بررسی خواص فیتوشیمیایی، آنتی‌اکسیدانی و شناسایی ترکیبات آلی و معدنی میوهٔ گیاه خرنوب (*Ceratonia siliqua* L.)

مریم نصیری[۱]، بابک مختاری[۱]، مریم کلاهی[۲*]، ناهید پوررضا[۱]

۱) گروه شیمی، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲) گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۴/۹ **تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۲۳**

چکیده

مقدمه: خرنوب (*Ceratonia siliqua* L.) درختی از خانوادهٔ حبوبات است که برای جنگل‌زایی و اهداف زینتی استفاده می‌شود. با توجه به خواص دارویی ازجمله خاصیت این میوه در درمان ناباروری، در پژوهش حاضر ترکیبات شیمیایی، به‌ویژه اسیدهای چرب آن شناسایی و آنالیز شدند.

مواد و روش‌ها: به‌منظور تعیین بیشترین بازده، عصاره‌گیری با حلال‌های مختلف صورت گرفت. برای شناسایی نوع ترکیبات آلی، عصارهٔ متانولی به دستگاه GC-MS تزریق گردید. برای تشخیص نوع و میزان عناصر موجود در پودر خشک این میوه، آنالیز EDS انجام شد؛ همچنین اسیدهای چرب با استفاده از روش GC- FID آنالیز گردیدند. خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با روش ABTS آزمایش شد.

یافته‌های پژوهش: بیشترین بازده عصاره‌گیری مربوط به عصارهٔ مستخرج از حلال آب بود. تست‌های فیتوشیمیایی حضور ساپونین‌ها، آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، تانن‌ها، گلیکوزیدها، استروئیدها و ترپنوئیدها را در عصارهٔ اتانولی میوهٔ خرنوب تأیید می‌کند. ۳۸ ترکیب آلی در عصارهٔ متانولی میوهٔ خرنوب شناسایی شد که بیشترین آن‌ها متعلق به اسیدهای چرب بودند. ۸ عنصر معدنی در میوهٔ خرنوب شناسایی گردیدند که مس و روی عناصر غالب بودند. آنالیز روغن حاصل از میوهٔ *Ceratonia siliqua* L. وجود هشت اسید چرب را نشان می‌دهد. بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها نشان داد که عصارهٔ آبی بیشترین مقدار IC_{50} را دارد.

بحث و نتیجه‌گیری: نقش میوهٔ خرنوب در درمان ناباروری می‌تواند به علت وجود ترکیبات آنتی‌اکسیدانی فراوان و نقش آن‌ها در کاهش استرس اکسیداتیو در اسپرم‌ها و همچنین وجود عناصر مغذی به‌عنوان کوفاکتورهای درگیر در مسیر استرس اکسیداتیو و نیز وجود اسیدهای چرب فراوان باشد.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، اسیدهای چرب، ترکیب شیمیایی، خرنوب

[*] **نویسندهٔ مسئول:** گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

Email: m.kolahi@scu.ac.ir

Copyright © 2019 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

مقدمه

خرنوب درختی همیشه‌سبز بومی مناطق مدیترانه با نام علمی *Ceratonia siliqua* L. از راستهٔ فابالس، خانوادهٔ حبوبات، زیرخانوادهٔ ارغوانیان، جنس (سرده) خرنوب، گونهٔ *siliqua* است. این درخت برای جنگل‌زایی در مناطق خشک و همچنین برای اهداف زینتی استفاده می‌شود. پالپ و دانه دو جزء اصلی میوهٔ خرنوب هستند. دانه‌ها ۱۰ درصد وزن میوه و پالپ ۹۰ درصد دیگر میوه را تشکیل می‌دهند. میوهٔ رسیدهٔ خرنوب دربردارندهٔ مقدار فراوانی تانن فشرده، فیبر و پروتئین و مقدار کمی لیپید و همچنین مقدار بالایی مواد قندی است. پودر پالپ به‌عنوان یک مادهٔ غذایی و مکمل کاکائو برای تهیهٔ محصولات غذایی استفاده می‌شود. کاکائوی خرنوب نسبت به شکلات، کالری کمتر دارد و کافئین و تئوبرومین ندارد. از ویژگی‌های این گیاه داشتن خاصیت ضد سرطان روده و ضد دیابتی به علت داشتن ترکیبات پلی‌فنلی، آنتی‌اکسیدانی، فیبر، پروتئین، استرول‌های گیاهی و اسیدهای چرب غیراشباع است. تانن‌های استخراج‌شده از پالپ خرنوب به‌عنوان ضد اسهال خونی استفاده می‌گردند (۱). پژوهش‌ها نشان می‌دهد که میوهٔ خرنوب خاصیت باروری دارد و مصرف دانه‌های گیاه، سبب افزایش تحرک اسپرم‌ها و کیفیت آن‌ها می‌شود و از همین رو، مشکل ناباروری آقایان را برطرف می‌کند که عموماً به علت کمبود اسپرم و کندی سرعت آن رخ می‌دهد.

