بررسی اثر حلال‌های مختلف بر استخراج ترکیبات فیتوشیمیایی گیاه دارویی *Azadirachta indica* A.Juss.

جواد علی‌صوفیان[۱]، مریم رحیمی[۲*]، زینب محکمی[۳]، علی قربانی رنجبری[٤]، فاطمه بیدرنامنی[۳]

[۱]دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

[۲]استادیار، گروه علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

[۳]استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پژوهشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

[٤]دانشجوی پسادکتری، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۰۰/۱۲/٦ ؛ تاریخ پذیرش: ۰۱/۰۱/۲۷

چکیده

گیاه دارویی چریش (*Azadirachta indica* A.Juss) متعلق به خانواده سنجد تلخ (Meliaceae) با عملکرد موثر در درمان بیماری‌های پوستی، هیپوگلیسمی، فشار خون، سرطان و ایدز است. در این تحقیق به منظور بررسی اثر حلال‌های مختلف برکمیت و کیفیت خصوصیات فیتوشیمیایی چریش جمع‌آوری شده از منطقه باهوکلات در شهرستان چابهار، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سال ۱٤۰۰ اجرا گردید. عصاره‌های اتانولی، متانولی، ان- هگزانی و استونی برگ و میوه چریش به روش خیساندن سرد تهیه و محتوای فنل کل به روش معرف فولین- سیوکالتو، فلاونوئید کل به روش رنگ‌سنجی کلرید آلومینیوم و فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش مهار رادیکال‌های آزاد دی‌فنیل‌پیکریل‌هیدرازیل (DPPH) اندازه‌گیری گردید. نتایج نشان داد که تأثیر نوع اندام، نوع حلال و اثر متقابل آن‌ها بر تمام صفات اندازه‌گیری‌شده معنی‌دار بود. در تحقیق حاضر بیشترین میزان فنل کل (٤۸/۲۲ میلی‌گرم گالیک اسید/گرم وزن خشک) در عصاره استونی برگ و کمترین میزان (۲/۷٦ میلی‌گرم گالیک اسید/گرم وزن خشک) در عصاره هگزانی میوه گزارش گردید. همچنین بیشترین میزان فلاونوئید کل در عصاره استونی میوه و برگ (به ترتیب با مقادیر ٤/۷۱ و ٤/٦۱ میلی‌گرم کوئرستین/گرم وزن خشک) و کمترین میزان (۳/۲۲ میلی‌گرم کوئرستین/ گرم وزن خشک) در عصاره هگزانی میوه مشاهده گردید. بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۹٤/۷۷ درصد) در عصاره اتانولی برگ سنجش گردید و کمترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۱۲/۰۲ درصد) در عصاره استونی میوه ملاحظه شد. بر اساس نتایج این تحقیق برگ چریش به عنوان منبع مفیدی از ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی پیشنهاد می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، استخراج، حلال، فنل و فلاونویید، چریش

*نویسنده مسئول: mrahimi@uoz.ac.ir

مقدمه

چریش با نام علمی *Azadirachta indica* A.Juss. و نام انگلیسی Neem متعلق به خانواده زیتون تلخ (Meliaceae) است (Deng et al., 2012). این درخت چندمنظوره در شبه‌قاره هند یافت می‌شود. درختی بزرگ و همیشه سبز است و می‌تواند تا ارتفاع ۲۰ متر و قطر ۲/۵ متر رشد نماید. این گیاه عمدتا در مناطق گرمسیر و نیمه‌گرمسیر آسیا، آفریقا، آمریکا، استرالیا و اقیانوس آرام به دلیل مقاومت در برابر خشکی شناخته شده است. سازگاری خوب با شرایط خشک (بارندگی کمتر از ۱۳۰ میلی‌متر در سال) موید این خاصیت است. این گیاه در طیف وسیعی از خاک‌های خنثی تا قلیایی رشد می‌کند؛ اما در خاک‌های کم عمق و سنگی بهترین رشد را دارد. رشد بهینه را در pH ٦ تا ۷/۲ داراست (Mathivanan et al., 2021). مناطقی که دارای دمای بالای ٤٠ درجه سانتی‌گراد هستند برای رشد و نمو این گیاه مطلوبند. این درخت در مناطق جنوبی ایران (استان‌های هرمزگان و سیستان و بلوچستان) به فراوانی کشت و کار می‌گردد. شاخه‌های آن منشعب و تاج متراکم و انبوه است. برگ‌ها مرکب و مشتمل بر ۱۰ تا ۱۲ برگچه (به طول ۷ سانتی‌مترو عرض ۲/۵سانتی‌متر) باریک و نوک‌تیز به رنگ سبز تیره، پوست شاخه‌های جوان سبزرنگ و رنگ پوست شاخه‌های پیر و قدیمی خاکستری تا خاکستری تیره است. این گیاه ۳ تا ۵ سال پس از کشت وارد فاز زایشی (تولید گل و میوه) می‌شود (Sahrawat et al., 2018). گل‌ها پنج قسمتی، منظم، کوچک و به رنگ سفید یا بنفش هستند. گل‌ها بوی مطبوع و کم و بیش شبیه یاس داشته و نکتار زیادی تولید می‌کنند. میوه چریش شفت، بیضی شکل و در مرحله رسیدن تیره رنگ و چروکیده می‌شود (Ghorbani Ghozhdi et al., 2021).

امروزه مواد موثره اندام‌های مختلف آن (مانند پوست، برگ و دانه‌ها) در صنایع داروسازی و آرایشی و بهداشتی کاربرد زیادی دارد. اثر بارز این گیاه، خاصیت حشره‌کشی آن است که به علّت وجود ترکیبات تری‌ترپنوئیدی (به ویژه لیمونوئیدها) در بذور این گیاه است. مهمترین این لیمونئیدها عبارتند از: آزادیراختین، سالانین و ملیانیترول (Omidbeigi, 2011). مواد موثره چریش بر سیستم هاضمه، اندوکرین و تولید مثل حشرات اثرگذار است (Khanavi et al., 2019). ترکیبات فیتوشیمیایی متفاوتی در این گیاه شناسایی شده‌اند شامل: گلیکوزیدها، دی هیدروچالکون، کومارین، تانن‌ها، آزادیراچتین، نیمبین، نیمبیدین، دی‌ترپنوئیدها، تری‌ترپنوئیدها، پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها، ترکیبات سولفوره، پلی‌فنل‌ها و... (Sahrawat et al., 2018).

