

## بررسی خواص فیتوشیمیایی، آنتی اکسیدانی و شناسایی ترکیبات آلی و معدنی میوه گیاه خرنوب (*Ceratonia siliqua* L.)

مریم نصیری<sup>۱</sup>، بابک مختاری<sup>۱</sup>، مریم کلاهی<sup>۲\*</sup>، ناهید پوررضا<sup>۱</sup>

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

(۲) گروه زیست شناسی، دانشکده 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 خانواده حبوبات است که برای جنگل‌زایی و اهداف زینتی استفاده می‌شود. با توجه به خواص دارویی از جمله 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، عصاره 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 آنتی اکسیدانی عصاره‌ها با روش ABTS آزمایش شد.

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

**بحث و نتیجه‌گیری:** نقش میوه خرنوب در درمان ناباروری می‌تواند به علت وجود ترکیبات آنتی اکسیدانی 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:** آنتی اکسیدان، اسیدهای چرب، ترکیب شیمیایی، خرنوب

\* نویسنده مسئول: گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

Email: m.kolahi@scu.ac.ir

## مقدمه

خرنوب درختی همیشه‌سبز بومی مناطق مدیترانه با نام علمی *Ceratonia siliqua* L. از راسته فابالس، خانواده حبوبات، زیرخانواده ارغوانیان، جنس (سرده) خرنوب، گونه *siliqua* است. این درخت برای جنگل‌زایی در مناطق خشک و همچنین برای اهداف زینتی استفاده می‌شود. پالپ و دانه دو جزء اصلی میوه خرنوب هستند. دانه‌ها ۱۰ درصد وزن میوه و پالپ ۹۰ درصد دیگر میوه را تشکیل می‌دهند. میوه رسیده خرنوب دربردارنده مقدار فراوانی تانن فشرده، فیبر و پروتئین و مقدار کمی لیپید و همچنین مقدار بالایی مواد قندی است. پودر پالپ به‌عنوان یک ماده غذایی و مکمل کاکائو برای تهیه 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 پلی‌فلی، 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 میوه 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 حدود ۲۰ 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 میوه 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:** میوه خشک‌شده خرنوب در دی‌ماه ۱۳۹۶ تهیه و از سوی گروه زیست‌شناسی دانشگاه شهید چمران اهواز شناسایی گردید. میوه خرنوب خریداری‌شده ابتدا برای از بین بردن ذرات گردوغبار و مواد آلوده 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 میوه خرنوب پودر شد.

**عصاره‌گیری از گیاه به روش ماسراسیون:** ۲۰ گرم از پودر را با حلال‌های گوناگون (آب مقطر، اتانول ۹۶ درصد، متانول ۹۹/۵ درصد و کلروفرم) به مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق، روی همزن مغناطیسی با دور ۴۰۰۰ بر ساعت قرار داده تا عصاره‌گیری کامل شود. عصاره به‌دست آمده در تبخیرکننده چرخان تغلیظ شده است. درنهایت، وزن عصاره‌ها به‌دست آمد و بازده عصاره‌گیری بر اساس معادله شماره ۱ محاسبه گردید. آنگاه عصاره تغلیظ‌شده در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۲).

معادله شماره ۱.  $100 \times (\text{وزن پودر خشک گیاه} / \text{وزن عصاره به‌دست آمده}) = \text{بازده عصاره}$

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

**تعیین ترکیبات موجود در عصاره ماسراسیون متانولی میوه خرنوب با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی- طیف‌سنج جرمی:** به‌منظور تعیین ترکیبات موجود در عصاره متانولی ماسراسیون میوه خرنوب، ۱ میکرولیتر از عصاره 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: HP-5MS 30m x 250  $\mu$ m x 0.25  $\mu$ m؛ دمای محفظه تزریق: ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد؛ نوع و سرعت کل

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

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

**آنالیز میوه خرنوب با تکنیک EDS:** به منظور تشخیص نوع و میزان عناصر موجود در پودر خشک میوه خرنوب، آنالیز EDS صورت گرفت (۷).