مطالعات بیانگر آن است که حدود ۱۵ درصد زوجین مشکل ناباروری دارند. علل ناباروری می‌تواند مربوط به زن یا مرد یا هر دو باشد. حدود ۴۰ درصد از مشکلات ناباروری مربوط به مردان، ۴۰ درصد مربوط به زنان و حدود۲۰ درصد مربوط به هر دو است. اگر تعداد، کیفیت، تحرک مناسب و شکل اسپرم مختل گردد، مرد نابارور محسوب می‌شود. یکی از عوامل مؤثر بر ناباروری مردان گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) است که باعث ایجاد استرس اکسیداتیو می‌گردد. آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند آثار گونه‌های فعال اکسیژن را خنثی کنند (۲). با توجه به اینکه میوهٔ خرنوب کاربردهای فراوان ازجمله درمان ناباروری دارد؛ بنابراین، در پژوهش حاضر ترکیبات شیمیایی و معدنی آن شناسایی و اسیدهای چرب آن بررسی شدند.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی نمونه: میوهٔ خشک‌شدهٔ خرنوب در دی‌ماه ۱۳۹۶ تهیه و از سوی گروه زیست‌شناسی دانشگاه شهید چمران اهواز شناسایی گردید. میوهٔ خرنوب خریداری‌شده ابتدا برای از بین بردن ذرات گردوغبار و مواد آلودهٔ دیگر از سطح نمونه‌ها، با آب شهری سپس با آب مقطر شسته شد؛ سپس در دمای اتاق و دور از تابش مستقیم نور خورشید خشک گردید و پس از خشک کردن کامل گیاه، با استفاده از هاون چینی میوهٔ خرنوب پودر شد.

عصاره‌گیری از گیاه به روش ماسراسیون: ۲۰ گرم از پودر را با حلال‌های گوناگون (آب مقطر، اتانول ۹۶ درصد، متانول۹۹/۵ درصد و کلروفرم) به مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق، روی همزن مغناطیسی با دور ۴۰۰۰ بر ساعت قرار داده تا عصاره‌گیری کامل شود. عصارهٔ به‌دست آمده در تبخیرکنندهٔ چرخان تغلیظ شده است. درنهایت، وزن عصاره‌ها به‌دست آمد و بازده عصاره‌گیری بر اساس معادلهٔ شمارهٔ ۱ محاسبه گردید. آنگاه عصارهٔ تغلیظ‌شده در یخچال در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد نگه‌داری شد (۲).

معادلهٔ شمارهٔ ۱. بازده عصاره = (وزن پودر خشک گیاه / وزن عصارهٔ به‌دست‌آمده) ×۱۰۰

شناسایی و بررسی فیتوشیمیایی مقدماتی متابولیت‌های ثانویه: آزمون‌های فیتوشیمیایی مقدماتی با استفاده از عصارهٔ اتانولی با روش‌های استاندارد برای شناسایی مواد مؤثره انجام گردید. هفت دستهٔ مهم ترکیبات گیاهی شامل آلکالوئیدها، ساپونین‌ها، فلاونوئیدها، تانن‌ها، استروئیدها، گلیکوزیدها و ترپنوئیدها بررسی شدند (۵، ۴، ۳).

تعیین ترکیبات موجود در عصارهٔ ماسراسیون متانولی میوهٔ خرنوب با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی- طیف‌سنج جرمی: به‌منظور تعیین ترکیبات موجود در عصارهٔ متانولی ماسراسیون میوهٔ خرنوب، ۱ میکرولیتر از عصارهٔ متانولی به همراه ۱ میلی‌لیتر اتانول به دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی با مشخصات زیر تزریق گردید:

دستگاه GC؛ مدل دستگاه: Agilent 7890 A- GC؛ نوع ستون: 30m x 250 µm x 0.25 µm HP-5MS؛ دمای محفظهٔ تزریق: ۲۸۰ درجهٔ سانتی‌گراد؛ نوع و سرعت کل

حرکت گاز حامل: هلیم و mL/min ۱. دستگاهMS؛ مدل دستگاه: Agilent 5975 C- MS.

ابتدا آون به مدت ۳ دقیقه در دمای ۷۰ درجهٔ سانتی‌گراد نگه داشته شد. پس از این مرحله، دما با سرعت ۵ درجهٔ سانتی‌گراد بر دقیقه تا دمای ۳۰۰ درجهٔ سانتی‌گراد افزایش یافت و دمای محفظهٔ تزریق ۲۸۰ درجهٔ سانتی‌گراد تنظیم شد و طیف مشخص گردید (۶).

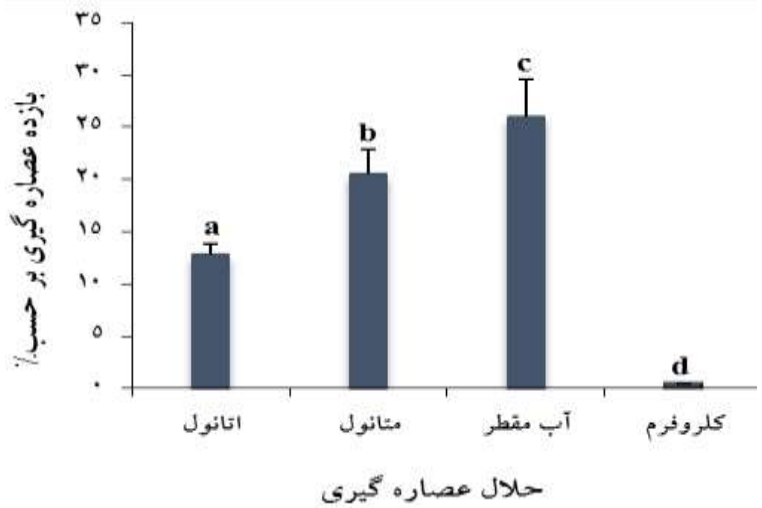
آنالیز میوهٔ خرنوب با تکنیک EDS: به‌منظور تشخیص نوع و میزان عناصر موجود در پودر خشک میوهٔ خرنوب، آنالیز EDS صورت گرفت (۷).

شناسایی اسیدهای چرب موجود در پودر میوهٔ خرنوب به روش GC- FID: آماده‌سازی متیل‌استر اسیدهای چرب بر اساس روش گزارش‌شدهٔ استاندارد ملی ایران ۲-۱۳۱۲۶ با کد ICS:67.200.10 انجام شد (۷). آنالیز متیل‌استر اسیدهای چرب با دستگاه کروماتوگرافی گازی طبق روش جداوی و همکاران انجام گردید (۸).