بخش‌های مختلف درخت چریش، از جمله برگ‌ها، پوست، میوه، گل‌ها، روغن و صمغ در درمان برخی بیماری‌ها نظیر سرطان، فشار خون بالا، بیماری های قلبی و دیابت کاربرد دارد. اثرات بالقوه‌ای که هنگام استفاده از این عصاره‌ها مشاهده می‌شود؛ مطمئناً می‌تواند به مکانیسم‌های سلولی و مولکولی نسبت داده شود. این مکانیسم‌ها شامل مهار رادیکال‌های آزاد، سم‌زدایی، ترمیم DNA، تغییر چرخه سلولی، کاهش مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده و اتوفاژی، نظارت بر سیستم ایمنی، ضد التهاب، ضد فعالیت‌های رگ‌زایی و ضد متاستاتیک و توانایی تعدیل مسیرهای سیگنالی مختلف است (Ialas et al., 2020).

آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیب‌هایی هستند که به‌عنوان خنثی‌کننده رادیکال‌های آزاد عمل نموده و از بدن در مقابل آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو محافظت می‌کند (Parsons, 2017). تمایل به استفاده از منابع طبیعی که محتوی مقادیر بالای ترکیبات فنلی هستند؛

افزایش یافته است. این تمایل به دلیل نقش برجسته ترکیبات فنولی در مهار رادیکال‌های آزاد است. ترکیبات فنلی به طورکلی به دو گروه فنل‌های ساده (شامل یک حلقه بنزن متصل به حداقل یک گروه هیدروکسیل) و پلی‌فنل‌ها (شامل حداقل دو واحد فنلی مانند فلاونوئیدها یا ترکیباتی که شامل سه یا تعداد بیشتری واحد فنلی هستند مانند تانن‌ها) (Sultana et al., 2007).

گروهی از محققان اثر حلال‌های مختلف بنزن، استون، تولوئن، اتیل استات، اتانول و الکل بوتیل را بر استخراج ترکیبات فیتوشیمیایی عصاره‌ی برگ چریش نظیر ساپونین‌ها، تانن‌ها، فنل‌ها، پروتئین‌ها، گلیکوزیدها، ترپنوئیدها، کربوهیدرات‌ها، فلاونوئیدها، آلکالوئیدها ارزیابی نمودند. در مطالعه آن‌ها عصاره استونی بیشترین میزان مهارکنندگی رشد باکتری را نشان داد. به طوری‌که در برابر سویه‌های *E. coli*، ۵۸/۷۷ درصد مهار رشد را سبب شد (Sahrawat et al., 2018).

مطالعه دیگری نشان داد که عصاره متانولی گیاه دارویی چریش باعث ایجاد آپاپتوز در سلول‌های سرطانی پستان می‌شود (Elumalai et al., 2012). همچنین نتایج تحقیقی دیگر نشان داد که گیاه دارویی چریش با افزایش بیان کاسپاز باعث مهار سرطان در همستر می‌شود (Subapriya et al., 2005). طی تحقیقی اثر چندین حلال مختلف (اتانول، متانول، استون، هگزان) در میزان محتوای فنل و فلاونوئید گیاه خیار تلخ مورد ارزیابی قرار گرفت و گزارش شد که بهترین حلال برای استخراج ترکیب‌های فنلی حلال اتانول و پس از آن متانول، استون و هگزان بود. همچنین بیان شد که تفاوت در میزان محتوای فنل و فلاونوئیدی عصاره‌ها به دلیل تفاوت در قطبیت حلال‌هاست. بهینه‌سازی روش استخراج و حلال‌های مورد استفاده که باعث جداسازی نوع خاصی از ترکیبات شیمیایی می‌گردد یک عامل تعیین‌کننده و تأثیرگذار در اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی است (Wen and Liu, 2007). لذا در تحقیق حاضر از حلال‌های مختلف جهت عصاره‌گیری و اندازه‌گیری ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی استفاده شد. همچنین به‌منظور معرفی بهترین اندام گیاه چریش به‌عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی در اندام‌های برگ و میوه بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه گیاهی: نمونه برگ در فاز گلدهی (اردیبهشت) و نمونه میوه در فاز میوه‌دهی (شهریور) از نهالستان فرزاد واقع در منطقه باهوکلات شهر چابهار تحت نظارت سازمان جهاد کشاورزی استان سیستان و بلوچستان طی سال زراعی ۱۴۰۰ جمع‌آوری شده (شکل ۱) و پس از تأیید هویت توسط دکتر زینب محکمی (عضو هیأت علمی پژوهشکده کشاورزی زابل) به آزمایشگاه منتقل و نمونه هرباریومی با کد B-1504 تهیه گردید. نمونه‌ها در شرایط سایه و دمای معمولی اتاق خشک و توسط آسیاب‌برقی پودر شد و تا زمان عصاره‌گیری در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

تهیه عصاره‌های مختلف: ده گرم پودر برگ و میوه خشک شده چریش جهت تهیه عصاره‌های مختلف استفاده شد. به‌این ترتیب که با روش ماسراسیون سرد و با نسبت ۱۰:۱ (V/W) ماده خشک گیاهی و حلال (اتانول، متانول، ان-هگزان و استون) به‌طور جداگانه تهیه گردید. نمونه‌ها به‌مدت ٤٨ ساعت درون حلال و روی شیکر با دور ۱۲۰ دور در دقیقه در دمای اتاق خیسانده شد. پس از آن با کاغذ صافی واتمن NO. 1

صاف و جهت تغلیظ به دستگاه روتاری اواپوراتور با دمای ٤٥ درجه سانتی‌گراد انتقال یافت. پس از تغلیظ از این عصاره‌ها جهت استفاده در سنجش میزان فنل کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی استفاده گردید (Firouzkoohi et al., 2018).