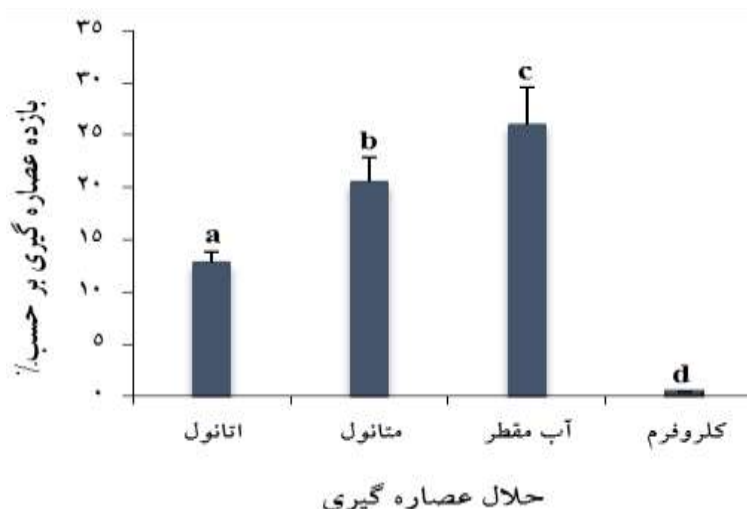
**شناسایی اسیدهای چرب موجود در پودر میوه خرنوب به روش GC- FID:** آماده سازی متیل استر اسیدهای چرب بر اساس روش گزارش شده استاندارد ملی ایران ۱۳۱۲۶-۲ با کد ICS:67.200.10 انجام شد (۷). آنالیز متیل استر اسیدهای چرب با دستگاه کروماتوگرافی گازی طبق روش جداوی و همکاران انجام گردید (۸).

**روش ظرفیت آنتی اکسیدانی با روش کاتیون زدایی رادیکال ABTS:** فعالیت مهارکنندگی رادیکال

کاتیون ABTS عصاره ها با استفاده از روش راجورکار و همکاران با اصلاحاتی صورت گرفت (۹). فعالیت مهارکنندگی رادیکال کاتیون به صورت  $IC_{50}$  برحسب میلی گرم بر لیتر بیان گردید.

### یافته های پژوهش

**بازده عصاره گیری:** بررسی مقدار عصاره های به دست آمده از عصاره های میوه خرنوب با حلال های مختلف به روش ماسراسیون نشان داد که اختلاف معناداری باهم دارند. حلال کلروفرم کمترین میزان را نشان داد و به علت بازده کم عصاره گیری با حلال کلروفرم، در ادامه از سایر آزمایش ها حذف شد ( $P < 0.05$ ) (شکل شماره ۱).

