

أمثلة ظروف استخلاص المركبات الفينولية من أوراق التوت الشامي (*Morus nigra*) ونشاطها المضاد للأكسدة

تهاني العايدي⁽¹⁾* و ميثم جليس⁽¹⁾

(1). قسم تكنولوجيا الأغذية، الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، دمشق، سورية.
(* للمراسلة: د. تهاني العايدي، البريد الإلكتروني: tahane.alidee@yahoo.com).

تاريخ القبول: 2024/09/24

تاريخ الاستلام: 2024/01/14

الملخص:

هدف العمل إلى تحديد الظروف المثلى لاستخلاص المركبات الفينولية والنشاط المضاد للأكسدة من أوراق التوت الشامي (*Morus nigra*) المزروعة في سورية باستعمال التصميم الإحصائي (RSM) Response Surface Methodology وبرنامج الـ Minitab 17 لاستعمالها في الصناعات الغذائية والدوائية لاحقاً. جُمعت أوراق التوت الشامي من منطقة خان أرنية - القنيطرة - سورية خلال عام 2022 وجُففت في الظل وحفظت لحين الاستعمال. استخلصت الفينولات من الأوراق باستعمال الماء وسطاً للاستخلاص والذي أضيف إلى مطحون الأوراق بثلاث نسب (1:20 و 1:25 و 1:30 حجم/وزن) وتم الاستخلاص في حمام مائي على ثلاث درجات حرارة (30 و 40 و 50 م°) ولمدة 15 و 30 و 45 دقيقة وشمل التصميم المتبع في العمل 30 معاملة. قُدرت الفينولات في المستخلصات المائية الناتجة بطريقة Folin-Ciocalteu اللونية بينما قُدر النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات الناتجة من خلال القدرة على تثبيط جذر الـ DPPH. تراوح تركيز الفينولات المستخلصة بين 11.47 و 431.97 مغ مكافئ حمض الغاليك /100 غ أوراق مجففة، بينما تراوح النشاط المضاد للأكسدة بين 31.98 و 79.78%. أظهرت نتائج التحليل الإحصائي بأنه كان لزمان الاستخلاص ونسبة إضافة الماء ومربع درجة الحرارة تأثيراً معنوياً في تركيز الفينولات المستخلصة، بينما كان لدرجة حرارة الاستخلاص فقط تأثيراً في النشاط المضاد للأكسدة ($p < 0.05$). بينت نتائج الأمثلة بأنه يمكن الحصول على أعلى تركيز من الفينولات (420.91 مغ مكافئ حمض الغاليك/100 غ أوراق) وبأعلى نشاط مضاد للأكسدة (71.56%) باستعمال الماء وسطاً للاستخلاص وإضافته إلى مطحون الأوراق بنسبة 1:30 (حجم/وزن) و التحضين في حمام مائي على درجة حرارة 50 م لمدة 45 دقيقة.

الكلمات المفتاحية: التوت الشامي، *Morus nigra*، سورية، الفينولات، DPPH، RSM.

المقدمة:

حظيت مضادات الأكسدة الطبيعية باهتمام كبير من قبل الباحثين في مجال الغذاء والتغذية حالياً نظراً لفوائدها الصحية والغذائية العديدة وكبديل عن مضادات الأكسدة الصناعية ذات التأثيرات الضارة في الجسم، وتم السعي للحصول على هذه المركبات من مصادر طبيعية رخيصة كأوراق أشجار التوت.

ينتمي التوت الشامي (*Morus nigra*) للعائلة التوتية *Moraceae* وهو نبات سريع النمو موطنه الأصلي غرب آسيا ويعتبر شائع الانتشار في بلاد الشام وهو من الأشجار الاقتصادية في سورية (Erarslan et al., 2021). تستهلك ثماره السوداء بشكل طازج وتستخدم في صناعة الشراب والمربيات. فوائد شجرة التوت لا تقتصر على ثمارها فحسب، بل تشمل الأوراق أيضاً.