سنجش میزان فنل کل: مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره‌های فوق‌الذکر، در لوله‌های آزمایش ریخته شد. ٤۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالتیو (رقیق‌شده با مقطر به نسبت ۱ به ۱۰) و ٤۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۷ درصد به مخلوط فوق اضافه شد. بعد از ۳۰ دقیقه نگهداری در دمای محیط، جذب نوری آن توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۷٦٥ نانومتر قرائت شد. در نهایت با قرار دادن مقدار جذب عصاره در معادله خطی مربوط به منحنی استاندارد گالیک اسید (۵، ۱۰، ۲۰ و ٤۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) مقدار فنل کل موجود در عصاره محاسبه شد (Li et al., 2015).

سنجش فلاونوئید کل: محتوای فلاونوئیدی عصاره متانولی به روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلراید اندازه‌گیری شد. در این روش ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره‌های فوق‌الذکر، ۱۰۰میکرولیتر محلول آلومینیوم کلراید (۱۰درصد)، ۱۰۰ میکرولیتر محلول استات پتاسیم یک مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر درون لوله آزمایش با هم مخلوط شد. نمونه‌ها به مدت ٤۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری گردید و سپس جذب مخلوط واکنش در طول موج ٤۱٥ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر قرائت شد. منحنی استاندارد بر اساس محلول کوئرستین با غلظت‌های متفاوت (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) ترسیم شد و میزان فلاونوئید معادل میلی‌گرم کوئرستین در هر گرم وزن خشک گیاه محاسبه گردید (Chung et al., 2016).

سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدان: سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش اندازه‌گیری درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH صورت گرفت (Barros et al., 2007). این روش بر اساس تغییر رنگ محلول متانولی بنفش رنگ ۲ و ۲-دی فنیل -۱-پیکریل – هیدرازیل به محلول زرد رنگ دی فنیل– پیکریل هیدازین است. برای این سنجش مقدار ۲۵۰ میکرولیتر از عصاره متانولی با ۷۵۰ میکرولیتر از محلول DPPH (۲ میلی‌گرم DPPH در ۵۰ میلی‌لیتر متانول خالص حل شد) مخلوط گردید. این نمونه‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در شرایط تاریکی و دمای اتاق نگهداری شد و سپس میزان جذب آن در طول موج ۵۱۷ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید. درصد مهار رادیکال‌های آزاد با فرمول زیر محاسبه شد:

(۱)

$$\text{درصد مهار رادیکال‌های آزاد} = (Ac-As)/Ac\times100$$

AC: میزان جذب دستگاه اسپکتروفتومتر برای شاهد

AS: میزان جذب دستگاه اسپکتروفتومتر برای نمونه

تجزیه و تحلیل داده‌ها

نتایج حاصل از این آزمایش با نرم‌افزار آماری SAS نسخه ۹/۱ آنالیز شده و مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام گرفت و در نهایت از نرم‌افزار Excel جهت ترسیم شکل‌ها استفاده شد.

نتایج

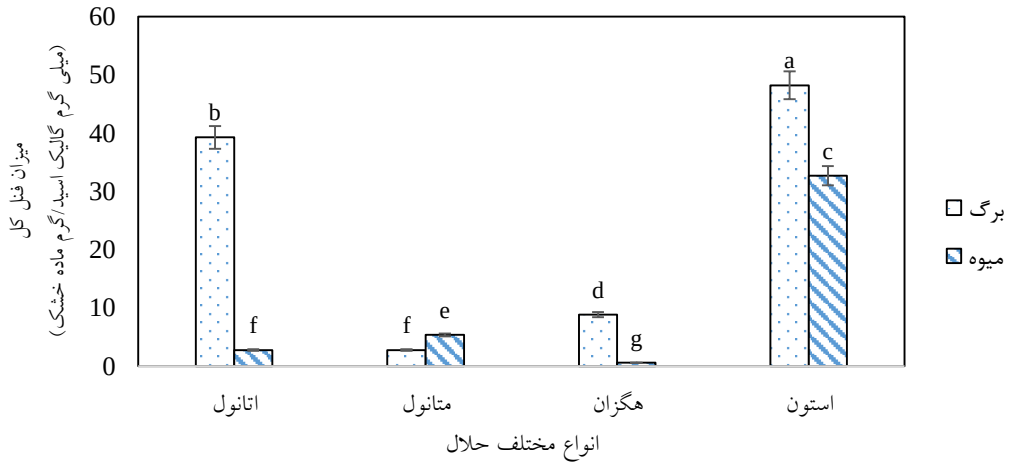
تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از این پژوهش نشان داد که تأثیر نوع اندام گیاه چریش، نوع حلال استفاده شده و اثر متقابل آن‌ها بر هر سه صفت فنل کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدان در سطح احتمال ۰/۰۵ معنی‌دار بود و تنها اثر متقابل اندام و نوع حلال بر میزان آنتی‌اکسیدان در سطح احتمال ۰/۰۱ معنی‌دار بود (جدول ۱).

