Archive of SID

Original Article

A Phytochemical Study and Comparison of the Effect of Citrullus Colocynthis Extracts on Colon Cancer Cells Caco-2

Neda Mirzaei[1], *Maryam Kolahi*[2*], *Babak Mokhtari*[1]

[1] *Department of Chemistry, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahwaz, Ahwaz, Iran.*

[2] *Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahwaz, Ahwaz, Iran.*

[*] ***Corresponding Author:***
Maryam Kolahi;
Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahwaz, Ahwaz, Iran.

Email:
m.kolahi@scu.ac.ir

Received: 23 Dec, 2019
Accepted: 30 Jun, 2020

Abstract

Background and Objectives: The present study aimed to detect the organic compounds of *Citrullus Colocynthis* L. and investigate the anticancer and antioxidant effects of four extracts of this plant on Caco-2 cell line.

Methods: The effective compounds of the air branches of *Citrullus Colocynthis* L. were studied using phytochemicals methods. In order to evaluate the cytotoxic and antioxidant characteristics of this plant, the ethanolic and n-hexane extracts of the plant were collected, using Soxhlet apparatus and maceration methods. The effects of these extracts on Caco-2 colon cancer cells were evaluated using MTT tests based on the ability of living cells to convert tetrazolium salt to unsolvable formazan, NBT method to evaluate the reduction of ROS using aqueous nitrotrazole and based on a completely randomized design using SPSS software and Duncan test.

Results: The phytochemical analysis confirmed the presence of flavonoids, alkaloids, terpenoids, vitamin C, and protein compounds in *Citrullus Colocynthis* L. However, no steroids, tannin, saponins were detected in this plant. The results of MTT showed that the least cell survival value of the treated cancerous cell was obtained with n-hexane extract using maceration method. The results of the NBT test also demonstrated the antioxidant properties of all extracts. The NBT results revealed the highest reduction in the percentage of free radicals belonged to the group treated with n-hexane extract by maceration methods and ethanolic extract using Soxhlet apparatus.

Conclusion: The existence of several chemical compounds with proapoptotic properties in the extracts of *Citrullus Colocynthis* L. proposes the notion that the use of the compounds of these extracts alone or in combination with anticancer drugs may be beneficial in the treatment of colon cancer.

Keywords: Antioxidants; Caco-2 Cells; *Citrullus Colocynthis* L.; Flavonoids; Steroids.

DOI: 10.29252/qums.14.5.1

www.SID.ir

International License Creative Commons Attribution License 4.0

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره چهاردهم، شماره پنجم، مرداد ۹۹
صفحه ۱ الی ۱۱

Archive of SID

مقاله پژوهشی
(Original Article)

بررسی فیتوشیمیایی و مقایسه اثر عصاره‌های میوه هندوانه ابوجهل بر روی سلول‌های سرطانی روده CaCO2

ندا میرزایی[۱]، مریم کلاهی[۲*]، بابک مختاری[۱]

[۱] گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

[۲] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:
مریم کلاهی؛ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

آدرس پست الکترونیکی:
m.kolahi@scu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۰۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۴/۱۰

چکیده

زمینه و هدف: هدف مطالعه حاضر بررسی خواص ضدسرطانی و آنتی‌اکسیدانی چهار نوع عصاره میوه هندوانه ابوجهل بر روی سلول‌های سرطان روده CaCO2 بود.

روش بررسی: ترکیبات موثره میوه هندوانه ابوجهل با استفاده از روش‌های فیتوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفت. به‌منظور بررسی خواص سیتوتوکسی سیتی و آنتی اکسیدانی، عصاره‌ی اتانولی و ان-هگزانی میوه هندوانه ابوجهل به دو روش سوکسله و ماسراسیون استخراج گردید. اثر این عصاره‌ها بر روی سلول‌های CaCO2 سرطان روده به وسیله آزمون‌های MTT بر اساس توانایی سلول‌های زنده در تبدیل نمک تترازولیوم به فورمازان نامحلول و روش NBT جهت بررسی میزان کاهش ROS با استفاده از نیترو تترازولیوم آبی و بر اساس طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون دانکن مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: بررسی‌های فیتوشیمیایی حضور ترکیب‌های فلاونوئیدی، آلکالوئیدی، ترپنوئید، ویتامین C و پروتئین را در میوه هندوانه ابوجهل تأیید می‌کند. درحالی‌که ترکیب‌های استروئیدی، تانینی و ساپونینی در این میوه یافت نشد. نتایج به‌دست‌آمده از بررسی میزان زنده‌مانی سلولی با استفاده از روش MTT نشان داد کمترین بقای سلول‌های سرطانی تیمارشده مربوط به عصاره ان-هگزانی به روش ماسراسیون با بیش از ۹۵ درصد ممانعت‌کنندگی بوده است. نتایج آزمون NBT بیانگر خاصیت ضداکسیدانی تمام عصاره‌ها بود. بیشترین میزان کاهش درصد رادیکال‌های آزاد مربوط به گروه تیمارشده با ان-هگزانی به روش ماسراسیون و عصاره اتانولی با استفاده از دستگاه سوکسله بود.

نتیجه‌گیری: وجود ترکیبات شیمیایی مختلف شناسایی‌شده با ویژگی‌های پروآپوپتوزی در میوه هندوانه ابوجهل نشان می‌دهد به‌کاربردن ترکیبات این عصاره به‌تنهایی یا همراه با داروهای ضدسرطان شیمیایی می‌تواند راهکار نوینی برای درمان سرطان باشد.

کلیدواژه‌ها: آنتی‌اکسیدان‌ها؛ استروئید؛ سلول‌های Caco-2؛ هندوانه ابوجهل؛ فلاونوئیدها.

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Mirzaei N, Kolahi M, Mokhtari B. A Phytochemical Study and Comparison of the Effect of *Citrullus Colocynthis* Extracts on Colon Cancer Cells Caco-2. Qom Univ Med Sci J 2020;14(5):1-11. [Full Text in Persian]

www.SID.ir

International License Creative Commons Attribution License 4.0

Archive of SID

مقدمه

گیاهان دارویی در طول تاریخ همواره موردتوجه بشر بوده‌اند و آثار دارویی و موارد استفاده آن در طب سنتی قابل‌توجه بوده است (۱). مواد شیمیایی گیاهان ازجمله متابولیت‌های ثانویه نظیر ترکیب‌های فنولیک، ترپنوئیدها و آلکالوئیدها به‌طور گسترده در صنایع غذایی و دارویی مصرف می‌شوند. در سال‌های اخیر طبق اعلام سازمان بهداشت جهانی (WHO: World Health Organization)، کاربرد گیاهان دارویی و سنتی در درمان بیماری‌ها معمول شده است (۲). طی سال‌های گذشته به علت توجه ویژه‌ای که در ایران و سایر نقاط جهان به داروهای گیاهی و مواد طبیعی شده است، فعالیت‌های زیادی برای استخراج، خالص‌سازی و تعیین ساختمان مولکولی ترکیبات به‌دست‌آمده از گیاهان صورت گرفته است (۳).

