

Study of the Antioxidant Activity of Azo Chalcone and Azoflavone Derivatives by DPPH and H₂O₂ Methods

Dr. Sawsan Youseff Saad*
Dr. Aoula Moustapha**
Dr. Farouk Kandil***
Hadi Aqel Khdera****

(Received 5 / 6 / 2023. Accepted 22 / 8 / 2023)

□ ABSTRACT □

Flavonoids have good efficacy as antioxidants due to their ability to scavenge free radicals within cells. The antioxidant activity of azochalcone derivatives (B₁-B₃) and azoflavone derivatives (B₄-B₆) based on chalcone (2*E*)-3-[4-(dimethylamino)phenyl]-1-(2-hydroxyphenyl)prop-2-en-1-one was studied by two methods: : Method of radical inhibition of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]), method of inhibition of hydrogen peroxide (H₂O₂) and comparison with the effectiveness of two compounds ascorbic acid and quercetin as known antioxidants. The flavonoid derivatives (B₁ - B₆) were prepared in the laboratory in our previous study through condensation, cyclization, dialysis and coupling reactions, and the structural structures of the new compounds were determined using spectroscopic methods (¹³C-NMR, ¹H-NMR, FT-IR). The inhibition ability of flavonoids was determined in four different concentrations (250, 500, 750, 1000 ppm) based on the concentrations of the compounds needed to reduce the absorption at 516 nm (DPPH[•]) and 230 nm (H₂O₂). The value of IC₅₀ was estimated based on the curves of change in percentage inhibition percentages in terms of solution concentration. The results showed the effectiveness of compounds (B₁, B₂) as antioxidants.

Keywords: azo chalcone, azoflavone, antioxidants, quercetin, ascorbic acid, DPPH[•], hydrogen peroxide.

Copyright  :Tishreen University journal-Syria, The authors retain the copyright under a CC BY-NC-SA 04

* Associate Professor; Department of Chemistry, Faculty of Sciences, University of Tishreen, Lattakia, Syria. sawsansaad954@gmail.com

**Assistant Professor, Department of Pharmacology and Toxicology, faculty of Pharmacy, Al-Baath University, Homs, Syria.

***Professor, Department of Chemistry, Faculty of Science, Damascus University, Damascus, Syria.

*Postgraduate Student (PhD), Department of Chemistry, Faculty of Science, Tishreen University, Lattakia, Syria. hadiaqelkhdera@gmail.com

دراسة الفعالية المضادة للأكسدة لمشتقات آزو شالكون وآزو فلافون

بطريقتي الـ DPPH[•] و H₂O₂

د. سوسن يوسف سعد*

د. علا مصطفى**

د. فاروق قنديل***

هادي عقل خضيره****

(تاريخ الإيداع 5 / 6 / 2023. قُبِلَ للنشر في 22 / 8 / 2023)

□ ملخص □

تمتلك الفلافونيدات فعالية جيدة كمضادات أكسدة بسبب قدرتها على إزالة الجذور الحرة داخل الخلايا. تمت دراسة الفعالية المضادة للأكسدة لمشتقات آزو شالكون (B₁-B₃) ومشتقات آزو فلافون (B₄-B₆) أساسها المركب الشالكوني (2E)-3-[4-(ثنائي ميثيل أمينو) فينيل]-1-(2-هيدروكسي فينيل) بروب-2-إن-1-ون بطريقتين هما: طريقة تثبيط الجذر 2,2-ثنائي فينيل-1-بيكريل هيدرازيل (DPPH[•])، طريقة تثبيط بيروكسيد الهيدروجين (H₂O₂) ومقارنتها مع فعالية المركبين حمض الأسكوربيك والكويرستين كمضاد أكسدة معروفين.

حُضرت المشتقات الفلافونيدية (B₆ - B₁) مخبرياً في دراستنا السابقة عبر تفاعلات التكتاف والأكسدة الحلقية وتفاعلات الديازة والازدواج، وحددت التراكيب البنوية للمركبات الجديدة باستخدام الطرائق المطيافية (IR-FT, ¹H-NMR, ¹³C-NMR). حددت قدرة الكبح لمركبات الفلافونيد في أربعة تراكيز مختلفة (250, 500, 750, 1000 ppm) بناءً على تراكيز المركبات اللازمة لتقليل الامتصاص عند 516 نانومتر بطريقة DPPH[•]، وعند 230 نانومتر بطريقة H₂O₂ تم تقدير قيمة IC₅₀ انطلاقاً من منحنيات التغير في نسب التثبيط المئوي % بدلالة تركيز المحلول.

