad, N., Hamzah, A. A., Azman, I. (2017). Total phenolic content and total flavonoid content in moringa oleifera seed. G. War. Sains, 1(1): 23-25.

[29] Mozdastan, S., Ebrahimzadeh, M. A., & Khalili, M. (2015). Comparing the impact of different extraction methods on antioxidant

www.SID.ir

Archive of SID

of Whey protein coated as compared with shellac coated chocolate. J. Food Sci, 67(7): 2764-2769.

[45] Ghasemi K, Ghasemi Y, Ebrahimzadeh MA. (2009). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 Citrus species peels and tissues. Pak J Pharm Sci, 22(3): 277-281.

[46] Ghasemzadeh, A., Jaafar, H. Z., & Rahmat, A. (2011). Effects of solvent type on phenolics and flavonoids content and antioxidant activities in two varieties of young ginger (Zingiber officinale Roscoe) extracts. J. Med. Plants Res, 5(7):1147-1154.

[47] Peschel, W., Sánchez-Rabaneda, F., Diekmann, W., Plescher, A., Gartzía, I., Jiménez, D., Codina, C. (2006) An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. Food chem, 97(1): 137-150.

[48]Sedaghat, B., najafian,L. (2018). Effect of different extraction methods on phenolic compounds and antioxidant properties of white mulberry (Morus alba L.) leaf extract. J. Food Process. Technol, 10(1): 85-98.

[49] Sroka, Z., and Cisowski, W. (2003). Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. Food Chem. Toxicol, 41(6), 753-758.

[50] Alothman, M., Bhat, R. and Karim, A. A. (2009). Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. Food Chem, 115, 785–788

[51] Soares, M.O., Alves, R.C., Pires, P.C., Oliveira, M.B.P.P. and Vinha, A.F. (2013). Angolan Cymbopogon citratus used for therapeutic benefits: Nutritional composition and influence of solvents in phytochemicals content and antioxidant activity of leaf extracts. Food Chem. Toxicol, 60, 413–418.

antioxidant activities, using four different extraction formulations for analysis of Bucida buceras L. and Phoradendron californicum. BMC research notes, 8(1): 396.

[38] Zhang, Z., Pang, X., Ji, Z., and jiang, Y. (2001). Role of anthocyanin degradation in Iitchi pericarp browning. Food chem, 75(2), 217-221.

[39] Owusu-Ansah, M., Achel, D. G., Adaboro, R. M., Asare, D. K., & Amoatey, H. M. (2011). Total phenolic content and antioxidant activity in leaf samples of twelve accessions of Moringa oleifera Lam. J. Chem. Anal. Sci, 2(10): 1226-1230.

[40] Ghasemzadeh, A., Jaafar, H. Z., Karimi, E., & Rahmat, A. (2014). Optimization of ultrasound-assisted extraction of flavonoid compounds and their pharmaceutical activity from curry leaf (Murraya koenigii L.) using response surface methodology. BMC Complementary Altern. Med, 14(1): 318.

[41] Silva, E., Souza, J., Rogez, H., Rees, J.-F., & Larondelle, Y. (2007). Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. Food chem, 101(3): 1012-1018.

[42] Salmanian, S., Sadeghi, M. A., Jamson, M., & Tabatabaee, A. B. (2013). Identification and quantification of phenolic acids, radical scavenging activity and ferric reducing power of Eryngium caucasicum Trautv. ethanolic and methanolic extracts. Iran J Nutr Sci Food Technol, 2(2):193-204.

[43] Chang, C.-C., Yang, M.-H., Wen, H.-M., & Chern, J.-C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. J Food Drug Anal, 10(3): 178-182

[44] Lee, S. Y., Dangaran, K., Guinard, J. X., & Krochta, J. (2002). Consumer acceptance

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 12:59 IRDT on Sunday June 20th 2021

www.SID.ir

Archive of SID

Iranian Journal of Food Science and Technology

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 12:59 IRDT on Sunday June 20th 2021

Effect of solvent and extraction method on phytochemical content and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract

Asgari-kafrani, A. [1*], fazilati, M. [1], Nazem, H. [1]

1. Department of biology, Payame Noor University (PNU), isfahan, Islamic Republic of Iran.

ARTICLE INFO

Article History:

Received 2019/ 01/ 21
Accepted 2020/ 06/ 21

Keywords:

Moringa oleifera,
Phenol, Flavonoid,
DPPH,
Antioxidant activity.

DOI: 10.29252/fsct.18.05.12

*Corresponding Author E-Mail:
abbasasgari98@yahoo.com

ABSTRACT

Plants are rich source of phenolic compounds, which are the most important natural antioxidants. The aim of this study was to investigate the effect of extraction methods and different solvents on extraction yield, total phenolic content (TPC), total flavonoid content (TFC) and free radicals scavenging activity of DPPH in Moringa oleifera leaf extract. For this, the leaves were grinding after dried followed by different extraction techniques like soaking, Soxhlet and ultrasound (Frequency: 70 kHz) using distilled water, acetone and methanol as solvent. TPC and TFC were measured using Folin–Ciocalteu method and colorimetric assay. Antioxidant activity of resulted extracts was measured using 2, 2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH). The antioxidant activity of the extracts was compared with ascorbic acid. The highest extraction efficiency was obtained in Soxhlet method use acetone as solvent (24.40±0.34%). Methanol in Soxhlet extraction method showed the highest effect on TPC (24.79±1.35 mg GAE/g dry sample) and TFC (81.14±1.45 mg QU/g dry sample). In all samples, increased DPPH free radical scavenging when increased concentration of the extracts. The highest radical scavenging was observed in methanol extracts obtained by Soxhlet (IC50=49.97±0.65). Finally, it could be concluded that, methanol was the best solvent and Soxhlet was the best method for extraction of phenolic and flavonoid compounds in in the leaves of Moringa oleifera.

www.SID.ir