سرطان روده یکی از سرطان‌های عمده دستگاه گوارش شناخته می‌شود. میزان مرگ‌ومیر ناشی از این بیماری در بین سرطان‌های دیگر یکی از بیشترین ارقام را به خود اختصاص داده است. شیوع سرطان روده در ایران روبه افزایش است. این سرطان رتبه چهارم را بین کل بیماری‌های سرطانی و رتبه دوم را بین سرطان‌های دستگاه گوارش دارد. عوارض راه‌های درمانی مختلف نظیر شیمی درمانی، رادیوتراپی و جراحی به اشکال مختلفی است. امروزه دانشمندان در حال بررسی و یافتن مواد غذایی طبیعی هستند که بتوانند از بروز سرطان پیشگیری کنند؛ بنابراین، پژوهش در رابطه با منابع طبیعی برای به‌کارگیری منابعی با حداقل عوارض جانبی اهمیت دارد (۲). معالجه و درمان بیماری‌ها با گیاهان دارویی از دیرباز معمول بوده است؛ زیرا منابع طبیعی گیاهان معمولاً فراوان و ارزان است (۴،۵).

استخراج ترکیبات مؤثره گیاهان دارویی، به روش‌های متفاوتی انجام می‌شود؛ ازجمله این روش‌ها می‌توان به عصاره‌گیری به روش سوکسله، اولتراسونیک و ماسراسیون اشاره کرد. هرکدام از این روش‌ها مزایا و معایب خاص خود را دارد. سادگی و آسان‌بودن، در تماس بودن مداوم حلال تازه با پودر گیاهی، عدم فیلتراسیون و استفاده از دمای زیاد که منجر به افزایش حلالیت ترکیبات کم محلول در دمای کم می‌شود، از مهم‌ترین مزایای روش سوکسله در عصاره‌گیری است (۴،۶).

فراورده‌های طبیعی که خواص ضدسرطانی دارند، گستره وسیعی از مکانیسم‌ها را شامل می‌شوند. ازاین‌رو امروزه گیاهان دارویی منابع طبیعی ارزشمندی محسوب می‌شوند که موردتوجه کشورهای پیشرفته جهان قرار گرفته‌اند و به‌عنوان مواد اولیه برای تبدیل‌شدن به داروهای بی‌خطر برای انسان تلقی می‌شوند (۳). هندوانه ابوجهل با نام علمی *Citrullus Colocynthis* L. میوه‌ای تلخ از راسته کدوئی‌ها (Cucurbitales) از تیره کدو (Cucurbitaceae) است. نام‌های دیگر هندوانه ابوجهل، حنظل، کدوی تلخ و سیب تلخ است. رشد این میوه در نواحی لرستان، اهواز، کازرون، کرمان، خراسان، کویر لوت و یزد در تپه‌های ماسه‌ای پراکندگی دارد (۷).

از مواد تشکیل‌دهنده هندوانه ابوجهل می‌توان به ترکیبات مهمی ازجمله ساپونین‌ها (Saponins)، کولوسینتین (Colocynthin)، آلکالوییدها (Alkaloids)، گلیکوزیدها (Glycosides) و سیترولین (Citrulline) یاد کرد. ازجمله خواص درمانی سنتی میوه گیاه، اثر ضددرد و کاهنده التهاب است. عصاره هندوانه ابوجهل اثر ضدباکتریایی و ضدکاندیدیایی دارد که علیه بسیاری از باکتری‌های بیماری‌زا می‌تواند این اثر را از خود نشان دهد (۷). میوه این گیاه، گلوکوزید قابل تبلوری با طعم بسیار تلخ به نام کولوسنتین دارد. میوه این گیاه علاوه بر موارد مذکور سیترولین، ماده روغنی، مواد صمغی و املاح مختلف دارد. کولوسنتین موجود در گیاه برای بیماری‌های متعددی ازجمله آسیت‌ها، سرطان، هپاتیت، لوسمی و تومورها استفاده شده است. عصاره تام هندوانه ابوجهل بر سلول‌های سرطان حنجره مؤثر است (۸). میوه این گیاه تلخ و لعاب‌دار است و خاصیت مسهلی قوی با اثر قاطع دارد. علاوه‌براین، میوه این گیاه در درمان دیابت و سرطان استفاده می‌شود و اثرات ضدباروری میوه آن نیز به اثبات رسیده است. (۸).

این پژوهش با هدف شناسایی مقدماتی ترکیبات فیتوشیمیایی تشکیل‌دهنده میوه هندوانه ابوجهل (عصاره‌ای پولپ، پوست و دانه این گیاه) و بررسی خواص ضدسرطانی و آنتی‌اکسیدانی چهار نوع عصاره اتانولی و ان-هگزانی به دو روش سوکسله و خیساندن و همچنین انتخاب بهترین روش و حلال صورت گرفت.

www.SID.ir
International License Creative Commons Attribution License 4.0

Archive of SID

روش بررسی

این تحقیق در مرکز گیاهان دارویی دانشکده داروسازی اهواز انجام پذیرفت. میوه هندوانه ابوجهل به مدت یک هفته به دور از تابش مستقیم نور خورشید خشک شد. سپس میوه خشک‌شده به آسیاب منتقل شد. پس از ۱۵ دقیقه محتویات درون آسیاب از الک با مش ۲۵۰ میکرون عبور داده شد.

بررسی‌های فیتوشیمیایی

آزمون‌های فیتوشیمیایی مقدماتی روی میوه هندوانه ابوجهل پودرشده با استفاده از روش‌های استاندارد برای شناسایی متابولیت‌های ثانویه انجام گرفت (۹). این آزمون‌ها برای بررسی ترکیبات گیاهی شامل آلکالوئیدها، ساپونین‌ها، فلانوئیدها، تانن‌ها، استروئیدها، تری‌ترپنوئیدها، کربوهیدرات‌ها، ویتامین C و پروتئین صورت گرفت. در تمام روش‌ها از محلول بدون عصاره به‌عنوان شاهد برای ارزیابی صحت آزمون استفاده شد. همچنین به‌منظور ارزیابی دقت، این آزمون‌ها سه بار تکرار شد. آزمایش‌های شناسایی مقدماتی ابزار مناسبی برای بررسی‌های بیشتر باز می‌کند.