أوراق التوت من المخلفات الثانوية لشجرة التوت التي تستعمل في تغذية دودة القز والحيوانات الثديية بشكل رئيسي (Vijayan, 2010). تعد أوراق التوت من المغذيات المصروح باستعمالها كمصدر جيد للكربوهيدرات والبروتين والعناصر الغذائية حيث تستهلك في العديد من الدول الآسيوية كشاي وكعصير وتدخل في صناعة المتلجات اللبنية في كوريا، كما تعد مكون رئيسي في العديد من الوجبات التقليدية في الهند (Katsube et al., 2009). تعد أوراق التوت مصدراً جيداً للبروتين مقارنةً بباقي الخضروات الورقية (Gupta et al., 2005). أوضح Yu وزملاؤه (2018) بأنه يمكن استعمال أوراق التوت في تدعيم الأغذية نظراً لاحتوائه على نسبة جيدة من البروتين كما يتميز البروتين بنوعية عالية. تستهلك أوراق التوت في اليابان كمكمل غذائي مضاد للاكتئاب ومانع لارتفاع سكر الدم (Singh et al., 2013). أشار Wang زملاؤه (2021a) إلى غنى أوراق التوت بالكالسيوم والحديد والبروتين والبيتاكاروتين وفيتامين D و B1. استخدمت أوراق التوت في الطب الصيني القديم لعلاج العديد من الأمراض وهذا عائد إلى غناها بالفينولات (Wang et al., 2021b). تحتوي أوراق التوت على تراكيز جيدة من الفينولات ومضادات الأكسدة القوية وهي قابلة للاستعمال في مجال الصناعات الغذائية والصيدلانية (Chen et al., 2022). أكد Kobus-Cisowska وزملاؤه (2019) على غنى أوراق التوت بالكيرسيتين وإيزوكيرسيتين و Astragalين و Myricetin. كما أشار Ann وزملاؤه (2015) إلى غنى مستخلصات أوراق التوت بـ hydroxyflavin وحمض الكافنيك والتي تمتلك تأثيرات صحية إيجابية للإنسان. درست Alidee وزملاؤها (2023) تركيز الفينولات لأوراق عدة أنواع من أشجار التوت المزروعة في سورية (الأبيض، الشامي، الأحمر البلدي، المصري) ونشاطها المضاد للأكسدة وأشاروا إلى غنى أوراق التوت الشامي بالمركبات الفينولية وامتلاكها لنشاط عالٍ مضاد للأكسدة. تستخلص المركبات الفينولية باستعمال مذيبات قطبية كالميتانول والإيتانول والماء. مازال الماء المذيب المفضل لاستخلاص الفينولات وهذا عائد إلى كونه آمناً واقتصادياً وصديقاً للبيئة وقابلاً للتطبيق في مجال التصنيع الغذائي والدوائي. استخدم الماء وبنجاح في استخلاص مجموعة واسعة من المركبات الفينولية ذات الخصائص المضادة للأكسدة من مجموعة متنوعة من المصادر النباتية (Busnena et al., 2013).

تعد عملية الاستخلاص والحصول على المستخلصات الفعالة الخطوة الأولى في بداية دراسة أي نبات طبي لاجراء عملية العزل والتقية لهذه المركبات فيما بعد (Mandal et al., 2007). تؤثر ظروف الاستخلاص كدرجة الحرارة والزمن ونسبة إضافة المذيب وسرعة التحريك في النسبة المئوية للمردودية وتركيز ونوع المركبات الفينولية المستخلصة، لذلك تسعى العديد من الأبحاث إلى أمثلة ظروف استخلاص المركبات الفينولية للحصول عليها بأعلى تركيز وبأعلى نشاط مضاد للأكسدة (Polumackanycz et al., 2016; Sánchez-Salcedo et al., 2012).

يعد التصميم الإحصائي Response Surface Methodology أحد التصاميم التجريبية الأكثر استعمالاً حديثاً ويستعمل لتحديد الظروف المثلى وتقييم تأثير العوامل المدروسة منفردةً وتفاعلاتها في واحد أو أكثر من متغيرات الاستجابة (Aydar, 2018). نظراً للفوائد الصحية والغذائية لأوراق التوت وغنى أوراقه بمضادات الأكسدة وسعي الباحثين لايجاد بدائل طبيعية لمضادات الأكسدة والحصول عليها بأعلى تركيز بالإضافة لعدم وجود دراسة محلية سابقة عن تأثير ظروف الاستخلاص في محتوى أوراق التوت الشامي من الفينولات ونشاطها المضاد للأكسدة لذلك فقد هدف البحث إلى:

دراسة التركيب الكيميائي لأوراق التوت الشامي (*Morus nigra*) المزروع في سورية وتحديد الظروف المثلى لاستخلاص أعلى تركيز من المركبات الفينولية وبأعلى نشاط مضاد للأكسدة باستعمال الماء وسطاً للاستخلاص.

المواد و طرائق العمل:

المواد الكيميائية:

كاشف فولن، كربونات الصوديوم، جذر الـ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) وكانت جميع المواد الكيميائية المستعملة في العمل من شركة Sigma، ألمانيا.

المادة النباتية:

جُمعت أوراق التوت الشامي (*Morus nigra*) من منطقة خان أرنبه، القنيطرة خلال شهر آب من عام 2022.

طرائق العمل:

تحضير أوراق التوت:

نُقلت أوراق التوت إلى المخبر وأزيلت أعناقها ونُظفت من الغبار والأتربة بالغسيل بالماء عدة مرات ثم جففت في مكان ظليل ومُهوى على درجة حرارة الغرفة حتى ثبات الوزن، وتم الاحتفاظ بالأوراق المجففة في أكياس محكمة الإغلاق لحين الإستعمال.