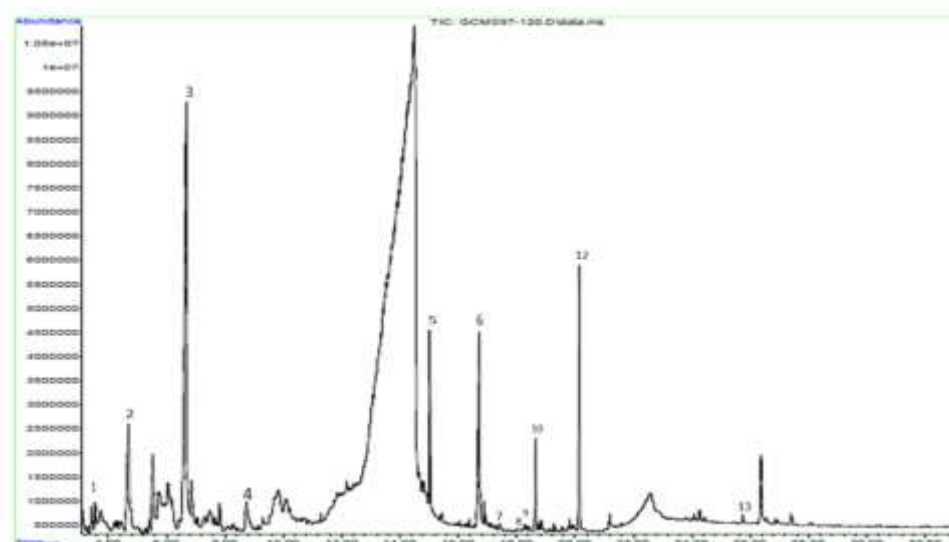


شکل ۱. بازده عصاره گیری. مقادیر یادشده میانگین دو بار تکرار  $\pm$  خطای استاندارد است. حروف متفاوت در بالای ستون ها معرف تفاوت معنادار میان میانگین های بازده با روش های مختلف عصاره گیری است.

### شناسایی ترکیب های موجود در عصاره متانولی

**گیاه میوه خرنوب:** کروماتوگرام نمونه و ترکیبات شیمیایی با درصد احتمال بالاتر از ۵۰ درصد ارائه شده است (شکل ۲ و جدول ۱). روش کروماتوگرافی گازی- طیف سنج جرمی، ۳۸ ترکیب آلی را در این نمونه شناسایی کرد که بیشترین آن ها متعلق به اسیدهای چرب بودند.

**بررسی های فیتوشیمیایی:** نتایج به دست آمده از بررسی های مقدماتی فیتوشیمیایی، حضور ساپونین ها، آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، تانن ها، گلیکوزیدها، استروئیدها و ترپنوئیدها را در عصاره اتانولی میوه خرنوب تأیید می کند.



شکل ۲. طیف GC عصاره متانولی میوه خرنوب به روش ماسراسیون. اعداد بالای هر پیک مربوط به ترکیبات ارائه شده در جدول شماره ۱ است.

جدول ۱. ترکیبات شیمیایی به دست آمده 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, diisooctyl ester       | 20.144       | ۹۱          | 1.18  |
| ۱۳                | Stigmasterol, 22,23-dihydro-                         | 25.866       | ۹۱          | 0.75  |

**شناسایی اسیدهای چرب GC- FID:** آنالیز روغن به دست آمده از میوه *Ceratonia siliqua* L. وجود هشت اسید چرب را نشان می دهد. با توجه به جدول شماره ۲، آراشیدیک اسید با غلظت ۴۱/۸۵ درصد به عنوان اسید چرب غالب بود و سپس به ترتیب لتیونین، سیس-۱۰ پنتا دکانوئیک اسید، استتاریک اسید، سیس-۴، ۷، ۱۰، ۱۳، ۱۶، ۱۹- دکوساهگزانوئیک اسید، بهینیک اسید، لینولنیک اسید و اولئیک اسید مشاهده شد (جدول ۲).

**آنالیز میوه خرنوب به روش EDS:** نتایج به دست آمده از آنالیز EDS نشان داد، پودر میوه خرنوب شامل هشت عنصر است که مس (۲۰/۶۵ درصد) و روی (۱۷/۴۵ درصد) درصدهای بالاتر را به خود اختصاص داده اند؛ 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).