شناسایی آلکالوئید

۰/۵ گرم از پودر گیاهی با ۱ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک به مدت ۵ دقیقه درون حمام آب گرم حرارت داده شد. پس از صاف‌کردن روی یک قطره از محلول نمونه تهیه‌شده معرف مایر و قطره دیگر معرف واگنر اضافه شد. در صورت وجود آلکالوئید رسوب ایجاد می‌شود (۹،۱۰).

شناسایی تانن

الف- واکنش رنگی با محلول آهن (III) کلرید

۰/۲ گرم از عصاره در ۵ میلی‌لیتر آب رقیق شد. سپس با چند قطره محلول آهن (III) کلرید ۵ درصد تست شد. تغییر رنگ محلول به آبی یا سبز نشان‌دهنده تانن است (۹).

ب- واکنش ایجاد رسوب با محلول استات سرب

۰/۱ گرم از عصاره با چند قطره محلول استات سرب ۱۰ درصد حجمی-وزنی ارزیابی شد. ایجاد رسوب زردرنگ نشان‌دهنده حضور ترکیبات تانئی است (۹).

شناسایی استروئیدها

عصاره با مقداری کلروفرم رقیق و ۲ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک غلیظ به آن اضافه شد. تشکیل رنگ قرمز نشانه وجود عصاره حاوی استروئید است (۱۱).

شناسایی ترپنوئید

۱. آزمون لیبرمن بورشارد (Liebermann–Burchard test): عصاره با کلروفرم رقیق و چند قطره استیک انیدرید و سولفوریک اسید به آن اضافه شد. تشکیل لایه قهوه‌ای‌رنگ نشان‌دهنده حضور ترپنوئیدهاست (۱۲).

۲) آزمون سالکوسکی (Salkowski's test): عصاره با کلروفرم رقیق و چند قطره سولفوریک اسید غلیظ به آن اضافه شد. تشکیل لایه قهوه‌ای‌رنگ مایل به قرمز نشان‌دهنده حضور ترپنوئیدهاست (۱۳).

شناسایی ساپونین

۰/۵ گرم از پودر گیاهی با ۱۰ میلی‌لیتر آب جوش مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه تکان داده شد. با ایجاد کف پایدار به ارتفاع حداقل ۱ سانتی‌متر جواب آزمون مثبت است (۹).

شناسایی فلاونوئیدها

الف) ۰/۵ گرم عصاره در ۱/۵ میلی‌لیتر اتانول حل و ۰/۵ گرم پودر روی و ۵ قطره اسیدکلریدریک غلیظ به آن اضافه شد. وجود رنگ قرمز نشان‌دهنده وجود آنتوسیانین و ترکیب‌های فلاونوئیدی است (۱۴).

ب) چند قطره محلول سدیم هیدروکسید به عصاره اضافه شد. ایجاد رنگ زرد نشان‌دهنده حضور ترکیبات فلاونوئیدی است (۱۴).

شناسایی پروتئین‌ها

برای شناسایی پروتئین‌ها در عصاره از معرف Biuret (محلول سدیم هیدروکسید به همراه ۲ قطره محلول مس سولفات ۱ درصد) استفاده شد. تشکیل رنگ بنفش نشان‌دهنده وجود پروتئین

www.SID.ir
International License Creative Commons Attribution License 4.0

Archive of SID

است (۱۳).

شناسایی ویتامین C

شناسایی ویتامین C با استفاده از آزمون DNPH (محلول سولفوریک اسید غلیظ در ۲ و ۴ دی نیترو فنیل هیدرازین (Dinitrophenylhydrazine-4،2)) انجام شد. ایجاد رسوب زرد نشان‌دهنده ویتامین C در عصاره است (۱۲).

عصاره‌گیری از گیاه

پس از شناسایی مواد شیمیایی اصلی میوه هندوانه ابوجهل، به‌منظور بررسی اثر عصاره این میوه بر بقای سلول‌های سرطانی کولون، از دو روش خیساندن و سوکسله با دو حلال اتانول و ان-هگزان استفاده شد.

روش ماسرسیون: تهیه عصاره‌ها با روش غوطه‌وری در دو حلال اتانول ۹۶ درصد و ان-هگزان انجام گرفت. بدین منظور ۵۰ میلی‌لیتر حلال به ۱۵ گرم پودر میوه هندوانه ابوجهل در یک ارلن در بسته افزوده و مخلوط حاصل به مدت ۷۲ ساعت با همزن مغناطیسی محلول هم زده شد. پس از مدت‌زمان فوق، عصاره‌های حاصل به‌وسیله کاغذ صافی معمولی از بخش جامد جدا شدند. عصاره‌های اتانولی و ان-هگزانی ابتدا به‌وسیله تبخیرکننده چرخان و تحت خلأ تغلیظ و تا زمان استفاده در ویال‌های شیشه‌ای کهربایی در فریزر ۲۵-درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند (۱۴).

روش استخراج مداوم (سوکسله): مقدار ۱۰ گرم از پودر گیاه به‌دقت وزن و در انگشتانه دستگاه سوکسله ۱۰۰ میلی‌لیتری ریخته شد. سپس با استفاده از ۲۵۰ میلی‌لیتر از حلال‌های اتانول ۹۶ درصد و ان-هگزان عمل عصاره‌گیری به مدت ۸ ساعت انجام شد. پس از کامل‌شدن فرایند عصاره‌گیری، حلال تحت خلأ تبخیر شد. عصاره‌های استخراج‌شده تا زمان استفاده در ویال‌های شیشه‌ای کهربایی در فریزر ۲۵- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۱۱).

کشت سلولی

رده سلولی آدئوکارسینومای اپی‌تلیال روده بزرگ انسانی CaCO2، (NCBI code: C139) از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. سلول‌ها در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم گاوی (FBS) در فلاسک کشت سلولی ۲۵cm^2 (Nunc دانمارک) و در شرایط مناسب در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO2 ۵ درصد کشت داده شدند (۱۵).