روش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی با روش کاتیون زدایی رادیکالABTS **:** فعالیت مهارکنندگی رادیکال کاتیون ABTS عصاره‌ها با استفاده از روش راجورکار و همکاران با اصلاحاتی صورت گرفت (۹). فعالیت مهارکنندگی رادیکال کاتیون به‌صورت IC_{50}. برحسب میلی‌گرم بر لیتر بیان گردید.

یافته‌های پژوهش

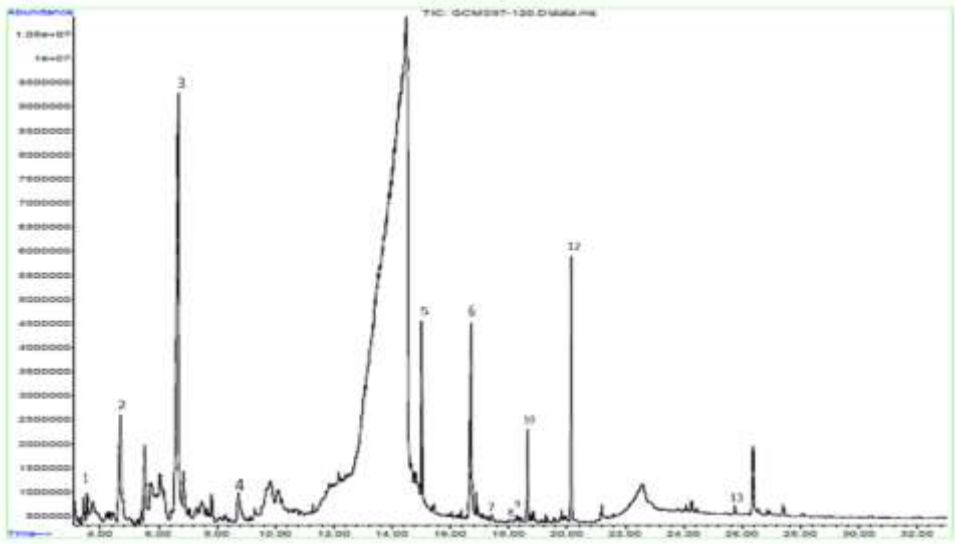
بازده عصاره‌گیری: بررسی مقدار عصاره‌های به‌دست‌آمده از عصاره‌های میوهٔ خرنوب با حلال‌های مختلف به روش ماسراسیون نشان داد که اختلاف معناداری باهم دارند. حلال کلروفرم کمترین میزان را نشان داد و به علت بازده کم عصاره‌گیری با حلال کلروفرم، در ادامه از سایر آزمایش‌ها حذف شد ($P<0.05$) (شکل شمارهٔ ۱).



شکل ۱. بازده عصاره‌گیری. مقادیر یادشده میانگین دو بار تکرار ± خطای استاندارد است .حروف متفاوت در بالای ستون‌ها معرف تفاوت معنادار میان میانگین‌های بازده با روش‌های مختلف عصاره‌گیری است.

بررسی‌های فیتوشیمیایی: نتایج به‌دست‌آمده از بررسی‌های مقدماتی فیتوشیمیایی، حضور ساپونین‌ها، آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، تانن‌ها، گلیکوزیدها، استروئیدها و ترپنوئیدها را در عصارهٔ اتانولی میوهٔ خرنوب تأیید می‌کند.

شناسایی ترکیب‌های موجود در عصارهٔ متانولی گیاه میوهٔ خرنوب: کروماتوگرام نمونه و ترکیبات شیمیایی با درصد احتمال بالاتر از ۵۰ درصد ارائه‌شده است (شکل ۲ و جدول ۱). روش کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنج جرمی، ۳۸ ترکیب آلی را در این نمونه شناسایی کرد که بیشترین آن‌ها متعلق به اسیدهای چرب بودند.



شکل ۲. طیف GC عصارهٔ متانولی میوهٔ خرنوب به روش ماسراسیون. اعداد بالای هر پیک مربوط به ترکیبات ارائه‌شده در جدول شمارهٔ ۱ است.

جدول ۱. ترکیبات شیمیایی به‌دست‌آمده از روش ماسراسیون با متانول

ردیف (ترتیب خروج)	نام ترکیب	زمان بازداری	درصد احتمال	مقدار
۱	Heptanoic acid	3.43	۵۳	**0.19**
۲	4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-di hydroxy-6-methyl-	5.53	۸۶	**0.72**
۳	2-Furancarboxaldehyde, 5-(hydroxym ethyl)-	6.64	۹۱	**5.55**
۴	1,2,3-Benzenetriol	8.78	۶۰	**0.6**
۵	n-Hexadecanoic acid	15.023	۹۴	**0.94**
۶	9-Octadecenoic acid, (E)-	16.9	۹۱	**0.13**
۷	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-	17.432	۹۰	**0.05**
۸	Oleic Acid	17.981	۷۲	**0.01**
۹	Cyclopropaneoctanal, 2-octyl-	18.296	۹۲	**0.08**
۱۰	9-Octadecenamide, (Z)-	18.645	۹۹	**0.48**
۱۱	Octadecanamide	18.839	۹۳	**0.11**
۱۲	1,2-Benzenedicarboxylic acid, diis ooctyl ester	20.144	۹۱	**1.18**
۱۳	Stigmasterol, 22,23-dihydro-	25.866	۹۱	**0.75**

آنالیز میوهٔ خرنوب به روش EDS: نتایج به‌دست‌آمده از آنالیز EDS نشان داد، پودر میوهٔ خرنوب شامل هشت عنصر است که مس (۲۰/۶۵ درصد) و روی (۱۷/۴۵ درصد) درصدهای بالاتر را به خود اختصاص داده‌اند؛ سپس به ترتیب سدیم (۱۷/۱۱ درصد)، پتاسیم (۱۵/۸۹ درصد)، کلسیم (۱۵/۴۹ درصد)، منگنز (۷/۰۰ درصد) و آهن (۶/۴۲ درصد) مشاهده شد (شکل ۳).