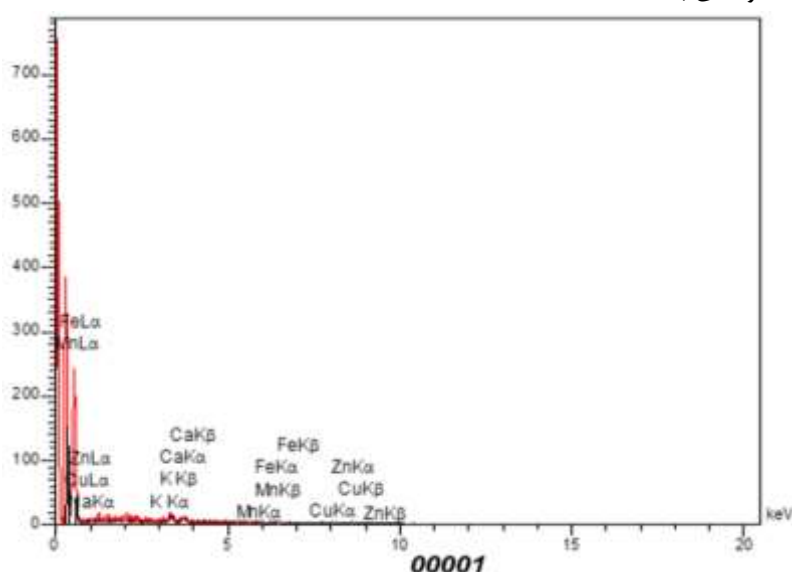
جدول ۲. میزان اسیدهای چرب موجود در میوه خرنوب

| نام اسید چرب                           | نوع اسید چرب | درصد  |
|----------------------------------------|--------------|-------|
| آراشیدیک اسید                          | C20:0        | 41.85 |
| لنتیونین                               | C18:2n6t     | 28.04 |
| سیس-۱۰ پنتا دکانویک اسید               | C15:1        | 16.33 |
| استاریک اسید                           | C18:0        | 4.23  |
| سیس-۴،۷،۱۰،۱۳،۱۶،۱۹-دکوساهگزانویک اسید | C22:6n3      | 3.93  |
| بهینیک اسید                            | C22:0        | 2.73  |
| لینولیک اسید                           | C18:3        | 1.74  |
| اولئیک اسید                            | C18:1n9c     | 1.16  |

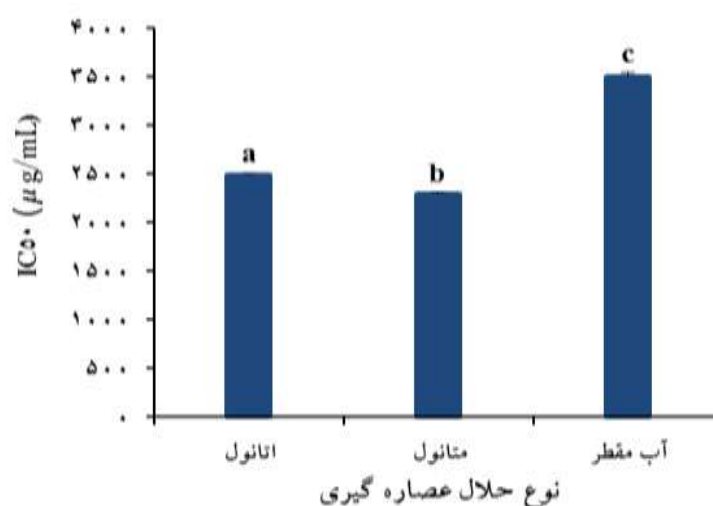
### بررسی ویژگی آنتی اکسیدانی با آزمون ABTS:

معناداری باهم دارند ( $P < 0.05$ ). بیشترین مقدار  $IC_{50}$  مربوط به عصاره به دست آمده از حلال آب بود (شکل ۴).

بررسی  $IC_{50}$  به دست آمده از عصاره ها با استفاده از محلول ABTS نشان داد که عصاره های به دست آمده اختلاف



شکل ۳. آزمون ایدکس از میوه خرنوب



شکل ۴. غلظت مؤثر برای ایجاد ۵۰ درصد بازدارندگی از فعالیت کاتیون رادیکال های ABTS توسط عصاره های مختلف میوه خرنوب. حروف متفاوت در بالای ستون ها معرف تفاوت معنادار میان میانگین های غلظت مؤثر برای ایجاد ۵۰ درصد بازدارندگی با حلال های مختلف است.