جدول ۱: تجزیه واریانس صفات فیتوشیمیایی مورد ارزیابی در گیاه داروئی چریش

منابع تغییرات	درجه آزادی (DF)	فنل کل	فلاونوئید کل	فعالیت آنتی‌اکسیدان
اندام دارویی (a)	۱	۱۲٤۷/۳٤*	۰/۱۲۷*	۱٦۹٦/٤۳*
نوع حلال (b)	۳	۱۷٦۷/۰۱۷*	۱/٦۳*	۳۷٦۳/۰۳*
اثر متقابل اندام × نوع حلال (a×b)	۳	٤۰۸/۳۷*	۰/۳۹*	۵۰۰/٤۹**
خطای آزمایش (Error)	-	۱/۳۷	۰/۰۱۲۳	۹٤/۱٤
ضریب تغییرات (C.V.)	-	٦/٦٦	۲/۷۹	۱۵/٤۵

*معنی‌داری در سطح احتمال ۰/۰۵ و ** معنی‌داری در سطح احتمال ۰/۰۱

اثر نوع حلال بر میزان فنل کل در اندام‌های مختلف چریش: آنالیز داده‌ها نشان داد که نوع حلال مورد استفاده در این بررسی (اتانول، متانول، ان- هگزان و استون) بر میزان فنل کل دو اندام برگ و میوه گیاه چریش معنی‌دار بودند (P≤۰/۰۵).

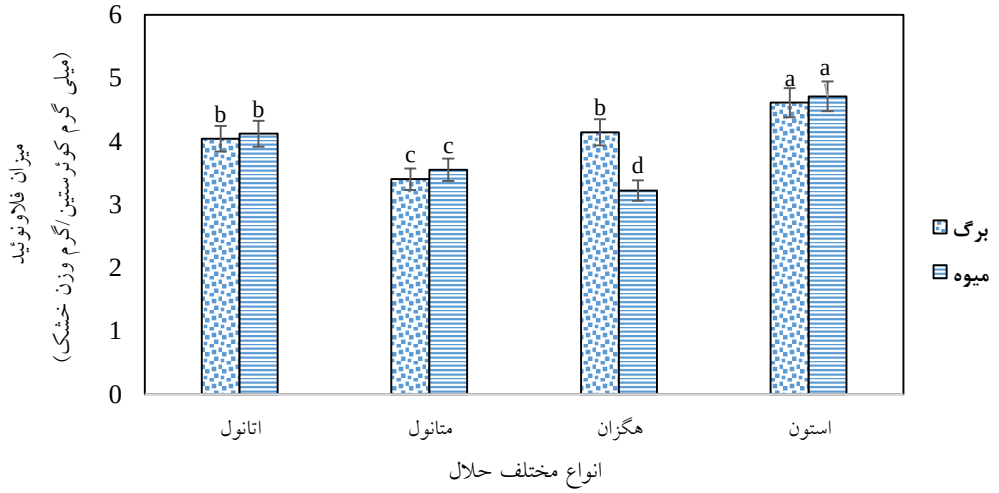


شکل ۱: اثر متقابل نوع حلال و اندام داروئی بر میزان فنل کل در گیاه داروئی چریش

شکل ۱ نشان می‌دهد که بین چهار حلال مورد نظر، استون نسبت به سایر حلال‌ها سبب استخراج میزان فنل کل بیشتری در هر دو اندام برگ و میوه گیاه چریش گردید. در اندام برگ به‌ترتیب محتوای فنل کل در عصاره استون > اتانول > هگزان > متانول بود. درحالی‌که در اندام میوه حلال‌های استون و متانول برتر از اتانول و هگزان بودند. حلال متانول در استخراج فنل کل اندام برگ ضعیف‌تر از هگزان عمل کرده است؛ اما در اندام میوه سبب افزایش فنل کل نسبت به حلال هگزان گردیده است. همچنین مقایسه دو حلال استون و اتانول در میزان فنل کل اندام‌ها نشان داد که تغییر مقدار فنل کل در اندام برگ بسیار کمتر از اندام میوه بوده است؛ به‌طوری‌که در اندام برگ با تغییر حلال از استون به اتانول میزان فنل کل از ٤۸/۲۲ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم ماده خشک به ۳۹/۲۷ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم ماده خشک رسید؛ در حالی‌که در اندام میوه میزان فنل از ۳۲/۷ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم ماده خشک به ۲/۷٦ رسید که کاهش بسیار چشمگیری نشان داد. این تغییرات در نوع حلال از استون به هگزان و متانول هم مشاهده شد؛ با این تفاوت که تغییرات در هر دو اندام کاهش چشمگیر میزان فنل بود. بنابراین می‌توان

این‌طور استنباط کرد که با توجه به نوع اندام، انتخاب حلال در میزان استخراج فنل کل اهمیت بسیاری دارد. بین حلال‌ها هگزان و متانول در هر دو اندام برگ و میوه نتایج خوبی از نظر استخراج فنل کل نشان ندادند.

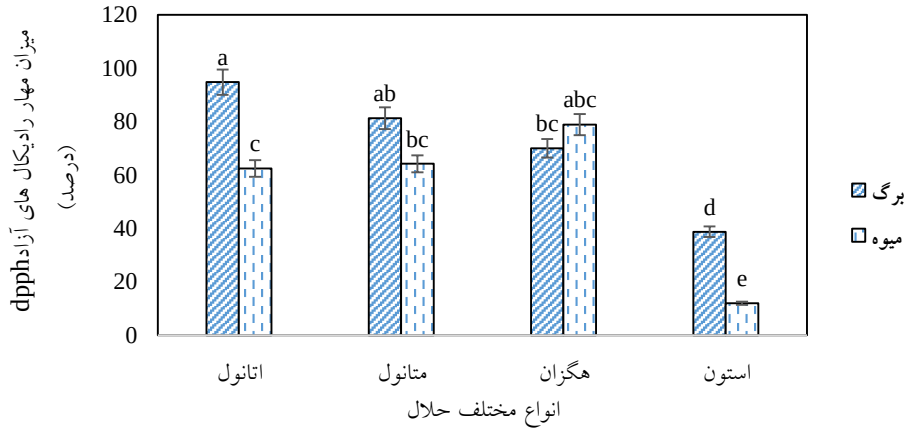
اثر نوع حلال بر میزان فلاونوئید کل در اندام‌های مختلف چریش: طبق نتایج مندرج در جدول ۱ تأثیر نوع حلال بر میزان فلاونوئید کل اندام‌های برگ و میوه گیاه چریش معنی‌دار بود (P≤۰/۰۵). نتایج این بررسی حاکی از آن بود که اندام میوه در سه حلال متانول، اتانول و استون، میزان فلاونوئید بیشتری نسبت به برگ داشت. درحالی‌که حلال هگزان سبب کاهش ۲۸ درصدی میزان فلانوئید کل در میوه (۳/۲۲ میلی‌گرم کوئرسیتین بر گرم وزن خشک گیاه) نسبت به برگ (٤/١٤ میلی‌گرم کوئرسیتین بر گرم وزن خشک گیاه) شد. به طور کلی میزان فلاونوئید کل گیاه چریش در اندام‌های برگ و میوه در حلال هگزان < متانول <اتانول < استون بود (شکل ۲).