أظهرت النتائج فعالية مركبات آزو شالكون وهي (B₂, B₁) التي تحوي زمر هيدروكسيلية في بنيتها كمضادات أكسدة.

الكلمات المفتاحية: آزو شالكون، آزو فلافون، مضادات أكسدة، كويرستين، حمض الأسكوربيك، DPPH[•]، بيروكسيد الهيدروجين.

حقوق النشر : مجلة جامعة تشرين- سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب الترخيص



CC BY-NC-SA 04

* أستاذ مساعد - قسم الكيمياء - كلية العلوم - جامعة تشرين - اللاذقية - سورية sawsansaad954@gmail.com

**مدرس- قسم علم الأدوية والسموم - كلية الصيدلة - جامعة البعث - حمص - سورية.

***أستاذ- قسم الكيمياء- كلية العلوم - جامعة دمشق - دمشق - سورية.

****طالب دراسات عليا (دكتوراه)- قسم الكيمياء- كلية العلوم- جامعة تشرين- اللاذقية- سورية hadiaqelkhdera@gmail.com

مقدمة:

تتتمي مركبات الفلافونيد إلى مجموعة من المواد الطبيعية ذات البنية الفينولية، تتواجد في الفاكهة والخضروات والحبوب والشاي والنبذ [1]. عُرفت هذه المنتجات الطبيعية بتأثيراتها الجيدة كمركبات فعالة بيولوجياً. تم تحديد أكثر من 4000 مركب من مركبات الفلافونيد، والعديد منها مسؤول عن الألوان الجذابة للزهور والفاكهة والأوراق [2]. الفلافونيدات هي مركبات فينولية متعددة المجموعات الهيدروكسيلية (Poliphenoles) ذات وزن جزيئي منخفض، تتواجد بشكل واسع في النباتات [3,4]. تمتلك المركبات الفلافونيدية فعالية بيولوجية فهي مضاد للفيروسات [5]، مضاد للبكتيريا [6]، مضاد للالتهابات [7]، موسع للأوعية الدموية [8]، مضاد للسرطان [9]. تعمل المركبات الفلافونيدية على تثبيط عمل الجذور الحرة من خلال إزالة المعادن الانتقالية حيث تعمل على الارتباط بأيونات المعادن في جسم الإنسان لمنع وصولها إلى الأكسدة [10, 11]. تتمتع بعض مركبات الفلافونيد بقدرة محتملة على تخلب أيونات المعادن مثل Cu^{+} و Fe^{2+} التي تؤدي دوراً حيوياً في تشكيل الجذور الحرة للأوكسجين أثناء العمليات الاستقلابية للمركبات [10,11]. تعمل الفلافونيدات على تثبيط الإنزيمات المرتبطة بتوليد الجذور الحرة مثل (زانثين أوكسيديز، لبيوكسجيناز، بروتين كيناز) [10].

تعرف الجذور الحرة بأنها ذرة أو جزيء يحتوي على إلكترون فردي واحد أو أكثر غير متزاوج. مما يجعل الجذور الحرة غير مستقرة وقصيرة العمر وذات نشاط كيميائي كبير، تعمل على جذب إلكترونات من مركبات أخرى لتحقيق الاستقرار، ويفقد الجزيء المهاجم إلكترونه مشكلاً جذراً حرّاً، وتبدأ سلسلة من التفاعلات المتسلسلة التي تدمر الخلية الحية مسببة الاجهاد التأكسدي وذلك عندما تكون سرعة تشكل الجذور الحرة أكبر من قدرة آلية الحماية الخاصة المضادة لتوليد الجذور الحرة [12].