## بحث و نتیجه گیری

با توجه به اینکه میوه درخت خرنوب از زمان های گذشته، به صورت سنتی در درمان بسیاری از بیماری ها استفاده می شود و در سال های اخیر به علت آثار نامطلوب داروهای شیمیایی و ساختگی (۱۰)، توجه بسیاری از بیماران ناباروری به سوی این گیاه معطوف گشته است، مطالعه فیتوشیمیایی، شناسایی ترکیبات شیمیایی و اسیدهای چرب آن اهمیت فراوانی در کاربرد این گیاه در درمان بیماری ها دارد. بر اساس بررسی های صورت گرفته، حلال آب بیشترین بازده (۲۶/۰۳۷ درصد) را نشان داد. رزوریو و همکارانش (۲۰۱۳) گزارش کردند که بیشترین عصاره به دست آمده از میوه خرنوب با روش استخراج با امواج فراصوت و تکان دادن (Shaking flasks)، مربوط به عصاره مستخرج از حلال آب بود (به ترتیب ۱۷/۲۹ درصد و ۵۳/۱۷ درصد) (۱۱).

بررسی دجد و همکاران بر عصاره میوه خرنوب (۲۰۱۷) نشان داد از میان عصاره های هگزانی، کلروفرمی، اتیل استاتی و استون ۷۰ درصد، عصاره استون ۷۰ درصد در مرحله نابالغ و رسیده این میوه به ترتیب با مقادیر  $41/72 \pm 2/04$  و  $51/06 \pm 1/51$  درصد بیشترین عصاره را دارد، درحالی که عصاره کلروفرمی در مرحله نابالغ و عصاره هگزانی در مرحله رسیده با مقادیر  $0/5 \pm 0/3$  و  $0/28 \pm 0/07$  درصد کمترین بازده عصاره را دارند (۱۲) که نتایج آن ها با نتایج به دست آمده از این پژوهش هم خوانی دارد. با افزایش قطبیت حلال، بازده عصاره گیری نیز افزایش می یابد (۱۳). از آنجا که بخش عمده ای از ترکیبات شیمیایی میوه خرنوب را ترکیبات قطبی تشکیل می دهد، این ترکیبات در آب حل می شوند و بازده با حلال آب را افزایش می دهند.

نتایج به دست آمده از بررسی های فیتوشیمیایی صورت گرفته بر روی میوه گیاه خرنوب حضور ترکیبات ساپونینی، آلکالوئیدی، فلاونوئیدی، تانی، گلیکوزیدی، استروئیدی و ترپنوئیدی در عصاره ماسراسیون اتانولی را تأیید می کند. آنالیز کیفی فیتوشیمیایی انجام شده ایوایس و همکارانش (۲۰۱۷) بر روی عصاره متانولی استخراج شده به روش ماسراسیون بر روی میوه خرنوب، حضور ترکیبات آلکالوئیدی، تانی، کاردیاک گلیکوزیدی، فلاونوئیدی، استرولی، آمینواسیدی، ساپونینی و ترپنوئیدی و حضور

نداشتن آنتوسیانین ها را تأیید کرد (۱۳) که نتایج آن ها با نتایج به دست آمده از این پژوهش هم خوانی دارد. فارگ و همکاران (۲۰۱۷) ۳۱ ترکیب شیمیایی در خرنوب را به وسیله 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 میوه خرنوب را اندازه گیری کردند. بر اساس پژوهش آنان، پتاسیم و سپس سدیم بیشترین مقدار را در میوه خرنوب داشتند (۱۵). استرس اکسیداتیو در سلول ها سبب ناباروری اسپرم ها می شود. سوپراکسید دیسموتاز یکی از آنزیم های مهم سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی است و تقریباً در همه سلول هایی وجود دارد که در معرض اکسژن قرار دارند. برای فعالیت این آنزیم به مس نیاز است (۱۶). احتمالاً نقش درمانی این گیاه به این علت است که می تواند عناصری را به محیط اضافه کند که این عناصر نقش کوانزیمی در آنزیم های درگیر با استرس اکسیداتیو دارند. عنصر روی نقش مهمی در بیوسنتز و تکوین اسپرم دارد. کمبود روی باعث کاهش تعداد اسپرم، میل جنسی و اندازه بیضه ها می شود (۱۷). به طور کلی، عناصر کمیاب از جمله کلسیم، منیزیم، مس، سلنیوم و روی برای تولید مثل جنسی ضروری و نقش مهمی در کیفیت منی ایفا می کنند (۱۸). بر طبق نتایج به دست آمده، ۸ اسید چرب شناسایی شد که بیشترین مقدار اسیدهای چرب مربوط به آراشیدیک اسید (۴۱/۸۵ درصد) و لینولیدیک اسید (۲۸/۰۴ درصد) است.