شکل ۲: تأثیر نوع حلال بر میزان فلاونوئید کل در دو اندام مختلف چریش

اثر نوع حلال بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی اندام‌های مختلف چریش: نتایج حاصل از بررسی حلال‌های مختلف بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های برگ و میوه گیاه چریش با روش مهار رادیکال‌های آزاد DPPH در جدول ۱ نشان داده شده است. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها نشان داد که اثر حلال‌های مختلف (P≤۰/۰۵)، اندام داروئی (P≤۰/۰۵) و اثر متقابل این دو عامل (P≤۰/۰۱). بر میزان فعالیت عصاره‌ها بر بازدارندگی فعالیت رادیکال‌های آزاد DPPH معنی‌دار هستند.

همان‌طور که در شکل ۳ قابل مشاهده است عصاره‌های اتانولی، متانولی و استونی برگ میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی‌تری نسبت به میوه چریش دارد (به‌ترتیب ۹٤/۷۷، ۸۱/۲٤ و ۳۸/۷۷ درصد). درحالی‌که در حلال هگزان، میوه‌های چریش (۷۸/۸۷ درصد) فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی‌تری نسبت به برگ (٦۹/۹۷ درصد) نشان دادند.



شکل ۳: تأثیر نوع حلال بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی اندام‌های مختلف چریش

ارزیابی همبستگی بین صفات فیتوشیمیایی گیاه چریش: نتایج همبستگی بین صفات ارزیابی‌شده نشان داد که بین فنل کل و فلاونوئید کل همبستگی مثبت معنی‌داری وجود داشت (جدول ۲). به‌طوری‌که با افزایش میزان فنل کل، میزان فلاونوئید کل نیز افزایش می‌یابد. اما رابطه بین فنل و فلاونوئید با فعالیت آنتی‌اکسیدانی، همبستگی منفی نشان داد.

جدول ۲: همبستگی بین صفات بر اساس ضریب پیرسون

صفات مورد ارزیابی	فنل کل	فلاونوئید کل	فعالیت آنتی‌اکسیدان
فنل کل	۱	۰/۷۳**	-۰/۳۸*
فلاونوئید کل	۰/۷۳**	۱	-۰/۶۸**
فعالیت آنتی‌اکسیدان	-۰/۳۸*	-۰/۶۸**	۱

بحث

در تحقیق حاضر بیشترین میزان فنل کل (۴۸/۲۲ میلی‌گرم گالیک اسید / گرم وزن خشک) در عصاره استونی برگ و کمترین میزان (۲/۷۶ میلی‌گرم گالیک اسید/گرم وزن خشک) در عصاره هگزانی میوه گزارش گردید (شکل ۱). همچنین بیشترین میزان فلاونوئید کل در عصاره استونی میوه و برگ (به ترتیب با مقادیر ۴/۷۱ و ۴/۶۱ میلی‌گرم کوئرستین/گرم وزن خشک) و کمترین میزان (۳/۲۲ میلی‌گرم کوئرستین/ گرم وزن خشک) در عصاره هگزانی میوه مشاهده گردید (شکل ۲). بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۹۴/۷۷ درصد) در عصاره اتانولی برگ سنجش گردید و کمترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۱۲/۰۲ درصد) در عصاره استونی میوه ملاحظه شد (شکل ۳). به احتمال قوی، افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی در حلال اتانولی بخاطر افزایش تعداد عامل‌های هیدروکسیلی بوده است. که در این صورت احتمال دادن هیدروژن به رادیکال‌های آزاد و افزایش قدرت مهارکنندگی عصاره وجود دارد. به‌طور کلی از نتایج این آزمایش می‌توان استنباط کرد که اندام برگ در همه این صفات قوی‌تر از اندام میوه بوده است. در میان حلال‌های بکاررفته در این آزمایش استون در استخراج ترکیبات فنولی (فنل کل و فلاونوئید کل) قوی‌تر از سایر حلال‌ها عمل نموده است. لیکن در مورد فعالیت آنتی‌اکسیدانی و مهار رادیکال‌های آزاد DPPH حلال اتانول قوی‌تر بود.

استخراج ترکیبات فعال زیستی برای استفاده از آن‌ها در صنایع مختلف، باید با تکنیک‌های مختلف فیتوشیمی مطابقت داده شود. بنابراین، در علم فیتوشیمی، مواد خام، حلال‌ها و انرژی معمولاً برای استخراج ترکیبات مختلف از گونه‌های متفاوت بهینه می‌شوند (Zhu et al., 2017). نوع حلال و ترکیب آن عوامل مهمی برای استخراج ترکیبات هدف هستند. طبق گزارشات پیشین، متانول و اتانول و مخلوط آن‌ها با آب در نسبت‌های مختلف بهترین حلال استخراج برای متابولیت‌های گیاهی هستند (López et al., 2018). پژوهشگران عصاره‌های مختلف برگ چریش رویش یافته در هند را بررسی نمودند. نتایج تحقیق آن‌ها نشان داد که عصاره اتانولی برگ چریش محتوی تانن، فنل، گلیکوزید، کربوهیدرات، ترپن، فلاونوئید (و فاقد ساپونین، پروتئین و آلکالوئید) است. در حالیکه عصاره استونی برگ چریش محتوی ساپونین، تانن، فنل، گلیکوزید، ترپن، کربوهیدرات (و فاقد آلکالوئید و فلاونوئید) است. وجود ترکیبات مختلف در عصاره‌های مختلف موید نقش کلیدی نوع حلال در استخراج ترکیبات فعال زیستی متفاوت است (Sahrawat et al., 2018).

