Detection of active compounds in the crude aqueous extract of *Annona muricata* plant peels and used as an anti-oxidant

M.S. Jabir
Applied Sciences Dept. University of Technology, Baghdad.
Y.M. Saleh
Applied Sciences Dept. University of Technology, Baghdad.
N.Y. Yaseen
Iraqi Center for Search Cancer, University of Al-Mustansiriya, Baghdad.

Received on 31/8/2016 & Accepted on 29/12/2016

Abstract
This study was amid to detect the active compounds in the aqueous extract of the plant Annona muricata peel by chemical reagents and solutions. The results related that the aqueous extract of A. muricata containing alkaloids, phenols, Flavanoids, terpenes, steroids, Saponins, glycosides. Thus, it could be concluded that A. muricata should be considered as a promising medicinal plant, because of its contents of active compounds, which are known by their medicinal properties, especially the antioxidant property. A. muricata as antioxidant agents has been studies in different concentration (0.0, 10, 50, 100, 200, and 300) µg/ml. Our result showed that ability of A. muricata extract to block H_2O_2 in destroys of DNA molecule.

الكشف عن المركبات الفعالة في المستخلص المائي لقشور نبات القشطة (*Annona muricata*) واستخدامها كمضاد للأكسدة (anti-oxidan)

الخلاصة
أجريت هذه الدراسة لغرض الكشف عن المركبات الفعالة في المستخلص المائي لقشور نبات القشطة *Annona muricata* باستخدام الكواشف والمحاليل الكيميائية. واظهرت النتائج احتواء المستخلص المائي لقشور نبات القشطة على مركبات القلويدات، الفينولات، الفلافونات، التربينات، الستيرويدات، الصابونيات، الراتنجات، السكريات والكمارينات. اذ ان المركبات الفعالة تعد من المركبات المعروفة بخواصها الطبية وبالذات الخاصية المضادة للأكسدة. حيث تم دراسة تأثير المستخلص النباتي كعامل مضاد للأكسدة وبتراكيز مختلفة (0.0, 10, 50, 100, 200, 300) مايكروغرام/مل. حيث اظهرت النتائج امتلاك المستخلص النباتي لنبات القشطة خاصية مضادة للأكسدة وذلك بإيقاف عمل H_2O_2 الذي يؤدي الى تحطم جزيئة DNA.
الكلمات المفتاحية: المركبات الفعالة، المستخلص المائي, نبات القشطة

1.المقدمة

المركبات الفعالة هي مركبات عضوية Organic compounds تعزل من المصادر الطبيعية، وتنتج عن طريق المسارات الايضية Metabolic pathway الأولية والثانوية[1]. توجد في نواتج كل من الحيوانات والنباتات بالإضافة الى أمكانية تصنيعها، ومن الامثلة عليها الفينولات المتعددة Polyphenols (من الفواكه والخضروات)، الدهنيات النباتية Phytosterols (من الزيوت)، الاحماض الدهنية Fatty acids (من الحليب والاسماك)، اضافة الى الفلافونات Flavonoids, السكريات المتعددة Polysaccharides والعديد من المركبات الاخرى [2]. ان المركبات الفعالة Active compounds قي النباتات تستخدم اما مباشرةً كأدوية او علاجات (مستخلصات عالية النقاوة)، او كمادة بادئة لتركيب ادوية اخرى او كقالب (نموذج) لتصنيع ادوية جديدة، او كأداة بحثية لتجارب وفحوصات تطوير الادوية[3]. ان النواتج الايضية الثانوية للنباتات تقوم بتفاعلاتها وتأثيراتها من خلال مشابهتها للمركبات الايضية الموجودة داخل الجسم كالمركبات الكلابية Chelating agents, الهرمونات Hormones, الجزيئات الناقلة للإشارة Signal transporter molecules والنواقل العصبية Neurotransmitters, وبذلك فهي تمتلك تأثيرات طبية على جسم الانسان نتيجة استهدافها لنفس الموقع في الجسم [4]. ومن النباتات المعروفة بامتلاكها خواصاً طبية واستخداماً واسعاً نبات القشطة*Annona muricata* هي شجيرات تستوطن المناطق الاستوائية [5]. واظهرت الدراسات امتلاكها خواصاً طبية عديدة كالخاصية AntiHyperglycemic Activity [6]. المضادات البكتريا Antibacterial [7], المضادات للفايروسات Antiviral [8], المضادة للسرطانAnticancer [9]. ونظراً الى ماتقدم فقد اختير نبات القشطة *Annona muricata لهذه الدراسة*.

https://doi.org/10.30684/etj.35.1C.12
2412-0758/University of Technology-Iraq, Baghdad, Iraq

This is an open access article under the CC BY 4.0 license http://creativecommons.org/licenses/by/4.