طی تحقیقی، ماثائوس و همکاران (۲۰۱۱) میزان لیپید دانه میوه 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 میوه بررسی شده، به عنوان بیشترین اسید چرب گزارش نمودند (۵)، درحالی که در تحقیق حاضر، این نوع اسید چرب مشاهده نشد. مقدار اولئیک اسید گزارش شده ماثائوس و همکاران بیست و پنج برابر بیشتر از مقدار گزارش شده در این پژوهش بود. اسیدهای چرب دیگر به دست آمده از تحقیق

ماتائوس و همکاران شامل اولئیک اسید (۲۶/۵ و ۳۰/۴ درصد)، پالمیتیک 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 میوه خرنوب مورد مطالعه معرفی گردید که بسیار بیشتر از مقدار برآوردشده یوسف و همکاران (۲۰۱۳) (۱/۵۱ درصد) برای میوه خرنوب تهیه شده از مصر بود. در تحقیق یوسف و همکاران، لوریک اسید (۰/۷۵ درصد)، میریستیک اسید (۱/۱۱ درصد)، پالمیتیک اسید (۱۱/۰۱ درصد)، پالمیتولئیک اسید (۰/۶۵ درصد)، هپتا دکانولئیک اسید (۰/۳ درصد)، استئاریک اسید (۳/۰۸ درصد)، اولئیک اسید (۴۰/۴۵ درصد)، لینولئیک اسید (۲۳/۱۹ درصد)، لینولئیک اسید (۲/۴۷ درصد)، آراشیدیک اسید (۱/۵۱ درصد)، بهینیک اسید (۰/۴۵ درصد) شناسایی شدند (۱۵)، درحالی که در تحقیق ما میریستیک اسید، پالمیتیک اسید، پالمیتولئیک اسید، هپتا دکانولئیک اسید و لینولئیک یافت نشد. اوضاع اقلیمی از جمله نور، دما، ویژگی‌های خاک، ارتفاع محل، طول و عرض جغرافیایی باعث تفاوت در کمیت و کیفیت مواد مؤثره گیاهان در مناطق مختلف شده است (۲۰).

میان مکمل‌های اسید چرب غیراشباع و افزایش تعداد اسپرم و تحرک آن، رابطه مثبت و معناداری وجود دارد و در این باره نیز مطالعاتی انجام شده است (۲۱). در مطالعه مختاری و همکاران (۲۰۱۲)، در تأثیر خرنوب بر هورمون‌های جنسی موش مشخص شد که مصرف عصاره دانه خرنوب باعث افزایش در غلظت تستوسترون، هورمون دی هیدروتستوسترون و کاهش سطح LH شده است (۱۱). اسیدهای گاما لینولئیک اسید و آلفا لینولئیک اسید موجود در دانه‌های خرنوب، ابتدا به دی هوموگامالینولئیک اسید و سپس به PGE2 تبدیل می‌گردد. PGE2 سبب افزایش تولید آدنوزین منوفسفات حلقوی و تحریک تستوسترون می‌شود (۲۲)؛ همچنین در مطالعه 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<sub>50</sub> برای سه عصاره اتانولی، متانولی و آبی میوه خرنوب اختلاف

معناداری با یکدیگر دارند. عصاره آبی بیشترین و عصاره متانولی کمترین IC<sub>50</sub> را به خود اختصاص داده است. کاستودیو و همکارانش (۲۰۱۳) گزارش کردند که از میان دو عصاره سوکسله‌ای متانولی و آبی میوه خرنوب، عصاره آبی بیشترین IC<sub>50</sub> با استفاده از محلول ABTS (۳۴۱/۲±۰/۱) و عصاره سوکسله‌ای متانولی میوه خرنوب کمترین IC<sub>50</sub> (۲۵۳/۲±۰/۰) را دارد (۲۳) که نتایج آنان با نتایج به دست آمده از این پژوهش هم‌خوانی دارد.