بررسی تیمار و سمیت عصاره میوه هندوانه ابوجهل با روش MTT assay

به‌منظور بررسی اثر عصاره میوه هندوانه ابوجهل بر رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی از روش رنگ‌سنجی MTT استفاده شد. این روش بر اساس توانایی سلول‌های زنده در تبدیل نمک تترازولیوم به فورمازان نامحلول بنا شده است. برای انجام آزمایش، سلول‌های CaCO2 در پلیت ۹۶ خانه‌ای و در هر خانه $۱۰^۳ \times ۴$ سلول در حجم ۱۵۰ میکرولیتر محیط DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) کشت داده شدند. در سه چاهک به‌عنوان شاهد صفر فقط ۱۵۰ میکرولیتر محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد FBSافزوده شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، سلول‌ها با انواع عصاره‌های میوه هندوانه ابوجهل تیمار شدند. از محلول (MTT ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) ۲۰ میکرولیتر در هر خانه ریخته شد. بعد از ۳/۵ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، محلول رویی حذف و ۱۵۰ میکرولیتر حلال MTT (۱۵ میلی‌لیتر ایزوپروپانول و ۲۰ میکرولیتر HCl) اضافه شد. بعد از ۱۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق و حل‌شدن کامل کریستال‌ها، با دستگاه خوانش الایزا جذب نوری نمونه‌ها در ۵۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. همه‌ی آزمایش‌ها به‌صورت سه‌تایی انجام شد (۱۵).

آزمون NBT (Nitro Blue Tetrazolium)

سلول‌های CaCO2 با غلظت ۲×۱۰۵ در میلی‌لیتر در پلیت‌های ۲۴ حفره در محیط DMEM حاوی FCS (Fetal Calf Serum) ۱۰ درصد کشت داده شدند. به‌منظور بررسی میزان کاهش ROSها در سلول‌های تیمارشده ۲۰۰ میکرولیتر NBT به حفره‌ها اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. پلیت به مدت ۵ دقیقه در یخ گذاشته و دوباره به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و

www.SID.ir
International License Creative Commons Attribution License 4.0

Archive of SID

سوچ رویی دور ریخته شد و سلول‌های با ۵۰۰ میکرولیتر PBS (Phosphate-buffered Saline) شست‌وشو و سانتریفوژ شدند. محیط رویی دور ریخته شد و روی رسوب متانول ۷۰ درصد ریخته شد و سلول‌ها ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. وقتی سلول‌ها ثابت شدند، دوباره محیط رویی دور ریخته شد و روی سلول‌ها ۲۰۰ میکرولیتر KOH ۲ مولار ریخته شد. در آخر به هر حفره ۲۵ میکرولیتر DMSO (Dimethyl sulfoxide) اضافه و جذب در ۶۲۰ نانومتر خوانده شد (۱۶).

تحلیل داده‌های آماری

تحلیل داده‌های آماری بر اساس طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون دانکن در سطح احتمال آماری P<۰/۰۵ انجام گرفت. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel رسم شدند.

یافته‌ها

نتایج به‌دست‌آمده از بررسی‌های مقدماتی فیتوشیمیایی، حضور ترکیب‌های فلاونوئیدی، آلکالوئیدی، ترپنوئید، ویتامین C و پروتئین را در میوه هندوانه ابوجهل تأیید می‌کند، درحالی‌که ترکیب‌های استروئیدی، تانن و ساپونین در این میوه یافت نشد. نتایج این بررسی‌های فیتوشیمیایی در جدول ۱ ارائه شده است.

نتایج سنجش توانایی زیستی سلول‌ها به روش MTT

از مقایسه داده‌های به‌دست‌آمده از سنجش درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی تیمارشده با عصاره اتانولی و عصاره ان-هگزانی به روش‌های ماسراسیون و استفاده از دستگاه سوکسله مشخص شد تفاوت میانگین درصد زنده‌مانی سلول‌ها در زمان ۲۴ ساعت در گروه‌های تیمارشده با هر چهار عصاره (عصاره‌های اتانولی و ان-هگزانی به دو روش سوکسله و ماسراسیون) نسبت به گروه کنترل در سطح P< ۰/۰۵ معنی‌دار بود. میانگین زنده‌مانی سلول‌های تیمارشده با عصاره اتانولی به روش سوکسله اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه تیمار با عصاره ان-هگزانی به روش ماسراسیون در اندازه‌گیری درصد بقای سلول نشان داد. میانگین زنده‌مانی سلول‌های تیمارشده عصاره ان-هگزانی به روش سوکسله اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه تیمار با عصاره اتانولی به روش ماسراسیون در اندازه‌گیری درصد بقای سلول نشان نداد. میزان میانگین زیستی سلول‌های تیمارشده با عصاره ان-هگزانی به روش ماسراسیون با اختلاف معنی‌داری بیشتر از عصاره‌های دیگر بود. کمترین میزان ممانعت‌کنندگی مربوط به عصاره اتانولی با دستگاه سوکسله دیده شد (P<۰/۰۵) (شکل ۱).

نتایج اندازه‌گیری درصد رادیکال‌های آزاد NBT (Nitro Blue Tetrazolium)