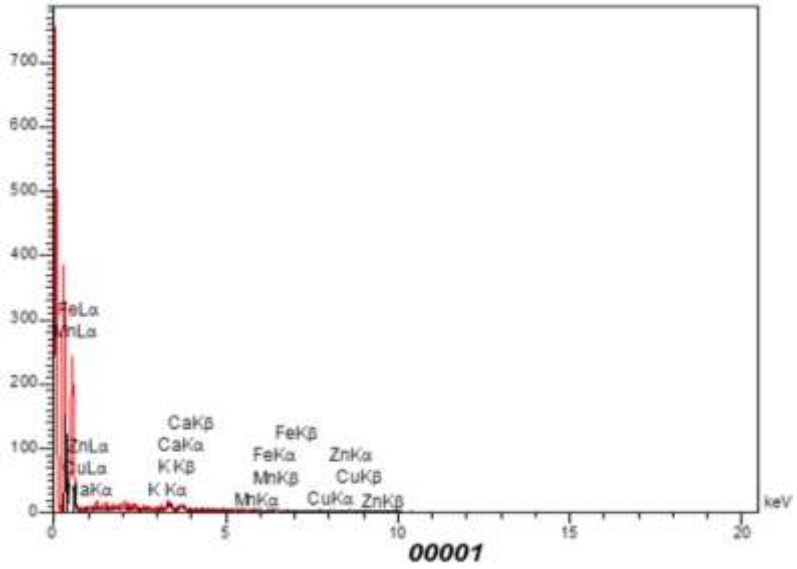
شناسایی اسیدهای چرب GC- FID: آنالیز روغن به‌دست‌آمده از میوهٔ *Ceratonia siliqua* L. وجود هشت اسید چرب را نشان می‌دهد. با توجه به جدول شمارهٔ ۲، آراشیدیک اسید با غلظت ۴۱/۸۵ درصد به‌عنوان اسید چرب غالب بود و سپس به ترتیب لنتیونین، سیس-۱۰ پنتا دکانوئیک اسید، استئاریک اسید، سیس-۴ .۷. ۱۰. ۱۳. ۱۶. ۱۹- دکوساهگزانوئیک اسید، بهینیک اسید، لینولنیک اسید و اولئیک اسید مشاهده شد (جدول ۲).

جدول ۲. میزان اسیدهای چرب موجود در میوهٔ خرنوب

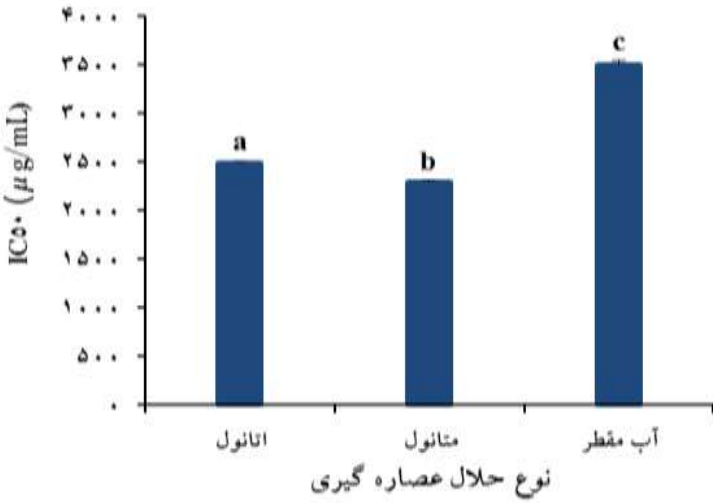
نام اسید چرب	نوع اسید چرب	درصد
آراشیدیک اسید	C20:0	**41.85**
لنتیونین	C18:2n6t	**28.04**
سیس-۱۰ پنتا دکانوئیک اسید	C15:1	**16.33**
استئاریک اسید	C18:0	**4.23**
سیس-۴ .۷ .۱۰ .۱۳ .۱۶ .۱۹- دکوساهگزانوئیک اسید	C22:6n3	**3.93**
بهینیک اسید	C22:0	**2.73**
لینولنیک اسید	C18:3	**1.74**
اولئیک اسید	C18:1n9c	**1.16**

بررسی ویژگی آنتی‌اکسیدانی با آزمون ABTS:

بررسی IC_{50} به‌دست‌آمده از عصاره‌ها با استفاده از محلول ABTS نشان داد که عصاره‌های به‌دست‌آمده اختلاف معناداری باهم دارند ($P<0.05$). بیشترین مقدار IC_{50} مربوط به عصارهٔ به‌دست‌آمده از حلال آب بود (شکل ۴).



شکل ۳. آزمون ایدکس از میوهٔ خرنوب



شکل ۴. غلظت مؤثر برای ایجاد ۵۰ درصد بازدارندگی از فعالیت کاتیون رادیکال‌های ABTS توسط عصاره‌های مختلف میوهٔ خرنوب. حروف متفاوت در بالای ستون‌ها معرف تفاوت معنادار میان میانگین‌های غلظت مؤثر برای ایجاد ۵۰ درصد بازدارندگی با حلال‌های مختلف است.