دُرِس التركيب الكيميائي للأوراق من رطوبة ورماد ودهن وبروتين وفقاً لطرائق AOAC (2012) كما قُدر محتواها من السكريات باتباع طريقة فينول حمض الكبريت وفقاً لطريقة Xiao وزملاؤه (2020).

استخلاص المركبات الفينولية:

طُحنت أوراق التوت المجففة باستعمال مطحنة مخبرية (HC-500Y) ومرر المطحون عبر منخل قطر فتحاته (0.45mm)، ثم استُخلصت المركبات الفينولية من الأوراق باستعمال الماء المقطر وسطاً للاستخلاص حيث أضيف الماء إلى مطحون الأوراق بثلاث نسب مختلفة (1:20، 1:25، 1:30) وضع المزيج في حمام مائي على ثلاث درجات حرارة مختلفة (30 و40 و50 م°) ولمدة 15 و30 و45 دقيقة. برد المزيج وأجري ترشيح باستعمال مضخة ترشيح وتم الاحتفاظ بالراشح في أنابيب محكمة الإغلاق على حرارة 18-م° لحين الاستعمال.

تقدير الفينولات:

قُدرت الفينولات في المستخلصات المائية الناتجة وفقاً لطريقة Kostić وزملاؤه (2019) مع اجراء بعض التعديلات. أخذ 1 مل من المستخلص وأضيف إليه 0.5 مل كاشف فولن و2 مل كربونات الصوديوم (20%) و بعد التحضين لمدة 10 دقائق على درجة حرارة الغرفة رُشح المزيج وأخذت الإمتصاصية عند طول موجة 765 نانومتر باستعمال جهاز المطياف الضوئي (PG Instruments T80+ UV/VIS Spectrophotometer، بريطانيا). حُضر منحني قياسي من حمض الغاليك بتركيز تراوح من 25 إلى 75 مغ/ليتر وعُبر عن النتيجة كمغ مكافئ حمض الغاليك/ 100 غ أوراق مجففة.

تقدير النشاط المضاد للأكسدة:

قُدر النشاط المضاد للأكسدة وفقاً لطريقة Colak وزملاؤه (2009) مع اجراء بعض التعديلات. أخذ 100 ميكروليتر من المستخلصات وأضيف إليها 2.5 مل من محلول الميثانولي للـ DPPH والمحضر بتركيز 0.2 مغ/ 100 مل. وبعد 30 دقيقة من التحضين في الظلام قيست الامتصاصية عند طول موجة 517 نانومتر وحسبت النسبة المئوية للتثبيط من القانون التالي:

$$\text{النسبة المئوية للتثبيط (\%)} = \frac{\text{قراءة الشاهد} - \text{قراءة العينة}}{\text{قراءة الشاهد}} \times 100$$

تصميم التجربة والتحليل الإحصائي:

نفذت تجارب دراسة التركيب الكيميائي بمعدل ثلاثة مكررات وحسبت المتوسطات والانحراف المعياري. حُددت الظروف المثلى (نسبة إضافة الماء ودرجة الحرارة وزمن الاستخلاص) لاستخلاص أعلى تركيز من الفينولات وبأعلى نشاط مضاد للأكسدة من أوراق التوت الشامسي باستعمال البرنامج الإحصائي Minitab 17 والتصميم الإحصائي RSM (Response Surface Methodology) حيث دُرِس كل عامل بثلاثة مستويات (الجدول 1) وشمل التصميم على 30 معاملة (الجدول 3).

الجدول (1): مستويات العوامل المدروسة في الدراسة

العامل	مستوى العوامل المدروسة		
	+1	0	-1
حجم الماء المضاف لمطحون الأوراق (مل)	30	25	20
درجة الحرارة (°م)	50	40	30
زمن الإستخلاص (دقيقة)	45	30	15

دُرِس تأثير كل عامل على حدة، ومربع العوامل، والتفاعل بينها في تركيز الفينولات والنسبة المئوية للنشاط المضاد للأكسدة وعُبر عن العلاقة التي تربط بين تركيز الفينولات والعوامل المدروسة وبين النشاط المضاد للأكسدة والعوامل المدروسة بمعادلة من الدرجة الثانية كما يلي:

$$Y=a+bX_1+cX_2+dX_3+ eX_1^2+ fX_2^2+ gX_3^2+hX_1* X_2+ iX_1* X_3+ jX_2* X_3+ kX_1* X_2* X_3$$

حيث:

Y : المعامل المدروس Response (الفينولات أو النشاط المضاد للأكسدة)

a: المعامل الثابت constant

b,c,d: المعاملات الخطية Linear coefficient

e,f,g: المعاملات المنحنية square coefficient

h,i,j,k: المعامل المتداخل interaction coefficient

X₁: نسبة إضافة الماء.

X₂: درجة الحرارة.