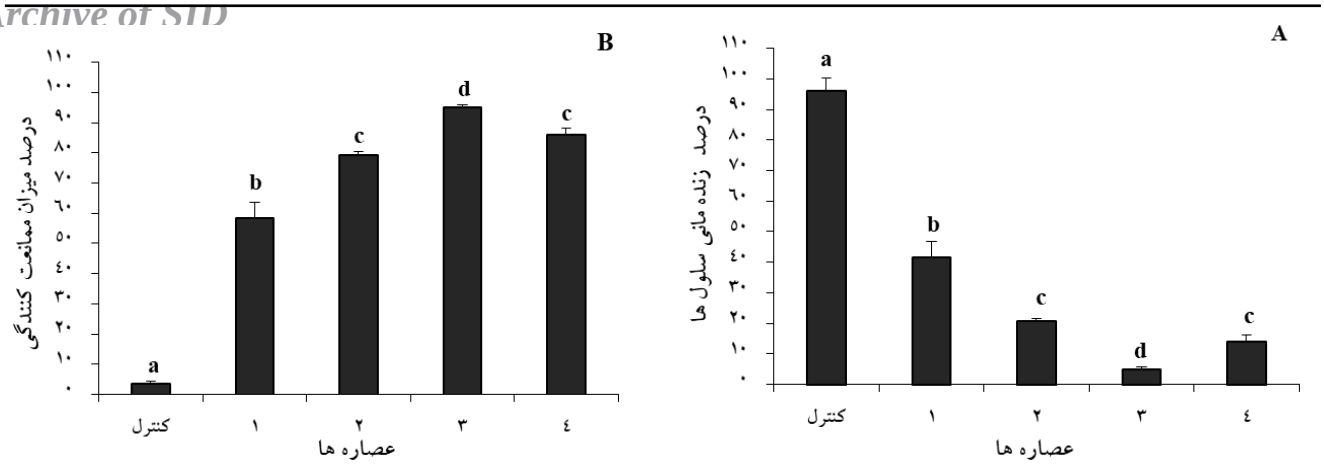
از مقایسه داده‌های به‌دست‌آمده از میزان درصد رادیکال‌های آزاد سلول‌های سرطانی تیمارشده با عصاره اتانولی و عصاره ان-هگزانی به روش‌های ماسراسیون و استفاده از دستگاه سوکسله مشخص شد تفاوت میانگین میزان کاهش NBT در زمان ۲۴ ساعت در گروه‌های تیمار نسبت به گروه کنترل در سطح P<۰/۰۵ معنی‌دار بود. بیشترین میزان کاهش درصد رادیکال‌های آزاد مربوط به گروه تیمارشده با ان-هگزانی به روش ماسراسیون بود. بین میزان فعالیت رادیکال‌های آزاد در سلول‌های تیمارشده با عصاره اتانولی به روش سوکسله و عصاره‌های ان-هگزانی به روش ماسراسیون اختلاف معنی‌داری دیده نشد. درصد کاهش NBT در سلول‌های تیمارشده عصاره اتانولی به روش ماسراسیون و گروه تیمار با عصاره ان-هگزانی به روش سوکسله اختلاف

جدول شماره ۱: بررسی‌های فیتوشیمیایی روی پوست و دانه میوه هندوانه ابوجهل

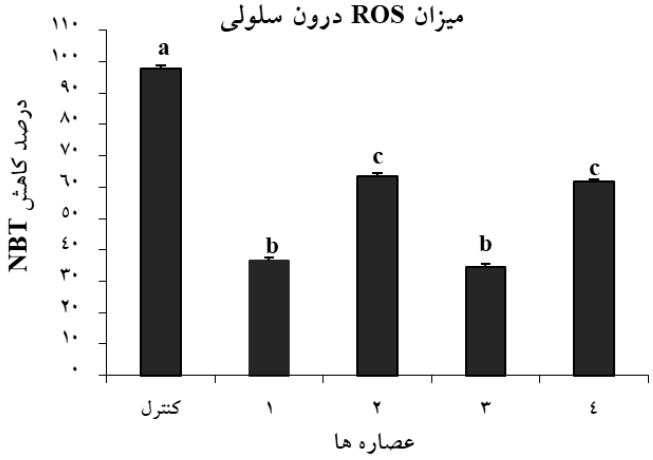
مواد مؤثره	پروتئین	ویتامین C	استروئید	تانن	ساپونین	ترپنوئید		فلانوئید		آلکالوئید	
آزمون‌های انجام‌شده	معرف Biuret	آزمون DNPH	استفاده از اسیدسولفوریک	آزمون کلروفرم یک	آزمون استات سرب	آزمون کف‌کنندگی	آزمون سالکوسکی	آزمون سدیم هیدروکسید	آزمایش Pew	آزمون واگنر	آزمون مایر
پوست و دانه میوه هندوانه ابوجهل	+	کم	-	-	-	-	+	+	+	+	+

www.SID.ir
International License Creative Commons Attribution License 4.0

Archive of SID



شکل شماره ۱: سنجش توانایی زیستی سلول‌ها به روش MTT در عصاره اتانولی با استفاده از دستگاه سوکسله (۱)، عصاره ان-هگزانی با استفاده از دستگاه سوکسله (۲)، عصاره ان-هگزانی به روش ماسراسیون (۳) و عصاره اتانولی به روش ماسراسیون (٤). حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ است



شکل شماره ۲: درصد کاهش NBT در عصاره اتانولی با استفاده از دستگاه سوکسله (۱)، عصاره ان-هگزانی با استفاده از دستگاه سوکسله (۲)، عصاره ان-هگزانی به روش ماسراسیون (۳) و عصاره اتانولی به روش ماسراسیون (٤). حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ است

معنی‌داری مشاهده نشد. همچنین میزان فعالیت رادیکال‌های آزاد در عصاره‌های ان-هگزانی به روش سوکسله و ماسراسیون اختلاف معنی‌داری داشتند. همچنین میزان فعالیت عصاره‌های اتانولی به دو روش سوکسله و ماسراسیون اختلاف معنی‌داری نشان دادند (P<۰/۰۵) (شکل ۲).

بحث

ازآنجاکه برای هندوانه ابوجهل اثرات سیتوتوکسیک و ضدسرطانی پیشنهاد شده است، در این تحقیق شناسایی مقدماتی ترکیبات فیتوشیمیایی تشکیل‌دهنده میوه هندوانه ابوجهل (عصاره‌ای پولپ، پوست و دانه این گیاه) و بررسی خواص ضدسرطانی و آنتی‌اکسیدانی چهار نوع عصاره اتانولی و ان-هگزانی به دو روش سوکسله و خیساندن بررسی شد.

این مطالعه به بررسی فیتوشیمیایی گیاه هندوانه ابوجهل با تأکید بر شناسایی ترکیبات مختلف پرداخته است. نتایج آزمون‌های فیتوشیمیایی حضور ترکیبات مختلف ازجمله ترکیبات فلاونوئیدی، آلکالوئیدی، ترپنوئید، آلدهید، کتون‌ها، ویتامین C (به مقدار خیلی کم) و پروتئین این گیاه را نشان می‌دهد. بررسی ویژگی ضدسرطانی دو روش مرسوم عصاره‌گیری و استفاده از حلال‌های مختلف بیانگر وجود ترکیبات متنوع در عصاره‌های متفاوت است. یافته‌های زیست‌سنجی سلول‌های تحت تیمار عصاره و مقایسه آن‌ها با نتایج میزان توان خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد سلول‌های سرطانی در معرفی بهترین روش عصاره‌گیری، تعیین حلال مناسب و چگونگی و سازوکار تأثیر عصاره بر

www.SID.ir
International License Creative Commons Attribution License 4.0

Archive of SID

زنده‌مانی سلول‌های سرطانی اهمیت ویژه‌ای دارد. تأثیر روش‌ها و حلال‌های مختلف بر میزان توان ضدسرطانی عصاره گیاه در این مطالعه ضروری بود که موجب حصول اطمینان از وجود ترکیبات فعال زیستی در عصاره‌های مختلف و امکان استفاده از این روش‌ها برای اهداف درمانی و کاربرد آن در سنتز داروهای گیاهی است.