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به اینکه میوهٔ درخت خرنوب از زمان‌های گذشته، به‌صورت سنتی در درمان بسیاری از بیماری‌ها استفاده می‌شود و در سال‌های اخیر به علت آثار نامطلوب داروهای شیمیایی و ساختگی (۱۰)، توجه بسیاری از بیماران ناباروری به‌سوی این گیاه معطوف گشته است، مطالعهٔ فیتوشیمیایی، شناسایی ترکیبات شیمیایی و اسیدهای چرب آن اهمیت فراوانی در کاربرد این گیاه در درمان بیماری‌ها دارد. بر اساس بررسی‌های صورت‌گرفته، حلال آب بیشترین بازده (۲۶/۰۳۷ درصد) را نشان داد. رزوریو و همکارانش (۲۰۱۳) گزارش کردند که بیشترین عصارهٔ به‌دست‌آمده از میوهٔ خرنوب با روش استخراج با امواج فراصوت و تکان دادن (Shaking flasks)، مربوط به عصارهٔ مستخرج از حلال آب بود (به ترتیب ۱۷/۲۹ درصد و ۵۳/۱۷ درصد) (۱۱).

بررسی دجد و همکاران بر عصاره میوهٔ خرنوب (۲۰۱۷) نشان داد از میان عصاره‌های هگزانی، کلروفرمی، اتیل استاتی و استون ۷۰ درصد، عصارهٔ استون ۷۰ درصد در مرحلهٔ نابالغ و رسیدهٔ این میوه به ترتیب با مقادیر ۴۱/۷۲±۲/۰۴ و ۵۱/۰۶±۱/۵۱ درصد بیشترین عصاره را دارد، درحالی‌که عصارهٔ کلروفرمی در مرحلهٔ نابالغ و عصارهٔ هگزانی در مرحلهٔ رسیده با مقادیر ۰/۵±۰/۰۳ و ۰/۲۸±۰/۰۷ درصد کمترین بازده عصاره را دارند (۱۲) که نتایج آن‌ها با نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش هم‌خوانی دارد. با افزایش قطبیت حلال، بازده عصاره‌گیری نیز افزایش می‌یابد (۱۳). ازآنجاکه بخش عمده‌ای از ترکیبات شیمیایی میوهٔ خرنوب را ترکیبات قطبی تشکیل می‌دهد، این ترکیبات در آب حل می‌شوند و بازده با حلال آب را افزایش می‌دهند.

نتایج به‌دست‌آمده از بررسی‌های فیتوشیمیایی صورت‌گرفته بر روی میوهٔ گیاه خرنوب حضور ترکیبات ساپونینی، آلکالوئیدی، فلاونوئیدی، تانینی، گلیکوزیدی، استروئیدی و ترپنوئیدی در عصارهٔ ماسراسیون اتانولی را تأیید می‌کند. آنالیز کیفی فیتوشیمیایی انجام‌شدهٔ ایوایس و همکارانش (۲۰۱۷) بر روی عصارهٔ متانولی استخراج‌شده به روش ماسراسیون بر روی میوهٔ خرنوب، حضور ترکیبات آلکالوئیدی، تانینی، کاردیاک گلیکوزیدی، فلاونوئیدی، استرولی، آمینواسیدی، ساپونینی و ترپنوئیدی و حضور نداشتن آنتوسیانین‌ها را تأیید کرد (۱۳) که نتایج آن‌ها با نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش هم‌خوانی دارد.

فارگ و همکاران (۲۰۱۷) ۳۱ ترکیب شیمیایی در خرنوب را به‌وسیلهٔ GC- MS شناسایی کردند که ۷۱ درصد ترکیبات را اسیدهای چرب تشکیل داده است و بیشترین مقدار آن مربوط به هگزانوئیک اسید بود (۱۴). نتایج تست ایدکس درصد بالای روی و مس را نشان داده است. یوسف و همکاران (۲۰۱۳) عناصر آهن، روی، منگنز و مس با استفاده از جذب اتمی، مقادیر سدیم و پتاسیم با استفاده از فلیم فتومتر و با استفاده از تیتراسیون و نیز کلسیم موجود در میوهٔ خرنوب را اندازه‌گیری کردند. بر اساس پژوهش آنان، پتاسیم و سپس سدیم بیشترین مقدار را در میوهٔ خرنوب داشتند (۱۵). استرس اکسیداتیو در سلول‌ها سبب ناباروری اسپرم‌ها می‌شود. سوپراکسید دیسموتاز یکی از آنزیم‌های مهم سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی است و تقریباً در همهٔ سلول‌هایی وجود دارد که در معرض اکسیژن قرار دارند. برای فعالیت این آنزیم به مس نیاز است (۱۶). احتمالاً نقش درمانی این گیاه به این علت است که می‌تواند عناصری را به محیط اضافه کند که این عناصر نقش کوآنزیمی در آنزیم‌های درگیر با استرس اکسیداتیو دارند. عنصر روی نقش مهمی در بیوسنتز و تکوین اسپرم دارد. کمبود روی باعث کاهش تعداد اسپرم، میل جنسی و اندازهٔ بیضه‌ها می‌شود (۱۷). به‌طورکلی، عناصر کمیاب ازجمله کلسیم، منیزیم، مس، سلنیوم و روی برای تولیدمثل جنسی نر ضروری و نقش مهمی در کیفیت منی ایفا می‌کنند (۱۸). بر طبق نتایج به‌دست‌آمده، ۸ اسید چرب شناسایی شد که بیشترین مقدار اسیدهای چرب مربوط به آراشیدیک اسید (۴۱/۸۵ درصد) و لینولدیک اسید (۲۸/۰۴ درصد) است.