2.المواد وطرائق العمل

جمع وتجفيف المادة النباتية

لقد تم الحصول على القشور النباتية Plant peels لنبات القشطة *Annona muricata* من بغداد، في شهر ايلول من العام 2015م, وجففت في الظل ضمن محيط ذو تهوية جيدة وبدرجة حرارة جو الغرفة, ثم طحنت بواسطة المطحنة الكهربائية ليتم الحصول على المسحوق النباتي المستخدم لغرض الاستخلاص.

تحضير المستخلص المائي لقشور نبات القشطة*Annona muricata*

تم وزن 100 غم من مسحوق قشور نبات القشطة *Annona muricata* واضيف اليه 300 مل من الماء المقطر في دورق حجمي، ووضع الدورق الحجمي في جهاز الهزاز مدة 6 ساعات، وبعدها تم ترشيح المستخلص باستعمال ورق الترشيح نوع واتمان رقم1(Whitman No.1), ثم وضع الراشح في اطباق بتري جافة ونظيفة وموزونة ووضعت الاطباق في الحاضنة برجة حرارة 40م^0 ومدة ثلاثة ايام وذلك للحصول على المستخلص الجاف الذي اعتمد لاحقاً لتحضير التركيز المستعمل في الدراسة [10].

الكشوفات الكيميائية للمركبات الفعالة في المستخلص المائي لقشور نبات القشطة*Annona muricata*

طرق الكشف عن المركبات الفعالة في المستخلص النباتي

طرق الكشف عن القلويدات

تم الكشف عن القلويدات بأستخدام كاشف ماير وذلك بمزج 1 مل من الكاشف مع 5 مل من المستخلص المائي , اذ ان ظهور الراسب الابيض يدل على ايجابية الفحص [11]. بينما تم الكشف عنها بأستخدام كاشف دراجندروف بمزج 2 مل من المستخلص المائي لقشور نبات القشطة مع 3 مل من الكاشف، وان ظهور الراسب البرتقالي يدل على ايجابية الفحص [12].

طريقة الكشف عن الفينولات

تم اخذ 3 مل من المستخلص المائي لقشور نبات القشطة واضافته الى 2 مل من محلول كلوريد الحديديك 1% وعند ظهور لون اصفر مزرق يدل على وجود الفينولات[12].

طريقة الكشف عن الفلافونيدات

وتم بأضافة 10 مليليتر من الكحول الاثيلي بتركيز 50% الى 10 مليليتر من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم بتركيز 50% . تم اضافه كمية متساوية من المستخلص النباتي لقشور نبات القشطة مع الحلول السابق، ظهور راسب اصفر دليل على اجابية الفحص[13].

طريقة الكشف عن التربينات والستروديدات

تم الكشف بأذابه 1 مل من المستخلص النباتي لقشور نبات القشطة مع 2 مل من الكلوروفورم، وتمت اضافة قطرة من حامض الخليك الثلجي وقطرة من حامض الكبريتيك المركز، وان تكون اللون البني الفاتح يكون دلالة على ايجابية الفحص للتربين, بينما يدل ظهور حلقة باللون الازرق الداكن في المنتصف بعد ترك المزيج لمدة يوم كامل على ايجابية الفحص للستروييد [14].

طرق الكشف عن الصابونيات

تم بوضع 1 غم من المستخلص المائي لقشور نبات القشطة في انبوبة اختبار، واضافة 10 مل من الماء المقطر اليه، وتم رج المزيج وبشدة، اذ يدل ظهور رغوة كثيفة وبقائها لمدة على ايجابية الفحص [15]. وكذلك تم الاستدلال على وجود الصابونيات بإضافة (3-1) مل من محلول كلوريد الزئبقيك الى 5 مل من المستخلص النباتي، او الى 1 غم منه، ويدل ظهور الراسب الابيض على ايجابية الفحص [16].

طرق الكشف عن الراتنجات

تم بوضع 10 غم من المستخلص المائي للنبات مع 50 مل من الكحول الاثيلي 95%, ومن ثم ترك المزيج لمدة 2 دقيقة في حمام مائي مغلي, وبعدها رشح المحلول واضيف 100 مل من الماء المحمض بحامض الهيدروكلوريك 4%, وان ظهور عكورة واضحة في المحلول تعد دليلاً على ايجابية الفحص [18,17].