امروزه در بسیاری از کشورها نیمی از مرگ‌ها به دلیل بیماری‌های قلبی‌عروقی و حدود یک‌چهارم مرگ‌ها به دلیل سرطان است. سرطان مشکل مهمس اشت که بهداشت عمومی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۲). با وجود پیشرفت‌های فراوان در زمینه کنترل و درمان بیماری‌های بدخیم ازجمله سرطان‌ها، پژوهش‌های زیادی برای شناخت مکانیسم‌های درگیر در رشد آن‌ها (از طریق تکثیر سلولی یا رگ‌زایی) و ساخت و تولید داروهای مؤثر صورت می‌گیرد. از طرفی گیاهان دارویی بخش وسیعی از این پژوهش‌ها را به خود اختصاص داده‌اند (۱۷،۱۸). در سال‌های اخیر گیاهان دارویی در موارد زیادی برای تحقیقات ضدسرطانی بررسی شده‌اند. این گیاهان به‌واسطه مواد فیتوکمیکال با اثرات جانبی کم گزینه‌های خوبی برای درمان سرطان هستند. در حال حاضر، هزاران متابولیت گیاهی به‌طور موفقیت‌آمیزی برای درمان بیماری‌های مختلف استفاده می‌شوند (۴).

مقایسه ترکیبات استخراج‌شده از میوه هندوانه ابوجهل در این مطالعه با سایر تحقیقات انجام‌شده نشان می‌دهد با توجه به تکنیک استخراج و نوع حلال مقادیر متفاوتی از ترکیبات فلاونوئیدی، تانینی، اسیدهای چرب و ویتامین C گزارش شده است که به لحاظ آماری قابل‌مقایسه هستند (۴). بر اساس مطالعه کوکو و همکاران عصاره اتانولی ۸۰ درصدی میوه‌های هندوانه ابوجهل فاقد آلکالوئیدها، آنتروکیون‌ها، کومارین‌ها و تانن‌ها بودند، اما حاوی فلاونوئیدها و ترپنویدها هستند که با مطالعه حاضر همخوانی ندارد (۱۸).

ریشه این گیاه حاوی آلکالوئید فلاونوئید ترپنیوئید گلیکوزید اما فاقد ساپونین‌ها و آنتروکیونین است (۱۹). عصاره آبی-الکلی ۸۰ درصد برگ‌های گیاه هندوانه ابوجهل و همچنین میوه‌ها نشان داد این عصاره حاوی آلکالوئید فلاونوئید گلیکوزید و ساپونین‌ها و ساپونوزوئیدها است (۲۰). تفاوت در نتایج این مطالعات می‌تواند مربوط به تفاوت در اقلیم منطقه کشت گیاه، ترکیبات خاک و شرایط اقلیمی باشد. همچنین توزیع ترکیبات فیتوشیمیایی از قبل ساپونین‌ها، تانن‌ها، فلاونوئیدها و آلکالوئیدها ممکن است در بخش‌های مختلف گیاه ازجمله برگ، میوه، دانه و ریشه متفاوت باشد.

عریان و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان دادند دانه گیاه هندوانه ابوجهل به‌طور معنی‌داری میزان گلوکز خون را در مقایسه با گروه کنترل دیابتی کاهش می‌دهد (۲۱). در مطالعه دیگر، مولکول‌های زیستی عملکردی گیاه هندوانه ابوجهل با استفاده از روش‌های تجزیه HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) بررسی و وجود این ترکیبات به فعالیت ضدسرطانی و ضدمیکروبی این عصاره توجیه شد. همچنین عصاره خاصیت ضدقارچی زیادی را نشان داد.

عبدالحسن و همکاران نشان دادند عصاره گیاه هندوانه ابوجهل خاصیت کاهنده قند خون دارد و این اثرات به وجود ترکیبات گلیکوزیدی و ساپونینی در این گیاه مربوط می‌شود (۲۲). مخرجی و همکاران نشان دادند ساپونین‌ها به‌عنوان ترکیبات فعال موجود در این گیاه موجب خاصیت دارویی این گیاه می‌شوند (۲۳). این مطالعات تأییدی بر استفاده سنتی از گیاه هندوانه ابوجهل به‌عنوان گیاه دارویی است. مخرجی و همکاران در سال ۲۰۱۲ عصاره میوه گیاه هندوانه ابوجهل غنی از ترکیبات آلکالوئیدی را از دو جهت بررسی کردند؛ در مرحله اول اثر سیتوتوکسی این عصاره را روی آرتمیا مطالعه کردند و میزان LC50 آن را ۳/۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش کردند که این ویژگی به‌واسطه حضور ترکیبات شیمیایی با خاصیت سمیت زیاد ازجمله آلکالوئیدها در این عصاره است که با نتایج فیتوشیمیایی این تحقیق همخوانی دارد. در مرحله دوم این تحقیق اثر ضدسرطانی این عصاره را روی دو نوع سلول سرطانی MCF7 و HEPG2 بررسی کردند و میزان LC50 آن را ۱۷/۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر تشخیص دادند. همچنین این بررسی نشان داد آزمون‌های فیتوشیمیایی بیانگر وجود آلکالوئیدهایی هستند که به‌صورت آنالوگ‌های پیریدین و

www.SID.ir
International License Creative Commons Attribution License 4.0

Archive of SID

پیریمیدین در این عصاره حضور دارند (۲۳).

در مطالعه حاضر تمامی عصاره‌های به‌دست‌آمده از هندوانه ابوجهل خواص سیتوکسی خوبی نشان دادند. نتایج حاصل از سنجش توانایی زیستی نشان می‌دهد کمترین بقای سلول‌های سرطانی تیمارشده مربوط به عصاره ان-هگزانی به روش ماسراسیون بوده است. حلال ان-هگزان دمای جوش بین ۶۳ تا ۶۹ درجه سانتی‌گراد دارد. علاوه‌برآن حلالیت مواد روغنی، اسیدهای چرب و تانن‌ها در آن زیاد است (۲۴). این یافته‌ها نشان می‌دهد تغییر پارامترهای مختلف بر استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدان با خواص مختلف تأثیرگذار است. روش استخراج عصاره از گیاه می‌تواند بازده استخراج، درصد، نوع ترکیبات شیمیایی و فعالیت‌های بیولوژیکی در آن‌ها را تغییر دهد (۲۵). روش سوکسله علاوه بر ساده و آسان بودن عصاره‌گیری، به دلیل تماس مداوم حلال استخراجی با پودر گیاهی و استفاده از حرارت به افزایش حلالیت ترکیبات کم محلول در دمای پایین منجر شده است (۴). درنتیجه میزان ترکیبات فنلی استخراج‌شده به این روش بیشتر از روش خیساندن است.