طی تحقیقی، ماتائوس و همکاران (۲۰۱۱) میزان لیپید دانهٔ میوهٔ دو نوع خرنوب خودرو و کاشته شده در ترکیه را ارزیابی کردند که منجر به شناسایی ۵ نوع اسید چرب شد و لینولئیک اسید (۵۱ و ۴۹/۱ درصد) را در هر دو نوع میوهٔ بررسی‌شده، به‌عنوان بیشترین اسید چرب گزارش نمودند (۵)، درحالی‌که در تحقیق حاضر، این نوع اسید چرب مشاهده نشد. مقدار اولئیک اسید گزارش‌شدهٔ ماتائوس و همکاران بیست‌وپنج برابر بیشتر از مقدار گزارش‌شده در این پژوهش بود. اسیدهای چرب دیگر به‌دست‌آمده از تحقیق

ماتائوس و همکاران شامل اولئیک اسید (۲۶/۵ و ۳۰/۴ درصد)، پالمتیک اسید (۱۲ و ۱۰/۳ درصد)، استئاریک اسید (۴/۶ و ۳/۵ درصد) و پالمیتولئیک اسید (۰/۱ و ۰/۲ درصد) بودند. آراشیدیک اسید، اسید چرب غالب (۴۱/۸۵ درصد) موجود در میوهٔ خرنوب موردمطالعه معرفی گردید که بسیار بیشتر از مقدار برآوردشدهٔ یوسف و همکاران (۲۰۱۳) (۱/۵۱ درصد) برای میوهٔ خرنوب تهیه‌شده از مصر بود. در تحقیق یوسف و همکاران، لوریک اسید (۰/۷۵ درصد)، میریستیک اسید (۱/۱۱ درصد)، پالمتیک اسید (۱۱/۰۱ درصد)، پالمیتولئیک اسید (۰/۶۵ درصد)، هپتا دکانوئیک اسید (۰/۳ درصد)، استئاریک اسید (۳/۰۸ درصد)، اولئیک اسید (۴۰/۴۵ درصد)، لینولئیک اسید (۲۳/۱۹ درصد)، لینولنیک اسید (۲/۴۷ درصد)، آراشیدیک اسید (۱/۵۱ درصد)، بهینیک اسید (۰/۴۵ درصد) شناسایی شدند (۱۵)، درحالی‌که در تحقیق ما میریستیک اسید، پالمتیک اسید، پالمیتولئیک اسید، هپتا دکانوئیک اسید و لینولئیک یافت نشد. اوضاع اقلیمی ازجمله نور، دما، ویژگی‌های خاک، ارتفاع محل، طول و عرض جغرافیایی باعث تفاوت در کمیت و کیفیت مواد مؤثرهٔ گیاهان در مناطق مختلف شده است (۲۰).

میان مکمل‌های اسید چرب غیراشباع و افزایش تعداد اسپرم و تحرک آن، رابطهٔ مثبت و معناداری وجود دارد و دراین‌باره نیز مطالعاتی انجام‌شده است (۲۱). در مطالعهٔ مختاری و همکاران (۲۰۱۲)، در تأثیر خرنوب بر هورمون‌های جنسی موش مشخص شد که مصرف عصارهٔ دانهٔ خرنوب باعث افزایش در غلظت تستوسترون، هورمون دی هیدروتستوسترون و کاهش سطح LH شده است (۱۱). اسیدهای گاما لینولنیک اسید و آلفا لینولنیک اسید موجود در دانه‌های خرنوب، ابتدا به دی هوموگامالینولنیک اسید و سپس به PGE2 تبدیل می‌گردد. PGE2 سبب افزایش تولید آدنوزین منوفسفات حلقوی و تحریک تستوسترون می‌شود (۲۲)؛ همچنین در مطالعهٔ مهدیانی و همکاران (۲۰۱۸)، اثر مکمل خرنوب بر تغییرات فراسنج اسپرم، شاخص استرس اکسیداتیو و هورمون‌های جنسی در مردان نابارور بررسی گردید که سبب افزایش غلظت و تحرک اسپرم و کاهش استرس اکسیداتیو شد (۲۳).

بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی نشان داد، $IC_{۵۰}$ برای سه عصارهٔ اتانولی، متانولی و آبی میوهٔ خرنوب اختلاف معناداری با یکدیگر دارند. عصارهٔ آبی بیشترین و عصارهٔ متانولی کمترین $IC_{۵۰}$ را به خود اختصاص داده است. کاستودیو و همکارانش (۲۰۱۳) گزارش کردند که از میان دو عصارهٔ سوکسله‌ای متانولی و آبی میوهٔ خرنوب، عصارهٔ آبی بیشترین $IC_{۵۰}$ با استفاده از محلول ABTS (۳۴۱/۲±۰/۱) و عصارهٔ سوکسله‌ای متانولی میوهٔ خرنوب کمترین $IC_{۵۰}$ (۲۵۳/۲±۰/۰) را دارد (۲۳) که نتایج آنان با نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش هم‌خوانی دارد.

استرس اکسیداتیو باعث پیری، کاهش تحرک اسپرم و تغییرات غیرطبیعی در بافت بیضه می‌گردد و درنهایت، ناباروری به دنبال دارد. آثار رادیکال‌های آزاد توسط آنتی‌اکسیدان‌ها خنثی می‌شود. مصرف خوراکی‌های غنی از آنتی‌اکسیدان می‌تواند یکی از راه‌های مقابله با آسیب‌های اکسیداتیو اسپرم در مردان نابارور باشد (۲۴).