طريقة الكشف عن السكريات

تم الكشف بأخذ 1 مل من المستخلص المائي، واضيف اليه قطرات من حامض الهيدروكلوريك HCl, وتم الغلي لمدة 2 دقيقة في حمام مائي, وبعدها تم وضع 2 مل من كاشف بندكت في انبوبة اختبار واضيف اليه المستخلص, ووضعت الانبوبة في حمام مائي مغلي لمدة 5 دقائق, ثم بردت. ويدل تكون الراسب الاحمر على ايجابية الفحص [19].

فعالية المستخلصات النباتية على جزيئة ال DNA خارج الجسم الحي

طريقة تحضير محلول الدنا القياسي Standard DNA Solution

اذيب نموذج ال DNA في محلول متكون من (0.0015) مولار كلوريد الصوديوم و (0.00015) مولار سترات الصوديوم الثلاثية ليصبح التركيز النهائي للدنا (5) مكغم/مل بأس هيدروجيني pH=7 [20].

طريقة العمل

تم معاملة محلول الDNA الحضر في اعلاه والذي يمتلك نسبة امتصاصية 260A/280A تعادل (1.87) بتراكيز مختلفة من المستخلص النباتي المائي (300,200,100,50,10,0) مايكروغرام/مل وذلك بمزج حجم واحد من المستخلص (1) مل مع

حجم مماثل من المحلول القياسي، حضن المزيج بحرارة (37)م^0 لمدة (10) دقائق, بعدها تمت متابعة المستخلص على جزيئة ال DNA من خلال قياس الامتصاصية على طول موجي (260) نانومتر. كما يمكن حساب معامل التجزء (QB) لازواج القواعد النيتروجينية بأستخدام المعادلة الاتية [20].

QB=X (Con) – X min / X max – X min

QB: معامل التجزء, X (con): تركيز DNA, Xmin: اقل قراءة, Xmax: اعلى قراءة

النتائج والمناقشة

يبين الجدول (1) اهم نتائج الكشف الكيميائي عن المركبات الفعالة في المستخلص المائي لقشور نبات القشطة *Annona muricata*, واظهرت النتائج احتوائه على مركبات القلويدات, الفينولات, الفلافونات, التربينات, الستروديدات, الصابونيات, الراتنجات والسكريات، وهذا يتفق مع نتيجة [21] الذي اشار الى احتواء النبات على المركبات Corilagin, Ellagic acid و Gallic acid الفينولية ومركبات Glucosides السكرية ومركبات Diterpene esters. وكذلك اشار [22] الى احتواء النبات على مركبات Catechin, Chorogenic acid وP-coumaric acid الفينولية، ومركبات Myricetin وQuercetin الفلافوندية.

الجدول 1: اهم المركبات الفعالة في المستخلص المائي لقشور نبات القشطة *Annona muricata*

ت	المركب	دليل الكشف	النتيجة
1	القلويدات	راسب ابيض	+
		راسب برتقالي او بني	+
2	الفينولات	لون اخضر مزرق	+
3	الفلافونيدات	راسب اصفر	+
4	التربينات	لون بني فاتح	+
	الستروديدات	لونه ازرق داكن بعد 12 ساعة	+
5	الصابونيات	راسب ابيض	+
6	الراتنجات	العكورة	+
7	الكلايكوسيدات	راسب احمر	+

كما اشار [23] الى احتواء النبات على المركبات التربينية, وكذلك[24] الذي اشار الى احتواء النبات على المركبات Terpenic alcohol,Isoeuphorol , Tiucallol التي جميعها من التربينات الثلاثية ومركب Taraxasterol الدهني. وكذلك تتفق النتائج مع [25] اذ اشار الى احتواء النبات على المركبات الراتنجية.

جدول 2: يبين فعالية المستخلص النباتي على جزيئة الDNA خارج الجسم الحي

نوع المستخلص	التركيز (µg/ml)	DNA	M(1×10^{-5}) +DNAH_2O_2	M(1×10^{-5}) +DNA مستخلص +H_2O_2
	0.0	0.2006	0.275	0.275
	10			0.253
Annona marinate	50			0.244
	100			0.235
	200			0.233
	300			0.234

الاستنتاج

يتبين مما تقدم اهمية اعتبار نبات القشطة*Annona muricata* من النباتات الواعدة لامتلاكه العديد من المركبات الفعالة المهمة المعروفة بفعلها القوي ضد الاكسدة [19].

المصادر

[1].Hason, J. (2003). Natural products: the secondary metabolites. Royal Society of Chemistry, UK, pp. 1-33.

[2].Srivastava, R. and Kulshreshtha, D. (1989). Bioactive polysaccharides from plants. Photochemistry. 28(11): 2877-2883.