مطالعات Osman و Galal در سال ۲۰۰۵ و همچنین Osmun در سال ۲۰۰۹ روی این گیاه نشان داد وجود فلاونوئیدها و خاصیت ضدمیکروبی آن‌ها به‌واسطه شکل‌گیری کمپلکسی بین دیواره سلولی و اثر آن بر تمامیت غشای سلول از طریق فرایند خنثی‌سازی رادیکال آزاد اعمال می‌شود (۱۸،۱۹).

Benariba و همکاران در سال ۲۰۱۳ طی مطالعه فیتوشیمیایی و خاصیت اسکوینگ رادیکال‌های آزاد روی عصاره دانه‌های گیاه هندوانه ابوجهل نشان دادند عصاره‌های مختلف این گیاه حاوی مواد شیمیایی کتکین‌ها، تانن‌های کتکین، فلاونوئیدها، کومارین‌ها، پلی‌فنل‌ها ازجمله گالیک اسید، کوئرستین و میرستین است که این مواد با کروماتوگرافی لایه نازک مشخص شدند. همچنین خاصیت آنتی‌اکسیدانی این عصاره با استفاده از روش DPPH بررسی شد که میزان IC50 آن ۳۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود که در مقایسه با این پارامتر برای آسکوربیک اسید به‌عنوان کنترل گزارش شد. این بررسی‌ها نشان داد عصاره روغنی دانه‌های هندوانه ابوجهل غنی از اسیدهای چرب غیراشباع (۸۰ تا ۸۵ درصد) به‌ویژه اولیئک اسید با میزان حدود ۱۳/۱ درصد و اولینولنیک اسید در حدود ۷۰ درصد است (۲۶).

به نقل از عبدالشاهی در سال ۲۰۱۵ Gill و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان دادند عصاره متانولی این گیاه پتانسیل استفاده به‌عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی را دارد. این مطالعات با استفاده از روش DPPH انجام شد. مطالعات فیتوشیمیایی این گیاه نشان داد حضور فراوان فلاونوئیدها در این گیاه مربوط به اثرات خنثی‌کننده رادیکال‌های آزاد است (۲۷). در بررسی میزان کاهش رادیکال آزاد در سلول‌های تیمارشده به روش NBT مشخص شد عصاره میوه هندوانه ابوجهل فعالیت به‌دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد هیدروکسیل و آنیون‌های سوپراکسید دارد که این ویژگی مربوط به آنتوسیانین‌ها و ترکیبات پلی‌فنلی موجود در عصاره است (۶). این ترکیبات توان کلایته‌کردن فلزات را دارند. نتایج آزمون NBT در این پژوهش نشان داد عصاره ان-هگزانی با استفاده از دستگاه سوکسله و عصاره اتانولی به روش ماسراسیون کمترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی را دارد. در این روش‌ها حلال مدنظر بسیاری از ترکیبات پلی‌فنلی و فلاونوئیدی را در خود حل می‌کند که این ترکیبات نقش مهمی در جذب رادیکال‌های آزاد سلول‌ها دارند. طبق تحقیقات انجام‌شده روش سوکسله در استخراج اسیدهای چرب غیراشباع و روش ماسراسیون در استخراج اسیدهای چرب اشباع مؤثرتر است (۲۷) که این موضوع در حلالیت ترکیبات پلی‌فنولی تأثیرگذار است و در نتایج ترکیبات متفاوتی را نسبت به سایر روش‌ها استخراج می‌کند (۸).

سلطان و همکاران نشان دادند هر ۱۰۰ گرم دانه گیاه هندوانه ابوجهل حاوی ۱/۳۹ میلی‌گرم فلاونوئید، ۰/۵۲ میلی‌گرم ساپونوزید، ۱/۶۴ میلی‌گرم آلکالوئید، ۱/۶۴ میلی‌گرم ترکیبات فنولیک و ۳۰/۱۲ میلی‌گرم آسکوربیک اسید است. به‌طور مشابهی سلطان و همکاران در سال ۲۰۱۰ حضور آلکالوئیدها، استروئیدها، ترپنوئیدها، فلاونوئیدها، کومارین‌ها و گلیکوزیدها را در عصاره‌های هیدرومتانولی و متانولی مورد بررسی قرار داد (۲۸).

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج این تحقیق نوع حلال در جزئیات روش استخراج عصاره (مانند زمان استخراج، سرعت اختلاط، نسبت میزان پودر

www.SID.ir
International License Creative Commons Attribution License 4.0

Archive of SID

به حلال و اندازه ذرات پودر) بر میزان استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی تأثیر می‌گذارد. یافته‌ها نشان می‌دهد عصاره ان-هگزانی به روش ماسراسیون با ممانعت از رشد بیش از ۹۵ درصد از سلول‌های تیمارشده یکی از بهترین روش‌ها برای استفاده از این گیاه دارویی به‌منظور استخراج ترکیبات فعال زیستی است. با توجه به پتانسیل بالای این گیاه در ممانعت از رشد سلول‌های سرطانی، استفاده از ترکیبات موجود در بافت گوشتی میوه هندوانه ابوجهل به‌تنهایی یا همراه با داروهای ضدسرطان شیمیایی می‌تواند راهکاری نوین برای درمان سرطان باشد.

تشکر و قدردانی

نگارندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به‌خاطر تأمین هزینه‌های این پژوهش (پژوهانه‌های شماره ۹۳/۳/۲/۸۴۶۷۰ و ۹۳/۴/۱۲/۶۴۹۷۰) تشکر و قدردانی می‌کنند.