آنتی‌اکسیدان‌ها به دو دستهٔ آنزیمی و غیرآنزیمی تقسیم می‌شوند. گروه آنزیمی شامل سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و تیوردوکسین است. آنتی‌اکسیدان‌های متابولیک و غذایی نیز جزو آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی هستند که می‌توان به بتاکاروتن، مواد معدنی مانند روی، سلنیوم، منگنز و مس، ویتامین‌ها مانند A، E، C اشاره کرد (۲۵). یافته‌های جدید نشان می‌دهد که رژیم غذایی آنتی‌اکسیدانی می‌تواند به حفظ باروری مردان کمک کند. تحقیقات دانشمندان نشان داد که آنتی‌اکسیدان‌ها کیفیت برخی از مؤلفه‌های اسپرم موش را افزایش می‌دهند و در تولیدمثل جنس نر نقش بسیار مهمی دارند (۲۶). سازوکار آنتی‌اکسیدان‌ها در بدن انسان را می‌توان به دو دسته تقسیم کرد؛ الف. آنتی‌اکسیدان‌های پیشگیری‌کننده: این ترکیبات از تشکیل رادیکال‌های آزاد فعال جدید جلوگیری می‌کنند. این آنتی‌اکسیدان‌ها از قبیل آلبومین، فریتین و ترانسفرین هستند که در سرم خون موجودند و به یون‌های فلزی که قدرت اکسیدکنندگی دارند، متصل می‌شوند و آن‌ها را غیرفعال می‌کنند؛ ب. آنتی‌اکسیدان‌های جاروب‌کنندهٔ مولکولی: ویتامین C ، E، کاروتنوئیدها و فلاونوئیدها در این دسته قرار می‌گیرند. این مواد رادیکال‌های آزاد را از بین می‌برند (۲۷). احتمال می‌رود اثر درمانی خرنوب بر ناباروری مربوط به ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بالا و اسیدهای چرب موجود در آن است. بررسی‌ها نشان داد عصارهٔ اتانولی میوهٔ خرنوب دربردارندهٔ ساپونین‌ها، آلکالوئیدها، فلاونوئیدها،

تانن‌ها، گلیکوزیدها، ترپنوئیدها و استروئیدها است؛ همچنین با روش GC-MS، ۳۸ ترکیب شیمیایی در عصارهٔ متانولی شناسایی شدند که فراوان‌ترین آن‌ها اسیدهای چرب بودند. ۸ عنصر معدنی در میوهٔ خرنوب شناسایی شدند که مس و روی عناصر غالب بودند. آنالیز روغن میوهٔ خرنوب وجود ۸ اسید چرب مهم را نشان داد؛ همچنین بررسی‌های این پژوهش نشان داد خاصیت آنتی‌اکسیدانی این میوه بالا است. با توجه به این نتایج به نظر می‌رسد نقش میوهٔ خرنوب در درمان ناباروری می‌تواند به علت وجود ترکیبات آنتی‌اکسیدانی فراوان و نقش آن‌ها در کاهش استرس اکسیداتیو در اسپرم‌ها و همچنین وجود عناصر مغذی به‌عنوان کوفاکتورهای درگیر در مسیر استرس اکسیداتیو و نیز وجود اسیدهای چرب فراوان باشد. به نظر می‌رسد هر یک از این عوامل به‌تنهایی و یا برآیند این عوامل، به خاصیت درمانی این گیاه منجر می‌شود.

سپاس‌گزاری

بدینوسیله از همکاری معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه شهید چمران اهواز به سبب حمایت‌های مالی کمال تشکر و امتنان دارد.

کد اخلاق:EE/1400.3.02.34981/scu.ac.ir

References

1. Custodio L, Fernandes E, Escapa AL, Lopezaviles S, Fajardo A, Aligue R, et al. Antiproliferative and apoptotic activities of extracts from carob tree Ceratonia siliqua L. in MDA-MB-231 human breast cancer cells. Planta Med2008; 74: 48.

2. Ouis N, Hariri A. Phytochemical analysis and antioxidant activity of the flavonoids extracts from pods of Ceratonia siliqua L. Banats J Biotechnol2017;1:8:93-104.

3. Patel V, Patel R. The active constituents of herbs and their plant chemistry, extraction and identification methods. J Chem Pharm 2016; 8: 1423-43.

4. Mojab F, Kamalinejad M, Ghaderi N, Vahidipour H. Phytochemical screening of some species of Iranian plants. Iran J Pharm Sci 2010; 2: 77-82. doi.10.22037/ijpr.2010.16

5. Bhatt S, Dhyani S, Preliminary phytochemical screening of Ailanthus excelsa Roxb. Int J Curr Pharm Res. 2012, 4: 87-9.

6. Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography mass spectrometry. 1th ed. Allured Publication. 2004; P.1-804.

7. Samarghandian S, Shabestari MM. DNA fragmentation and apoptosis induced by safranal in human prostate cancer cell line. Indian J Urol 2013;29:177-83.

8. ISO 660 1983 E. Animal and vegetable fats and oils determination of acid value and acidity. ISO Geneva. 1983; P.1-138.

9. Jadavi N, Vaziri S, Nabipour I. Fat characteristics and fatty acid profile of sea cucumbers Holothuria Scabra obtained from the coasts of the Bushehr province Iran. Iran South Med J2015; 18: 992-1006.

10. Rajurkar NS, Hande SM. Estimation of phytochemical content and antioxidant activity of some selected traditional Indian medicinal plants. Indian J Pharm Sci 2011; 73:146-51. doi. 10.4103/0250-474x.91574.

11. Goulas V, Stylos E, Chatziathanasiadou MV, Mavromoustakos T, Tzakos AG. Functional components of carob fruit: linking the chemical and biological space. Int J Mol Sci2016; 17:1875. doi. 10.3390/ijms17111875

12. Roseiro LB, Duarte LC, Oliveira DL, Roque R. Supercritical, ultrasound and conventional extracts from carob Ceratonia siliqua L. biomass effect on the phenolic profile and antiproliferative activity. Ind Crops Prod2013; 47, 132-138.

13. Ydjedd S, Chaalal M, Richard G, Kati DE, Lopeznicolas R, Fauconnier ML, et al. Assessment of antioxidant potential of phenolic compounds fractions of Algerian Ceratonia siliqua L. pods during ripening stages. Int Food Res J2017; 24: 2041-9.

14. Jones DP, Coates RJ, Flagg EW, Eley JW, Block G, Greenberg RS, et al. Glutathione in foods listed in the national cancer institute's health habits and history food frequency questionnaire. Nutr Cancer 1992; 17: 57-75. doi.10.1080/01635589209514173.