X₃: زمن الاستخلاص

النتائج والمناقشة:

يبين الجدول (2) التركيب الكيميائي الأولي لأوراق التوت الشامسي المدروسة حيث أظهرت النتائج بأن النسبة المئوية للبرطوبة في الأوراق الطازجة كانت 65.61%، كما كانت النسبة المئوية للرماد في الأوراق المجففة 14.69%. تميزت أوراق التوت المجففة والمدروسة بمحتوى مرتفع من البروتين (20.58%)، توافقت نتائجنا مع نتائج Sun وزملاؤه (2015) الذين وجدوا بأن تركيز البروتين في أوراق التوت يتراوح بين 17 و 25%، كما تقاربت نتائجنا مع نتائج Simbaya وزملاؤه (2020) الذين وجدوا بأن محتوى أوراق التوت من البروتين كان 24.05%. بلغت النسبة المئوية للدهن في الأوراق 9.43% تعد أوراق التوت مصدراً للأحماض الدهنية الهامة للصحة مثل α-linolenic acid و linoleic acid و palmitic acid (Wulandari et al., 2019). اختلفت نتائجنا مع نتائج Al-Kirshi وزملاؤه (2013) الذين وجدوا بأن الرمد والدهن في أوراق التوت الأبيض كانت 11.81% و 5.57% على التوالي. الاختلاف في النتائج قد يكون عائداً إلى الاختلاف في النوع المدروس والظروف البيئية المحيطة بالنبات.

الجدول (2): التركيب الكيميائي لأوراق التوت الشامي (*Morus nigra*) المدروسة

المؤشر الكيميائي	القيمة*
الرطوبة (% وزن رطب)	65.61±0.42
الرطوبة (% وزن جاف)	2.67±0.04
الرماد (% وزن جاف)	14.69±0.1
البروتين (% وزن جاف)	20.58±0.27
الدهن (% وزن جاف)	9.43±0.01
الكربوهيدرات الذائبة الكلية (% وزن جاف)	1.87±0.28

*متوسط ثلاثة مكررات ± الانحراف المعياري

يوضح الجدول (3) نتائج أمثلة ظروف استخلاص المركبات الفينولية من أوراق التوت الشامي باستعمال الماء وسطاً للاستخلاص وفق التصميم المتبع في العمل، حيث نلاحظ بأن تركيز الفينولات المستخلصة تراوح بين 11.47 و 431.97 مغ مكافئ حمض الغاليك /100غ أوراق مجففة، وتراوح النشاط المضاد للأكسدة بين 31.98 و 79.78%.

الجدول (3): تركيز الفينولات والنشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات المائية لأوراق التوت الشامي وفق التصميم المتبع.

رقم المعاملة	نسبة إضافة الماء (مل)	درجة الحرارة (°م)	الزمن (دقيقة)	تركيز الفينولات (مغ/100غ)	النشاط المضاد للأكسدة (% للتثبيط)
1	30	40	45	294.3	53.68
2	25	40	30	89.04	52.57
3	30	40	15	112.37	59.56
4	25	30	45	299.1	69.12
5	25	40	30	201.86	57.72
6	20	40	45	107.46	43.01
7	25	50	15	143.89	49.26
8	25	40	30	172.12	54.04
9	20	30	30	263.34	38.97
10	20	50	30	86.74	57.35
11	25	30	15	225.25	31.98
12	30	30	30	349.57	53.67
13	25	50	45	213.11	74.26
14	30	50	30	295.58	73.16
15	20	40	15	89.37	79.78
16	25	50	15	195.37	50.38
17	20	50	30	214.83	72.43
18	20	40	45	125.06	51.1
19	30	40	45	289.04	59.93
20	30	30	30	396.84	60.29
21	20	40	15	11.47	58.09
22	20	30	30	286.95	23.16
23	25	50	45	304.67	68.38
24	30	40	15	121.65	49.26
25	25	40	30	117.96	52.94
26	25	40	30	177.39	48.9
27	30	50	30	431.97	62.13
28	25	40	30	122.75	55.51
29	25	30	45	157.97	51.84
30	25	30	15	200.55	51.47