References:

1. Kadkhoda Z, Sedaghat S, Rezazadeh SA, NaghdiBadi HA, Taghizad Farid R, HaririAkbari F. Determination of alkaloids amount from Iranian *Papaver bracteatum* Lindl. by HPLC. Int J Med Herbal 2011;2(1):39-43. Link
2. Greenwell M, Rahman PK. Medicinal plants: their use in anticancer treatment. Int J Pharm Sci Res 2015;6(10):4103-12. PMID: 26594645
3. Mokhtari B, Kolahi M, Mirzaei N. A comparison study of extraction methods and mass spectrum for compounds in *Echinops dichrous* and comparison of effects of extracts on colon cancer cells CaCo2. J Med Plants 2017;2(62):145-57. Link
4. Noori S, Kiasat A, Kolahi M, Mirzajani R, Seyyed Nezhad SM. Survey of phytochemical, antioxidant and optimization of extraction methods for the best method determination of curcumin extraction from ethanol extracts of *Curcuma longa* L. Eco Phytochem J Med Plants 2016;4(3):1-11. Link
5. De Castro ML, Garcıa-Ayuso LE. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. Analyt Chim Acta 1998;369(1-2):1-10. Link
6. Monajemi R, Naghsh N, Kameli M. Comparison inhibitory effects of metabolic extract of *Citrullus Colocynthis* fruit and volatile oils of citrus medical peels on Hela cell line. J Exper Anim Biol 2014;2(2):45-51. Link
7. Moufida S, Marzouk B. Biochemical characterization of blood orange, sweet orange, lemon, bergamot and bitter orange. Phytochemistry 2002;62(8):1283-9. PMID: 12648552
8. Huseini HF, Darvishzadeh F, Heshmat R, Jafariazar Z, Raza M, Larijani B. The clinical investigation of *Citrullus colocynthis* (L.) schrad fruit in treatment of type II diabetic patients: a randomized, double blind, placebo-controlled clinical trial. Phytother Res 2009;23(8):1186-9. Link
9. Mahdavi MZ, Mirtajaddinni SM. Phytochemical evaluation of 30 plant species collected from Shahrbabak (Kerman/Iran). J Kerman Univ Med Sci 2006;13(2):95-102. Link
10. Kokate CK, Gokhale SB, Purohit AP. Textbook of pharmacognosy. 29th ed. Mumbai, India: Nirali Prakashan; 2009. P. 635. Link
11. Nasrabadi M, Halimi M, Nadaf M. Phytochemical screening and chemical composition of extract of *Muscari neglectum*. Middle East J Sci Res 2013;14(4):566-9. Link
12. Satheesh KB, Suchetha KN, Vadisha SB, Sharmila KP, Mahesh PB. Preliminary phytochemical screening of various extracts of *Punica granatum* peel. Whole fruit and seeds. Nitte Univ J Health Sci 2012;2(4):34-8. Link
13. Arora M, Kaur P. Phytochemical screening of orange peel and pulp. Int J Res Engin Technol 2013;12(2):517-22. Link
14. Kolahi M, Mokhtari B, Mirzaee N. A phytochemical study and comparison of the effect of pomegranate extracts spongy tissue on colon cancer cells Caco2. Jundishapur Sci Med J 2016;15(2):201-15. Link

www.SID.ir

International License Creative Commons Attribution License 4.0

Archive of SID

15. Khazraei-Moradian S, Andalib A, Ganjalikhani-Hakemi MA. The effect of protein extract of licorice root in proliferation of HT-29 and CT26 cancer cell lines. J Isfahan Med Sch 2014;32(298):1-9. Link

16. Freeman R, King B. A modification to the NBT test. Lancet 1971;2(7734):1154. PMID: 4107432

17. Dehghan G, Zarrini G, Hajizadeh M. Phytochemical investigation and antimicrobial, antifungal and synergistic activities of chloroform fractions of the root of *Ferula szovitsiana*. J Shahrekord Univ Med Sci 2013;15(6):10-7. Link

18. Osman EE, Galal M. Antioxidant and antiglycation potential of some Sudanese medicinal plants and their isolated compounds. Bol Latinoamericano Caribe Plantas Med Aromat 2009;8(5):402-11. Link

19. Suman S. Phytochemical investigation of *Sonchus oleraceus* leaves and *Citrullus colocynth* root. J Herbal Med Toxicol 2010;4(2):159-62. Link

20. Najafi S, Sanadgol N, Nejad BS, Beiragi MA, Ehsan S. Phytochemical screening and antibacterial activity of *Citrullus colocynthis* (Linn.) Schrad against *Staphylococcus aureus*. J Med Plant Res 2010;4(22):2321-5. Link

21. Oryan A, Hashemnia M, Hamidi AR, Mohammadalipour A. Effects of hydro-ethanol extract of *Citrullus colocynthis* on blood glucose levels and pathology of organs in alloxan-induced diabetic rats. Asian Pac J Trop Dis 2014;4(2):125-30. Link

22. Abdel-Hassan IA, Abdel-Barry JA, Tariq Mohammeda S. The hypoglycaemic and antihyperglycaemic effect of *Citrullus colocynthis* fruit aqueous extract in normal and alloxan diabetic rabbits. J Ethnopharmcal 2000;71(1-2):325-30. PMID: 10904181

23. Mukherjee PK, Maiti K, Mukherjee K, Houghton PJ. Leads from Indian medicinal plants with hypoglycemic potentials. J Ethnopharmacol 2006;106(1):1-28. PMID: 16678368

24. Tiwari P, Kumar B, Kaur M, Kaur G, Kaur H. Phytochemical screening and extraction: a review. Int Pharm Sci 2011;1(1):98-106. Link

25. Wang HW, Liu YQ, Wei SL, Yan ZJ, Lu K. Comparison of microwave-assisted and conventional hydrodistillation in the extraction of essential oils from mango (*Mangifera indica* L.) flowers. Molecules 2010;15(11):7715-23. PMID: 21042260

26. Benariba N, Djaziri R, Bellakhdar W, Belkacem N, Kadiata M, Malaisse WJ, et al. Phytochemical screening and free radical scavenging activity of *Citrullus colocynthis* seeds extracts. Asian Pac J Trop Biomed 2013;3(1):35-40. PMID: 23570014

27. Abdolshahi A, Majd MH, Rad JS, Taheri M, Shabani A, Teixeira da Silva JA. Choice of solvent extraction technique affects fatty acid composition of pistachio (*Pistacia vera* L.) oil. J Food Sci Technol 2015;52(4):2422-7. PMID: 25829628

28. Sultan A, Khan FU, Iqbal H, Khan MA, Khan IU. Evaluation of chemical analysis profile of *Citrullus colocynthis* growing in southern areas of Khyber Pukhtunkhwa Pakistan. World Appl Sci J 2010;10(4):402-5. Link

www.SID.ir
International License Creative Commons Attribution License 4.0