استرس اکسیداتیو باعث پیری، کاهش تحرک اسپرم و تغییرات غیرطبیعی در بافت بیضه می‌گردد و در نهایت، 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 دسته آنزیمی و غیرآنزیمی تقسیم می‌شوند. گروه آنزیمی شامل سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز، گلوکاتایون 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 جاروب‌کننده 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 عصاره اتانولی میوه خرنوب دربردارنده ساپونین‌ها، آلکالوئیدها، فلاونوئیدها،

عناصر مغذی به عنوان کوفاکتورهای درگیر در مسیر استرس اکسیداتیو و نیز وجود اسیدهای چرب فراوان باشد. به نظر می رسد هر یک از این عوامل به تنهایی و یا برآیند این عوامل، به خاصیت درمانی این گیاه منجر می شود.

### سپاس گذاری

بدینوسیله از همکاری معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه شهید چمران اهواز به سبب حمایت های 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 *Ceratonía siliqua* L. in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Planta Med* 2008; 74: 48.
2. Ouis N, Hariri A. Phytochemical analysis and antioxidant activity of the flavonoids extracts from pods of *Ceratonía siliqua* L. *Banats J Biotechnol* 2017; 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. 1<sup>th</sup> ed. Allured Publication. 2004; P.1-804.
7. Samarghandian S, Shabestari MM. DNA fragmentation and apoptosis induced by safranin 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

تانها، گلیکوزیدها، ترپنوئیدها و استروئیدها است؛ همچنین با روش GC-MS، ۳۸ ترکیب شیمیایی در عصاره متانولی شناسایی شدند که فراوان ترین آنها اسیدهای چرب بودند. ۸ عنصر معدنی در میوه خرنوب شناسایی شدند که مس و روی عناصر غالب بودند. آنالیز روغن میوه خرنوب وجود ۸ اسید چرب مهم را نشان داد؛ همچنین بررسی های این پژوهش نشان داد خاصیت آنتی اکسیدانی این میوه بالا است. با توجه به این نتایج به نظر می رسد نقش میوه خرنوب در درمان ناباروری می تواند به علت وجود ترکیبات آنتی اکسیدانی فراوان و نقش آنها در کاهش استرس اکسیداتیو در اسپرم ها و همچنین وجود

the coasts of the Bushehr province Iran. *Iran South Med J* 2015; 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 Sci* 2016; 17: 1875. doi. 10.3390/ijms17111875
12. Roseiro LB, Duarte LC, Oliveira DL, Roque R. Supercritical, ultrasound and conventional extracts from carob *Ceratonía siliqua* L. biomass effect on the phenolic profile and antiproliferative activity. *Ind Crops Prod* 2013; 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 *Ceratonía siliqua* L. pods during ripening stages. *Int Food Res J* 2017; 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 *Ceratonía 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 Trop* 2011; 14: 331- 5.
19. Guzikowski W, Szykowska MI, Motakpochrzest 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 Horticul* 2011; 130:181-4.
21. Omid Beigi R. Production and processing of medicinal plants. 3<sup>th</sup> 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. *SJKUMS* 2018; 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 Prod* 2013; 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 Longev* 2012; 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 Androl* 2005; 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<sup>1</sup>, Mokhtari B<sup>1</sup>, Kolahi M<sup>2\*</sup>, Pourreza N<sup>1</sup>

(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<sub>50</sub> 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