أظهرت نتائج التحليل الإحصائي الموضحة في الجدول (4) بأنه كان لزمان الاستخلاص ونسبة إضافة الماء إلى مطحون الأوراق تأثيراً معنوياً في تركيز الفينولات المستخلصة ($P < 0.05$)، وسُجل زيادة معنوية ايجابية في تركيز الفينولات بزيادة زمن الاستخلاص وزيادة نسبة إضافة الماء كما كان لمربع درجة الحرارة تأثيراً معنوياً أيضاً وهذا يدل على أن العلاقة بين مربع الحرارة وتركيز الفينولات تعطي شكل قطع مكافئ.. توافقت هذه النتيجة مع العديد من الدراسات السابقة التي وجدت بأن لدرجة الحرارة تأثيراً معنوياً في الفينولات المستخلصة (Masjedi et al., 2022; Sai-Ut et al., 2023). يعود التأثير الإيجابي لدرجة الحرارة في تركيز الفينولات المستخلصة إلى مساهمتها في خفض لزوجة المذيب وتقليلها لتوتره السطحي (Algan Cavuldak et al., 2019). كما أن الحرارة العالية تساهم في إضعاف الأنسجة النباتية وبالتالي زيادة نفاذية المذيب إلى داخلها كما تقلل وتضعف الروابط بين الفينولات وعديدات السكر وبالتالي المساهمة إيجاباً في انتقال الفينولات إلى وسط الاستخلاص (Carrera et al., 2012). بلغت قيمة معامل التحديد 80.69% وهذا يدل على أن العوامل المدروسة أثرت بنسبة 80.69% في تركيز الفينولات المستخلصة من أوراق التوت. بناءً على نتائج التحليل الإحصائي يمكن كتابة معادلة الانحدار التي تربط بين تركيز الفينولات المستخلصة والعوامل المدروسة كمايلي:

$$\text{Total phenolic (mg/100g)} = 3248 - 0.93 X_1 - 106.9 X_2 - 90.3 X_3 - 0.1694 X_1 * X_1 + 1.088 X_2 * X_2 + 1.405 X_3 * X_3 + 0.123 X_1 * X_2 + 0.363 X_1 * X_3 + 0.575 X_2 * X_3$$

الجدول(4): تأثير العوامل المدروسة في تركيز الفينولات المستخلصة

العامل	الثابت	SE Coef	T-Value	P-Value
الثابت	146.9	21.7	6.75	0
الزمن (X_1)	43.2	13.13.33	3.24	0.004
درجة الحرارة (X_2)	-18.3	13.3	-13.8	0.184
نسبة الإضافة (X_3)	69.1	19.6	5.19	0
الزمن*الزمن (X_1^2)	-38.1	19.6	-1.95	0.066
درجة الحرارة*درجة الحرارة (X_2^2)	108.8	19.6	5.55	0
نسبة الإضافة* نسبة الإضافة (X_3^2)	35.8	19.6	1.79	0.088
الزمن* (X_1) درجة الحرارة (X_2)	18.4	18.8	0.98	0.340
الزمن* (X_1) نسبة الإضافة (X_3)	27.2	18.8	1.44	0.164
الحرارة* (X_2) نسبة الإضافة (X_3)	28.7	18.8	1.53	0.143

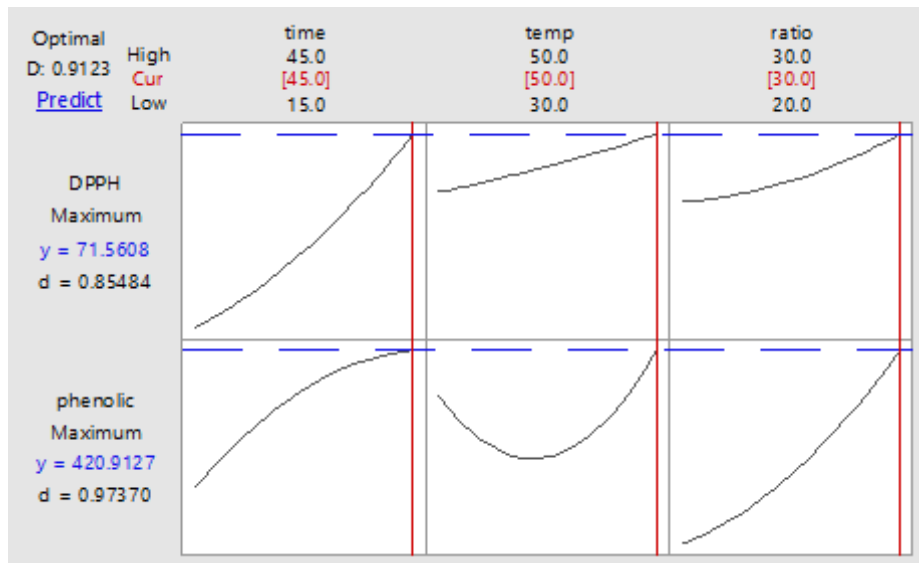
يوضح الجدول 5 التحليل الإحصائي لتأثير العوامل المدروسة في النشاط المضاد للأكسدة، حيث أظهرت النتائج بأنه كان لدرجة الحرارة تأثيراً معنوياً إيجابياً في النشاط المضاد للأكسدة ($P < 0.05$) وهذا يدل على أن العلاقة بين درجة الحرارة والنشاط المضاد للأكسدة علاقة خطية من الدرجة الأولى. وهذا عائد إلى أن رفع درجة الحرارة يساهم في استخلاص العديد من المركبات الفعالة مما ينعكس إيجابياً في زيادة النشاط المضاد للأكسدة (Dorta et al., 2012). توافقت هذه النتائج مع نتائج **Insang وزملاؤه (2022)**. بلغت قيمة معامل التحديد (R^2) 43.67% وهذا يدل على أن العوامل المدروسة أثرت بنسبة 43.67% في النشاط المضاد للأكسدة والباقي عائد إلى عوامل أخرى غير مدروسة كأبعاد مطحون الأوراق ونوعية المركبات المستخلصة وغيرها من العوامل الأخرى. يمكن كتابة معادلة الانحدار التي تربط بين كل من النشاط المضاد للأكسدة والعوامل المدروسة كمايلي:

$$\text{Antioxidant Activity (\%)} = -4 - 2.55 X_1 + 3.32 X_2 + 0.31 X_3 + 0.0086 X_1 * X_1 + 0.0028 X_2 * X_2 + 0.050 X_3 * X_3 + 0.0046 X_1 * X_2 + 0.0809 X_1 * X_3 - 0.1158 X_2 * X_3$$

الجدول(5): تأثير العوامل المدروسة في النشاط المضاد للأكسدة

العامل	الثابت	SE Coef	T-Value	P-Value
الثابت	53.61	4.47	11.99	0
الزمن (X_1)	2.60	2.74	0.95	0.354
درجة الحرارة (X_2)	7.93	2.74	2.90	0.009
نسبة الإضافة (X_3)	2.99	2.74	1.09	0.288
الزمن*الزمن (X_1^2)	1.94	4.03	0.48	0.636
درجة الحرارة*درجة الحرارة (X_2^2)	0.28	4.03	0.07	0.945
نسبة الإضافة* نسبة الإضافة (X_3^2)	1.25	4.03	0.31	0.76
الزمن (X_1) * درجة الحرارة (X_2)	0.69	3.87	0.18	0.861
الزمن (X_1) * نسبة الإضافة (X_3)	6.07	3.87	1.57	0.133
الحرارة (X_2) * نسبة الإضافة (X_3)	-5.79	3.87	-1.50	0.150

أظهرت نتائج الأمثلة والموضحة في الشكل 1 بأن الظروف المثلى لاستخلاص أعلى تركيز من الفينولات (420.91 مغ مكافئ حمض الغاليك/100غ) من أوراق التوت الشامي كانت بإضافة الماء إلى مطحون الأوراق بنسبة 1:30 والتحصين في حمام مائي على درجة حرارة 50 م ولمدة 45 دقيقة. يعد هذا التركيز المستخلص من الفينولات أقل من التركيز الذي توصل إليه **Radojković** وزملاؤه (2012) الذين استخلصوا 52.43 مغ/غ من الفينولات من أوراق التوت الأسود باستعمال الايتانول 75% المضاف بنسبة 1:20 والتحصين على درجة حرارة 65 م. وأقل مما توصل إليه **Insang** وزملاؤه (2022) الذين استخلصوا أعلى تركيز من الفينولات (1505.92 مغ/100غ) من أوراق التوت الأبيض باستعمال الايتانول 60% والتحصين في حمام مائي مزود بالأمواج فوق الصوتية على درجة حرارة 80م لمدة 20 دقيقة. بينما كان التركيز المتحصل عليه أعلى مما توصل إليه **Chen** وزملاؤه (2022) عند استعمال الايتانول والميتانول وسطاً للاستخلاص. الاختلاف بين نتائجنا ونتائج الدراسات السابقة قد يكون عائد إلى الاختلاف في نوع المذيب المستعمل ووجود تقنية مساعدة في الاستخلاص (أمواج فوق الصوتية) والاختلاف في نوع الأوراق المدروسة. كما تقاربت النتائج مع نتائج **Alidee** وزملاؤها (2023) الذين حصلوا على 461.5 مغ/100غ أوراق جافة باستعمال الميتانول (70%) وبالتالي يمكن استعمال الماء كمذيب آمن واقتصادي بديلاً من الميتانول.



الشكل (1): الظروف المثلى لاستخلاص أعلى تركيز من الفينولات وبأعلى النشاط المضاد للأكسدة

من جهةٍ أخرى، بينت نتائج الأمثلة الموضحة في الشكل 1 بأن إضافة الماء إلى مطحون الأوراق بنسبة 1:30 والتحصين على حرارة 50 م° لمدة 45 دقيقة أدى للوصول إلى أعلى نشاط مضاد للأكسدة (71.56%). يعد هذا النشاط أعلى مما توصل إليه **Algan Cavuldak** وزملاؤه (2019) (66.37%) على الرغم من استخلاصهم لتركيز عالي من الفينولات (21.78 مغ/غ) وهذا قد يكون عائد إلى أن النشاط المضاد للأكسدة لا يتوقف على تركيز المركبات الفعالة وإنما على نوعيتها أيضاً. حيث أن لعدد زمر ال-OH وموقعها على الحلقة العطرية للمركبات الفينولية تأثير في النشاط المضاد للأكسدة (Xie and Schaich, 2014).