گروهی از پژوهشگران محتوای فنل کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی پوست تنه چهار درخت چریش، آرجون (*Terminalia arjuna*)، آکاسیا (*Acacia nilotica*)، جمبو (*Eugenia jambolana*) را در عصاره‌های مختلف متانولی، اتانولی و استونی (۸۰ درصد حلال: ۲۰ درصد آب) ارزیابی نمودند. همه عصاره‌ها محتوای فنلی بالا (۱۶/۵- ۷/۸ میلی‌گرم گالیک اسید)، فلاونوئید بالا (۴/۹۳- ۱/۵۹ میلی‌گرم کاتچین) و فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی (۹۰-۴۴ درصد) از خود نشان دادند. در مطالعه آن‌ها قدرت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH در عصاره استونی <متانولی < اتانولی بود که با نتایج ما مطابقت داشت (Sultana et al., 2007). بین قطبیت حلال مورد استفاده برای استخراج و میزان محتوای عصاره‌گیری از نظر صفات فیتوشیمیایی رابطه مستقیمی وجود دارد. به‌طوری‌که هرچه قطبیت حلال بیشتر باشد؛ میزان استخراج عصاره افزایش می‌یابد (Pham et al., 2015).

حلال نقش مهمی در تشخیص ترکیب‌های گیاهی و عوامل آنتی‌اکسیدانی دارد. در اکثر موارد افزایش فنل‌ها و فلاونوئیدها سبب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌شود به‌جز در موارد محدودی مانند گل پامچال و مهر سلیمان که با افزایش ارتفاع و کاهش دمای هوا برخی آنزیم‌های تأثیرگذار در تولید فنل و فلاونوئید غیرفعال شده و مقادیر آن کاهش می‌یابد (Alkadi, 2020). محققان ترکیبات شیمیایی موجود در عصاره‌های خالص چریش عمانی را بررسی نمودند. در مطالعه آن‌ها درصد بالایی از ترکیبات فعال زیستی شناسایی شدند که از نظر شیمیایی و بیولوژیکی دارای اهمیت هستند. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های خام به‌ترتیب کلروفرم > بوتانول > عصاره اتیل استات >عصاره هگزانی > عصاره متانولی بود. وجود ترکیبات شیمیایی مهم در عصاره‌های خام برگ چریش، اهمیت توسعه کشت آن را در مزارع محلی تایید می‌کند. نوع عصاره خام مناسب برای استحصال گروه خاصی از ترکیبات آلی فعال زیستی را می‌توان به کمک تکنیک کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی (GC-MS) انتخاب نمود (Hossain et al., 2013).

محققان اذعان نمودند که استفاده از حلال‌های مختلف، دماهای متفاوت و مدت زمان استفاده از امواج مافوق صوت منجر به استخراج متابولیت‌های ثانویه متفاوت از برگ چریش گردیده است به طوری‌که دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و استفاده از تکنیک اولتراسونیک به مدت ۲۰ دقیقه در حضور حلال آب منجر به استخراج بیشترین میزان ترکیب آزادیراختین (۸۶/۴۴ میلی‌گرم/ گرم ماده خشک) شد.

درحالی‌که دمای ٤٥ درجه سانتی‌گراد و اولتراسونیک به مدت ۳۰ ثانیه در حلال اتانول ۵۰ درصد منجر به استخراج بیشترین میزان موالونیک اسید (۳۳/٦۷ میلی‌گرم/گرم ماده خشک) گشت. همچنین بیشترین میزان ترکیب اسکوآلن (۸/۲۷ میلی‌گرم/ گرم ماده خشک) در حلال متانول ۵۰ درصد و استفاده از اولتراسونیک به مدت ۱۰ دقیقه و دمای۵۵ درجه سانتی‌گراد حاصل شد (Farjaminezhad and Garoosi, 2020). گزارش فیروزکوهی و همکاران (۱۳۹٦) نیز نشان داد که محتوای فنل و فلاونوئید استخراج‌شده با استفاده از حلال متانول و استون بیش از اتیل استات، هگزان و کلروفرم بود. بنابراین می‌توان یادآور شد با افزایش قطبیت از کلروفرم به متانول میزان محتوای استخراج‌شده فنل و فلاونوئیدی نیز افزایش می‌یابد (Ghasemzadeh et al., 2011). فعالیت آنتی‌اکسیدانی در نمونه‌های گیاهی و غذایی نیز با عواملی مثل خصوصیات کلوئیدی نمونه، شرایط و مرحله اکسیداسیون، ویژگی‌های طبیعی ماده مثل رنگ، pH و محل حضور آنتی‌اکسیدان (فاز آبی یا روغنی) همراه است که سبب عدم نتیجه‌گیری از یک روش می‌شود (Frankel Meyer, 2000). توانایی عصاره‌های استخراج‌شده با حلال‌های مختلف در مهار رادیکال‌های آزاد وابسته به غلظت بوده و با افزایش غلظت عصاره‌ها، فعالیت آنتی‌اکسیداتیوی آن‌ها افزایش می‌یابد. در گزارشی روی گیاه کارلا، فعالیت آنتی‌اکسیدانی این گیاه را به‌دلیل وجود عامل‌های هیدروکسیلی در ترکیبات فنلی آن دانسته‌اند (Patel et al., 2011)، بنابراین با افزایش غلظت ترکیبات فنلی، بخاطر افزایش تعداد عامل‌های هیدروکسیلی، احتمال دادن هیدروژن به رادیکال‌های آزاد و افزایش قدرت مهارکنندگی عصاره وجود دارد (Sanchez-Moreno et al., 1999). در گزارش دیگری بالاترین میزان مهارکنندگی رادیکال آزاد برای عصاره‌های متانولی و استونی کارلا گزارش شده (Jonathan et al., 2012)، در این تحقیق نیز بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در عصاره اتانولی و پس از آن عصاره متانولی مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری نهایی