15. Farag MA, Elkersh DM. Volatiles profiling in Ceratonia siliqua from Egypt and in response to roasting as analyzed via solid phase microextraction coupled to chemometrics. Adv Res 2017, 8:379-85.

16. Youssef MKE, Elmanfaloty MM, Ali, HM. Assessment of proximate chemical composition, nutritional status, fatty acid composition and phenolic compounds of carob Ceratonia siliqua L. Publ Health Nutr 2013; 3: 304-8.
17. Eidi M, Eidi A, Pouyan O, Shahmohammadi P, Fazaeli R, Bahar M. Seminal plasma levels of copper and its relationship with seminal parameters. IJRM 2010; 8 :60-5.
18. Vazquezarmijo JF, Rojo R, Garcia RM, Lopez D, Salem AFZ, Dominguez IA, et al. Effect of season on serum copper and zinc concentrations in crossbred goats having different reproductive status under semiarid rangeland conditions in Southern Mexico State. Trop Sub Trop2011; 14: 331- 5.
19. Guzikowski W, Szynkowska MI, Motakpochrzęst H, Pawlaczyk A, Sypniewski S. Trace elements in seminal plasma of men from infertile couples. Arch Med Sci. 2015; 11:591-8. doi.10.5114/aoms.2015.52363
20. Matthaus B, Ozcan MM. Lipid evaluation of cultivated and wild carob Ceratonia siliqua L. seed oil growing in Turkey. Sci Horticul2011; 130:181-4.
21. Omid Beigi R. Production and processing of medicinal plants. 3 th ed. Astan Ghods Razavi Publications. 2005; P. 81-93.
22. Safarinejad MR. Effect of omega3 polyunsaturated fatty acid supplementation on semen profile and enzymatic anti-oxidant capacity of seminal plasma in infertile men with idiopathic oligoasthenoteratospermia a double blind placebo controlled randomised study. Andrologia 2011; 43: 38-47. doi.10.1111/j.1439-0272.2009.01013.x.
23. Mobli M, Qaraaty M, Amin G, Haririan I, Hajimahmoodi M, Rahimi R. Scientific evaluation of medicinal plants used for the treatment of abnormal uterine bleeding by Avicenna. Arch Gynecol Obstet 2015; 292:21-35. doi.10.1007/s00404-015-3629-x.
24. Mahdiani E, Haghighian H, Javadi M, Karami AA, Kavianpour M. Effect of carob Ceratonia siliqua L. oral supplementation on changes of semen parameters oxidative stress, inflammatory biomarkers and reproductive hormones in infertile men. SJKUMS2018; 23:56-66.
25. Custodio L, Escapa AL, Patarra J, Aligue R, Albericio F, Neng NR, et al. Sapwood of carob tree Ceratonia siliqua L. as a potential source of bioactive compounds. Rec Nat Prod2013; 7: 225-9.
26. Lombardo F, Sansone A, Romanelli F, Paoli D, Gandini L, Lenzi A. The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility an overview. Asian J Androl 2011; 13:690-7. doi.10.1038/aja.2010.183.
27. Gomes EC, Silva AN, de Oliveira MR. Oxidants antioxidants and the beneficial roles of exercise induced production of reactive species. Oxid Med Cell Longev2012; 2012:756132. doi.10.1155/2012/756132.
28. Mohammadi Sh, Movahedin M, Mowla SJ. Antioxidant effects of selenium on sperm parameters and testicular structure in young and aged Mice. J Rep Inf 2008; 9:229-237.
29. Agarwal A, Prabakaran SA, Said TM. Prevention of oxidative stress injury to Sperm. J Androl2005; 26: 654-60. doi.10.2164/jandrol.05016.

Phytochemical Investigation, Antioxidant Properties, and Identification of Organic and Inorganic Compounds from the Carob (*Ceratonia siliqua* L.) Fruit

Nasiri M[1], Mokhtari B[1], Kolahi M[2], Pourreza N[1]*

(Received: June 29, 2020 Accepted: March 13, 2021)

Abstract

Introduction: Carob (*Ceratonia siliqua* L.) is a tree belonging to the Leguminosae family. It is used for forestry and ornamental purposes. The tree is of importance due to its medicinal properties and its ability to treat infertility. The present study aimed to investigate the chemical composition and fatty acid profile of the fruit.

Materials & Methods: Maximum extraction yields of the fruit were determined by utilizing different solvents for extraction. Methanolic extracts of the fruit were analyzed by GC-MS. EDS analysis was utilized for elemental analysis of the dried fruit powder (pods). The fatty acid profile of the fruit was determined by GC-FID. Antioxidant properties of the extracts were evaluated utilizing the ABTS assay.

Findings: Highest extraction yields were obtained with water. Phytochemical tests confirmed the presence of saponins, alkaloids, flavonoids, tannins, glycosides, steroids, and terpenoids in ethanolic extracts of the fruit. In total, 38 organic compounds were identified in methanolic extracts of the fruit, most of which belonged to fatty acids. Totally, 8 minerals were identified of which copper and zinc were the main minerals. Analysis of lipid extracts revealed the presence of eight fatty acids. Antioxidant activity of the extracts showed that aqueous extracts had the highest IC_{50} value.

Discussions & Conclusions: The role of Carob fruit in the treatment of infertility can be due to the presence of many antioxidant compounds and their role in reducing oxidative stress in sperm and also the presence of nutrients as cofactors involved in the path of oxidative stress and also the presence of abundant fatty acids.

Keywords: Antioxidants, Carob, Chemical compounds, Fatty acids

1.Dept of Chemistry, Faculty of Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
2.Dept of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
**Corresponding author Email: m.kolahi@scu.ac.ir*