الاستنتاجات:

- أوراق التوت الشامي (*Morus nigra*) مصدر واعد وجيد للمغذيات وخصوصاً البروتين والمركبات الفعالة حيويًا.
- يمكن استعمال الماء مذيباً آمناً للحصول على تراكيز جيدة من الفينولات وبنشاط مضاد للأكسدة عالٍ من أوراق التوت وذلك بإضافته إلى مطحون الأوراق بنسبة 1:30 والتحصين في حمام مائي على درجة حرارة 50م ولمدة 45 دقيقة.

التوصيات:

- العمل على رفع تركيز الفينولات المستخلصة والنشاط المضاد للأكسدة من أوراق التوت الشامي بدراسة تأثير عوامل استخلاص أخرى كأبعاد مطحون الأوراق وسرعة التحريك.
- أمثلة ظروف استخلاص المركبات الفينولية من أوراق أنواع أخرى من التوت المزروعة في سورية.
- تحضير مستخلص فعال من أوراق التوت الشامي عند الظروف المثلى ودراسة تأثير إضافته في بعض المنتجات الغذائية كمادة حافظة طبيعية.

المراجع:

- Algan Cavuldak, Ö., Vural, N., Akay, M. A., & Anlı, R. E. (2019). Optimization of ultrasound-assisted water extraction conditions for the extraction of phenolic compounds from black mulberry leaves (*Morus nigra* L.). *Journal of food process engineering*, 42(5), e13132.
- Alidee, T., Jales, M., Hjaij, N. D., & Almouna, A. (2023). Estimation of Some Phytochemical Compounds and Antioxidant Properties of Leaves from Different Mulberry Varieties Grown in Syria. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2023.
- Al-Kirshi, R. A., Alimon, A., Zulkifli, I., Atefeh, S., Zahari, M. W., & Ivan, M. (2013). Nutrient digestibility of mulberry leaves (*Morus alba*). *Italian Journal of Animal Science*, 12(2), e36.
- Ann, J. Y., Eo, H., & Lim, Y. (2015). Mulberry leaves (*Morus alba* L.) ameliorate obesity-induced hepatic lipogenesis, fibrosis, and oxidative stress in high-fat diet-fed mice. *Genes & nutrition*, 10, 1-13.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. 2012. Official Method of Analysis of the Association of Official Analytical of Chemist. Arlington: The Association of Official Analytical Chemists.
- Aydar, A. Y. (2018). Utilization of response surface methodology in optimization of extraction of plant materials. *Statistical approaches with emphasis on design of experiments applied to chemical processes*, 157-169.
- Busnena, B. A., Foudah, A. I., Melancon, T., & El Sayed, K. A. (2013). Olive secoiridoids and semisynthetic bioisostere analogues for the control of metastatic breast cancer. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 21(7), 2117-2127.
- Carrera, C., Ruiz-Rodríguez, A., Palma, M., & Barroso, C. G. (2012). Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes. *Analytica chimica acta*, 732, 100-104.