میزان ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های تهیه شده توسط حلال‌های اتانول، متانول، استون و ان-هگزانی از دو اندام برگ و میوه گیاه چریش تحت تأثیر نوع حلال می‌باشد. به طور کلی نتایج ما نشان داد که عصاره استونی برگ چریش محتوای فنلی بالایی دارد و عصاره اتانولی برگ قدرت مهار رادیکال‌های آزاد بیشتری داشته است. با توجه به نتایج این آزمون‌ها برگ چریش که از محتوای فنلی و آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت به میوه برخوردار است می‌تواند به‌منظور تهیه آنتی‌اکسیدان طبیعی استفاده گردد. همچنین با توجه به اهمیت بالای این گیاه در صنایع دارویی و آرایشی- بهداشتی، پیشنهاد می‌گردد در مطالعات آتی تنوع فیتوشیمیایی بین جمعیت‌های مختلف چریش در رویشگاه‌های مختلف ایران بررسی گردد. شناخت هر چه بیشتر ویژگی‌های طبیعی این گیاه، به تولید آن در اکوسیستم‌های زراعی کمک خواهد نمود. شرایطی که ضمن افزایش کمیت و کیفیت محصول، هم گامی موثر در راستای اهداف کشاورزی پایدار است و هم به استفاده بهینه از منابع (ارگانیک، شیمیایی و انرژی) توانایی تولید محلی را رونق می‌بخشد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق مستخرج از پایان نامه دانشجویی بوده و با حمایت مالی دانشگاه زابل انجام شده است.

References

1.Alkadi, H. 2020. A review on free radicals and antioxidants. *Infectious Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Infectious Disorders)*, 20(1): 16-26.

2.Barros, L., Baptista, P. and Ferreira, I.C.F.R. 2007. Effect of fruiting body maturity stage on antioxidant activity measured by several biochemical assays *Lactarius piperatus*. *Food and Chemical Toxicology*, 45(9): 1731-1737.

3.Chung, I.M., Thiruvengadam, M., Rekha, K. and Rajakumar, G. 2016. Elicitation enhanced the production of phenolic compounds and biological activities in hairy root cultures of bitter melon (*Momordica charantia* L.). Brazilian Archives of Biology and Technology, 59(3): 1-10.

4.Deng, Y., Shi, D., Yin, Z., Guo, J., Jia, R., Xu, J., Song, X., Lv, C., Fan, Q., Lian, X., Shi, F., Ye, G. and Zhan, W. 2012. Acaricidal activity of Petroleum ether extract of neem (*Azadirachta indica*) oil and its four fractions separated by column chromatography against *Sarcoptes scabiei* var.cniculi larvae in vitro. *Experimental Parasitology*, 130: 475-457.

5.Elumalai, P., Gunadharini, D.N., Senthilkumar, K., Banudevi, S., Arunkumar, R., Benson, C.S., Sharmila, G. and Arunakaran, J. 2011. Ethanolic *neem* (*Azadirachta indica* A. Juss) leaf extract induces apoptosis and inhibits the IGF signaling pathway in breast cancer cell lines. Biomedicine & Preventive Nutrition, 2(1): 59-68.

6.Farjaminezhad, R. and Garoosi, Gh. 2020. Establishment of green analytical method for ultrasound-assisted extraction of azadirachtin, mevalonic acid and squalene from cell suspension culture of *Azadirachta indica* using response surface methodology. Industrial Crops and Products, 144: 111946.

7.Firoozkoohi, F., Esmailzadeh Bahabadi, S., Mohkami, Z. and Yousefzaei, F. 2018. The effect of different solvents on the amount of phenol and total flavonoids and antioxidant activity of different organs of *Momordica charantia* L. in Sistan region. Journal of Ecophytochemistry of Medicinal Plants, 20(4): 85-74.

8.Frankel, E.N. and Meyer, A.S. 2000. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. Journal of the Science of Food and Agriculture, 80(13): 1925-1941.

9.Ghasemzadeh, A., Jaafar, H.Z. and 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. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(7): 1147-1154.

10.Ghorbani Ghozhdi, H., Mohkami, Z. and Estaji, A. 2021. Medicinal plants in Iranian traditional medicine (Matching the name of native name with the scientific name). Marz danesh publisher. 629 p. (In Persian).

11.Hossain, M.A., Al-Toubi, W.A.S., Weli, A.M., Al-Rahimi, Q. and Al-Sabani, J.N. 2013. Identification and characterization of chemical compounds in different crude extracts from leaves of Omani neem. Journal of Taibah University for Science, 7(4): 181-188.

12.Islas, J.F., Acosta, E., G-Buentello, Z., Delgado-Gallegos, J.L., Moreno-Treviño, M.J., Escalante, B.E. and Moreno-Cuevas, J. 2020. An overview of Neem (*Azadirachta indica*) and its potential impact on health. Journal of Functional Foods, 74: 104171.

13.Jonathan, S.G., Olawuyi, O.J., Aina, D.A., Odeniyi, S.O., Adediji, I.O. and Ikhedia, A. 2012. Comparative studies on antifungal, anti-oxidant and phytochemical potential of *Momordica charantia* and *Moringa oleifera*. New York Science Journal, 5(12): 17-28.

14.Khanavi, M., Hasanloo, T. and Haji Mahdipour, H. 2019. Quantitative determination of Azadirachtin in *Melia indica* and *M. azedarach*. 2019. Medicinal plants journal, 69: 185-193. (In Persian)

15.Li, F.J., Liu, X.Y., Xu, G.J. and Guo, H.Y. 2015. Effects of extraction solvents on antioxidant activity of Bitter Gourd

(*Momordica charantia* L.) fruits in vitro. *Innovations in Food Research*, 1: 1-3.