[3].Fransworth, N. and Soejarto, D. (1985). Potential consequences of plant extinction in the united state on the current and future availability of prescription drugs. Economic botany 39:231-240.

[4].Principle, P. (1989). The economic signification of plants and their constituents as drugs. In: Economic and medicinal plant research, vol, 3. (Eds) Wagnor, H.,; Hikino, H. and Farnsworth, N. London: Academic press, pp. 1-17.
[5].Germplasm Resources Information Network (GRIN) (1997-07-11). "Taxon: *Annona muricata* L.". Taxonomy for Plants. USDA, ARS, National Genetic Resources Program, National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. Retrieved 2008-04-18.
[6].Lirio, L. and Hermano, M. (1998). Antibacterial activity of medicinal plants from the Philippines. Pharmaceutical Biology. 36: 357-359.
[7].Schumacker PT: Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword. Cancer Cell 2006, 10(3):175–176.
[8].Moghadamtousi SZ, Goh BH, Chan CK, Shabab T, Kadir HA: Biological activities and phytochemicals of swietenia macrophylla king. Molecules 2013, 18(9):10465–10483.
[9].Simon H-U, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F: Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. Apoptosis 2000, 5(5):415–418.
[10].Wang, X.; Liu, L.; Zhul, R.; Kang, T.; Tong, L.; Xie, H. and Wang, H. (2011). Cytotoxic activities of some selected medicinal plants of genus *Annona muricata*. Journal of medicinal plants research Vol. 5(31), pp. 6766-6769.
[11].Sousek J.; Guedon, D.; Adam, T.; Bochorakova, H.; Taborska, E.; Valk a. and Simanek, V, (1999). Alkaloid and organic acid content of eight FUMARIA species. Phytochemical Analysis. 10:6-11.
[12].Atlas, R.; Park, L. and Brown, A. (1995). Laboratory manual of experimental microbiology. 1st ed. Mosby, Inc. missonari.
[13].Jaffer, H.; Mohmod, M.; Jawad, A.; Naj, A. and Alnaib, A. (1983). Phytpchemical and biological screen of some Iraqi Plant, FitoterapiaLixzaq.
[14]. Al-Maisry, M. (1999). Effect of oil and alcoholic extract of Azdriachtaindica on some pathogenic fungi of plant, M.SC. Thesis. Sciencecollege, Al-Mustansria University.
[15] Harborn, V. (1973). Phrborn chemical methods. A guide to modern technique of plant analysis London.
[16]. الشامي, سامي اغا (1982). دراسة بعض الصفات الدوائية والسمية لازهار القيصوم. رسالة ماجستير, كلية الطب البيطري, جامعة بغداد.
[17].Harborn, J. (1984). Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis 2nd ed. Chapman and Hall, New Yourk.
[18]الشيخلي, ريام جميل (2016). الكشف عن المركبات الفعالة في المستخلص الميثانولي الخام لسيقان نبات الصبار Euphorbiatirucalli. اطروحة ماجستير, كلية العلوم, جامعة تكنولوجية.
[19].Evans, W. (1999). Trease and Evan, spharmacognosy. Ed. W. B.Saunders Company Ltd.u.k.
[20].Konsata, A. Sideris, P. and Sakelliou, S. "Dielectric and UV spectrophtometric study of physiocochemical effect of ionizing radiation on mammalian macro molecular DNA" Transaction Dielectrics and Electrical Insulation, 8: (3)549-555, 2001.
[21]. Fauconneau, B.; Waaffo-Tequo,; Hugnet, F.; Barries, I.; Decandit, A. and Merillon, J. (1997). Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compound from vitas vinfera cell culture using in vitro tests. Life Sciences; 16:2103-2110.
[22]. Jahan, N.; Rahman, K.; Ali, S. and Asi, M. (2013). Phenolic acid and flavonol content of gemmo-modified and native extracts of some indigenous medicinal plants. Pakastan journal of Botany. 45(5): 1515-1519.
[23]. Annona muricata (Annonaceae): A Review of Its Traditional Uses, Isolated Acetogenins and Biological Activities. International Journal of Molecular Sciences 2015, 16, 15625-15658; doi:10.3390/ijms160715625
[24]. *Annona muricata* leaves induce G_1 cell cycle arrest and apoptosis through mitochondria-mediated pathway in human HCT-116 and HT-29 colon cancer cells Journal of Ethnopharmacology Volume 156, 28 October 2014, Pages 277–289.
[25]. Moghadamtousi, S.Z.; Goh, B.H.; Chan, C.K.; Shabab, T.; Kadir, H.A. Biological activities and phytochemicals of Swietenia macrophylla king. Molecules 2013, 18, 10465–10483.