- Colak, A., Faiz, O., & Sesli, E. (2009). Nutritional composition of some wild edible mushrooms. *Turkish Journal of Biochemistry*, 34(1), 25-31.
- Dorta, E., Lobo, M. G., & Gonzalez, M. (2012). Reutilization of mango byproducts: study of the effect of extraction solvent and temperature on their antioxidant properties. *Journal of Food Science*, 77(1), C80-C88.
- Erarslan, Z. B., Karagöz, S., & Kültür, Ş. (2021). Comparative morphological and anatomical studies on *Morus* species (Moraceae) in Turkey. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 18(2), 157.
- Insang, S., Kijpatanasilp, I., Jafari, S., & Assatarakul, K. (2022). Ultrasound-assisted extraction of functional compound from mulberry (*Morus alba* L.) leaf using response surface methodology and effect of microencapsulation by spray drying on quality of optimized extract. *Ultrasonics Sonochemistry*, 82, 105806.
- KostiĆ, E., Arsić, B., MitiĆ, M., DimitrijeviĆ, D., & Marinkovic, E. P. (2019). Optimization of the solid-liquid extraction process of phenolic compounds from the mulberry fruit. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 47(3), 629-633.
- Mandal, V., Mohan, Y., & Hemalatha, S. J. P. R. (2007). Microwave assisted extraction—an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Pharmacognosy reviews*, 1(1), 7-18.
- Masjedi, M., Nateghi, L., Berenji, S., & Eshaghi, M. R. (2022). Optimization of Extraction of Flavonoid, Total Phenolic, Antioxidant, and Antimicrobial Compounds from *Ganoderma Lucidum* by Maceration Method. *Iran. J. Chem. Chem. Eng. Research Article Vol*, 41(9).
- Polumackanycz, M., Wesolowski, M., & Viapiana, A. (2021). *Morus alba* L. and *Morus nigra* L. leaves as a promising food source of phenolic compounds with antioxidant activity. *Plant Foods for Human Nutrition*, 76, 458-465.
- Radojković, M., Zeković, Z., Jokić, S., Vidović, S., Lepojević, Ž., & Milošević, S. (2012). Optimization of solid-liquid extraction of antioxidants from black mulberry leaves by response surface methodology. *Food Technology and Biotechnology*, 50(2), 167-176.
- Sai-Ut, S., Kingwascharapong, P., Mazumder, M. A. R., & Rawdkuen, S. (2023). Optimization of ethanolic extraction of phenolic antioxidants from lychee and longan seeds using response surface methodology. *Foods*, 12(15), 2827.
- Simbaya, J., Chibinga, O., & Salem, A. Z. (2020). Nutritional evaluation of selected fodder trees: Mulberry (*Morus alba* Lam.), Leucaena (*Leucaena leucocephala* Lam de Wit.) and Moringa (*Moringa oleifera* Lam.) as dry season protein supplements for grazing animals. *Agroforestry Systems*, 94, 1189-1197.
- Singh, R., Bagachi, A., Semwal, A., Kaur, S., & Bharadwaj, A. (2013). Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of *Morus alba* Linn.: A review. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(9), 461-469.
- Sun, C.Z., Wu, W.J., Min, T., Liu, Y., Zhu, J.H., Lai, F.R. and Wu, H. (2015). Functional properties of mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.) leaf proteins extracted by different methods. *J. Fd. Sci. Technol.*, 31: 235-241.
- Vijayan, K. (2010). The emerging role of genomic tools in mulberry (*Morus*) genetic improvement. *Tree Genetics & Genomes*, 6(4), 613-625.
- Wang, Z., Tang, C., Dai, F., Xiao, G., & Luo, G. (2021b). HPLC determination of phenolic compounds in different solvent extracts of mulberry leaves and antioxidant capacity of extracts. *International Journal of Food Properties*, 24(1), 544-552.

- Wang, Z., Tang, C., Xiao, G., Dai, F., Lin, S., Li, Z., & Luo, G. (2021a). Comparison of free and bound phenolic compositions and antioxidant activities of leaves from different mulberry varieties. *BMC chemistry*, 15, 1-15.
- Xiao, H., Zhang, Y. Q., Ding, X. W., Huang, X. Z., Li, R., & Shen, Y. H. (2020). Evaluation of bioactive compound contents in 50 varieties of mulberry leaves originating from different regions. *International Food Research Journal*, 27(3), 516-528.
- Xie, J., & Schaich, K. M. (2014). Re-evaluation of the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical (DPPH) assay for antioxidant activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(19), 4251-4260.

Optimization of the Extraction Conditions of Phenolic Compounds from Al-Shami Mulberry Leaves (*Morus nigra*) and their Antioxidant Activity

Tahani Alidee⁽¹⁾ * and Maytham Jales⁽¹⁾

(1). Department of Food Technology-General Commission of Scientific Agricultural Research (GCSAR), Damascus, Syria.

(*Corresponding author: Dr. Tahani Alidee. E-Mail: tahane.alidee@yahoo.com).

Received: 14/01/2024

Accepted: 24/09/2024

Abstract:

This study aimed to optimize the extraction conditions of phenolic compounds and antioxidant activity from Al-Shami mulberry leaves (*Morus nigra*) grown in Syria using Response Surface Methodology (RSM) and the Minitab17 program for use in food and pharmaceutical industries later. The fresh leaves were collected from Khan Arnabah, Al Qunaitra Governorate, Syria, in 2022, shade-dried, and kept in a dry place until they were analyzed. The phenolic compounds were extracted using ultra-pure deionized water (extraction solvent) related to solvent:solid ratio and the mixture was put in a water bath at three temperatures (30, 40, and 50 °C) for 15, 30, and 45 minutes, and the design included 30 experiments. The total phenolic content (TPC) of the extracts was analyzed using the Folin-Ciocalteu colorimetric method, whereas the antioxidant activity was measured using the DPPH method. The TPC ranged from 11.47 to 43.97 mg of gallic acid equivalent per 100 g, and the antioxidant activity ranged from 31.98 to 79.78%. The statistical results showed that the linear effects of temperature, the ratio of water, and the quadratic effect of temperature on TPC were significant. Whereas the linear effect of the temperature on antioxidant activity was significant ($P \leq 0.05$). The optimum results showed that the maximum TPC value (420.91 mg/100 g) with the highest antioxidant activity (71.56%) was observed at an extraction time of 45 min, a temperature of 50 °C, and a solvent-solid ratio of 30:1 by using water as an extraction solvent.

Keywords: Al-Shami mulberry, *Morus nigra*, Syria, phenolic compounds, DPPH, RSM.