16. López, C.J., Caleja, C., Prieto, M.A., Filomena Barreiro M., Barros, L. and C.F.R. Ferreira, I. 2018. Optimization and comparison of heat and ultrasound assisted extraction techniques to obtain anthocyanin compounds from *Arbutus unedo* L. Fruits, Food Chemistry, 264:81-91.
17. Omidbeigi, R. 2015. Production and processing of medicinal plants, Vol. 4. Quds Razavi Province Publications. 428 p. (In Persian)
18. Parsons, B.J. 2017. Antioxidants in food, the significance of characterization identification, chemical and biological assays in determining the role of antioxidants in food. *Foods*, 6(8): 68-72.
19. Patel, S., Patel, T., Parmar, K., Patel, B. and Patel, P. 2011. Evaluation of antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of *Momordica charantia* Linn fruit. Advance Research in Pharmaceuticals and Biologicals, 1: 120-129.
20. Pham, H.N.T., Nguyen, V.T., Vuong, Q.V., Bowyer, M.C. and Scarlett, C.J. 2015. Effect of extraction solvents and drying methods on the physicochemical and antioxidant properties of *Helicteres hirsuta* Lour. leaves. Technologies, 3(4): 285-301.
21. Sabura, A., Ahmadi, A., Zinali, A. and Parsa, M. 2014. Comparison of phenolic, flavonoid content and antioxidant activity of shoots of two populations of *Scutellaria pinnaifida* in northern Iran. Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences, 13: 266-249. (In persian)
22. Sadeghi, Z., Valizadeh, J. and Aziziyan Shermeh, A. 2016. Investigation of phenol content, total flavonoids and antioxidant activity of *Pistacia atlantica* gum from Saravan region (Sistan and Baluchestan province). Journal of Hypophytochemistry of Medicinal Plants, 10(2): 18-27. (In persian)
23. Sahrawat, A., Sharma, J., Siddarth, N., Tiwari, S., Datt Joshi, M., Pundhir, A., Kumar, R., Radhika, A., Shivani, B., Nilesh, Sh. and Akash, G. 2018. Phytochemical analysis and antibacterial properties of *Azadirachta indica* (Neem) leaves extract against *E. coli*. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 7(4): 1368-1371.
24. Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J.A. and Saura- Calixto, F. 1999. Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. Food Research International, 32: 407-412.
25. Subapriya, R. and Nagini, S. 2005. Medicinal properties of neem leave a review. Curr Med Chem Anticancer Agents, 5(2):149-156.
26. Sultana, B., Anwar, F. and Przybylski, R. 2007. Antioxidant activity of phenolic components present in barks of *Azadirachta indica*, *Terminalia arjuna*, *Acacia nilotica*, and *Eugenia jambolana* Lam. trees. Food Chemistry, 104(3): 1106-1114.
27. Wen, L.J. and Liu, W.F. 2007. Study on extracting and antioxidant activity of flavonoids from *Momordica charantia* L. *Food Science*, 9: 042.
28. Zhu, Zh., Guan, Q., Koubaa, M.J., Barba, F., Roohinejad, Sh., Cravotto, G., Yang, X., Sh., Li, and He, J. 2017. HPLC-DAD-ESI-MS2 analytical profile of extracts obtained from purple sweet potato after green ultrasound-assisted extraction, Food Chemistry, 215: 391-400.

Effect of different solvents on the extraction of phytochemical compounds of Neem (*Azadirachta indica* A. Juss)

Soufiyan, J.A.[1], Rahimi, M.[2*], Mohkami, Z.[3], Ghorbani Ranjbari, A.[4], Bidarnamani, F.[3]

[1]MSc student, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran

[2]Assistant Professor, Department of Horticulture and Green Space, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran

[3]Assistant Professor, Department of Agriculture and Plant Breeding, Institute of Agricultural Research, University of Zabol, Zabol, Iran

[4]Postdoctoral student, Department of Biotechnology, Faculty of Veterinary, University of Tehran, Tehran, Iran

Received: 25-2-2022; Accepted: 16-4-2022

Abstract

Neem (*Azadirachta indica*) that belongs to the *Meliaceae* family has many medicinal properties such as treatment of skin diseases, hypoglycemia, hypertension, cancer, and AIDS. In this study, to investigate the effect of different solvents on the quantity and quality of phytochemical properties of neem collected from Bahoklat area in Chabahar city, a factorial experiment was conducted in a completely randomized design in 2021. Ethanol, methanolic, n-hexane and acetone extracts of neem leaves and fruits were prepared by cold maceration method. Total phenol content, total flavonoid and antioxidant activity were measured by folin-cicalto reagent, aluminum chloride colorimetric and diphenylpicrylhydrazyl free radical scaving (DPPH) methods, respectively. The results showed that the effect of organ type, solvent type and their interaction on all measured traits was significant. Based on the results, the highest amount of total phenol (48.22 mg Gallic acid / g dry weight) was reported in acetone leaf extract, and the lowest amount (2.76 mg Gallic acid / g dry weight) was reported in hexane extract of fruit. In addition, the highest amount of total flavonoids was observed in acetoin fruit and leaf extracts (4.71 and 4.61 mg Quercetin / g dry weight, respectively) and the lowest amount (3.22 mg quercetin / g dry weight) was obtained in the hexane extract of fruit. The highest and the lowest antioxidant activity was detected in ethanolic leaf extract (94.77%) and acetone extract of fruit (12.02%), respectively. Therefore, neem leaf is suggested as a useful source of phenolic compounds and natural antioxidants.

Keywords: Antioxidant activity, Extraction methods, Total flavonoeids, Total phenols, Medicinal plants.

[*]Corresponding author; mrahimi@uoz.ac.ir