يُشكل كل من أنواع الأوكسجين التفاعلية ROS وأنواع النتروجين التفاعلية RNS معاً الجذور الحرة والأنواع الأخرى غير الجذرية نشطة [13]. تؤدي ROS / RNS وظيفة مزدوجة كمركبات مفيدة وسامة للخلية الحية. له تأثيرات مفيدة عند المستويات المعتدلة أو المنخفضة، وتشارك في وظائف فسيولوجية مختلفة مثل الوظيفة المناعية (أي الدفاع ضد الكائنات الدقيقة المسببة للأمراض) [14,15].

يمكن أن يؤدي فائض أنواع الأوكسجين النشطة إلى إتلاف الجزيئات الحيوية المختلفة بما في ذلك الدهون والبروتينات والحمض النووي مما يؤدي إلى زيادة الإجهاد التأكسدي في العديد من الأمراض البشرية مثل مرض السكري والأمراض التنكسية العصبية والتهاب المفاصل الروماتويدي، أمراض القلب والأوعية الدموية وأمراض الجهاز التنفسي [16-18]. أهم الجذور الحرة التي تنتج خلال التفاعلات الأيضية هي الجذور المشتقة من الأوكسجين ROS. يمكن تصنيف كل من ROS و RNS إلى مجموعتين من المركبات هما: جذرية وغير جذرية [19-21]. تتضمن الأنواع الجذرية: فوق الأكاسيد ($O_2^{\cdot-}$)، وجذر الأوكسجين ($O_2^{\cdot-}$)، والهيدروكسيل (HO^{\cdot})، وجذر الألكوكسي (RO^{\cdot})، وجذر البيروكسيل (ROO^{\cdot})، وأوكسيد النيتريك (NO^{\cdot}) وثاني أوكسيد النيتروجين (NO_2^{\cdot}). تُرجع الفعالية العالية لهذه الجذور إلى وجود إلكترون حرّ، يمكن منح هذا الإلكترون أو الحصول على إلكترون آخر لتحقيق الاستقرار الكيميائي [112]. تشمل الأنواع غير الجذرية: بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) وحمض هيبوكلوريك ($HOCl$) وحمض هيبوبروميك ($HOBr$) والأوزون (O_3) والأوكسجين المفرد (1O_2) وحمض الآزوتي (HNO_2) وكاتيون النتروزيل (NO^+) وأنيون النيتروكسيل

(NO⁻)، بيروكسيدات عضوية (ROOH)، الألدهيدات (RCHO). هذه الأنواع غير الجذرية ليست جذوراً حرة ولكن يمكن أن تؤدي بسهولة إلى تفاعلات تشكل الجذور الحرة في الكائنات الحية [19-21]. تشمل المصادر الداخلية لـ ROS أعضاء خلوية مختلفة مثل الميتوكوندريا والشبكة الإندوبلازمية، حيث يكون استهلاك الأوكسجين فيها مرتفعاً [22]. أما المصادر الخارجية هي: تلوث الهواء والماء بالأشعة فوق البنفسجية، الطبخ بالكحول (لحم مدخن)، المعادن الانتقالية (As, Pb, Hg, Cd)، المعادن الثقيلة (Fe, Cu)، المذيبات الصناعية، مبيدات حشرية [23].

أهمية البحث وأهدافه:

نالت مركبات الفلافونويد ومشتقاتها اهتماماً كبيراً من قبل علماء الكيمياء العضوية والكيمياء الحيوية كونها من المجموعات المهمة التي تؤدي دوراً رئيسياً في الطبيعة. ولها استخدامات واسعة صناعياً وبيولوجياً لذا هدف البحث إلى دراسة الفعالية المضادة للأكسدة للمشتقات الفلافونيدية المصنعة ومقارنتها مع حمض الأسكوربيك والكويرستين كمضاد أكسدة معروفين، والتحقق من دور مجموعات الهيدروكسيل والكربوكسيل في بنية الفلافونيد.

طرائق البحث ومواده:

المواد الكيميائية:

المواد الكيميائية: ميتانول % 99.99، جذر DPPH[•] الحر (2,2-ثنائي فينيل-1-بيكريل هيدرازيل من شركة Sigma-Aldrich الألمانية).

المواد العيارية: حمض الأسكوربيك (إنتاج شركة Scharlau الإسبانية)، الكويرستين (إنتاج شركة Sigma-Aldrich الألمانية).

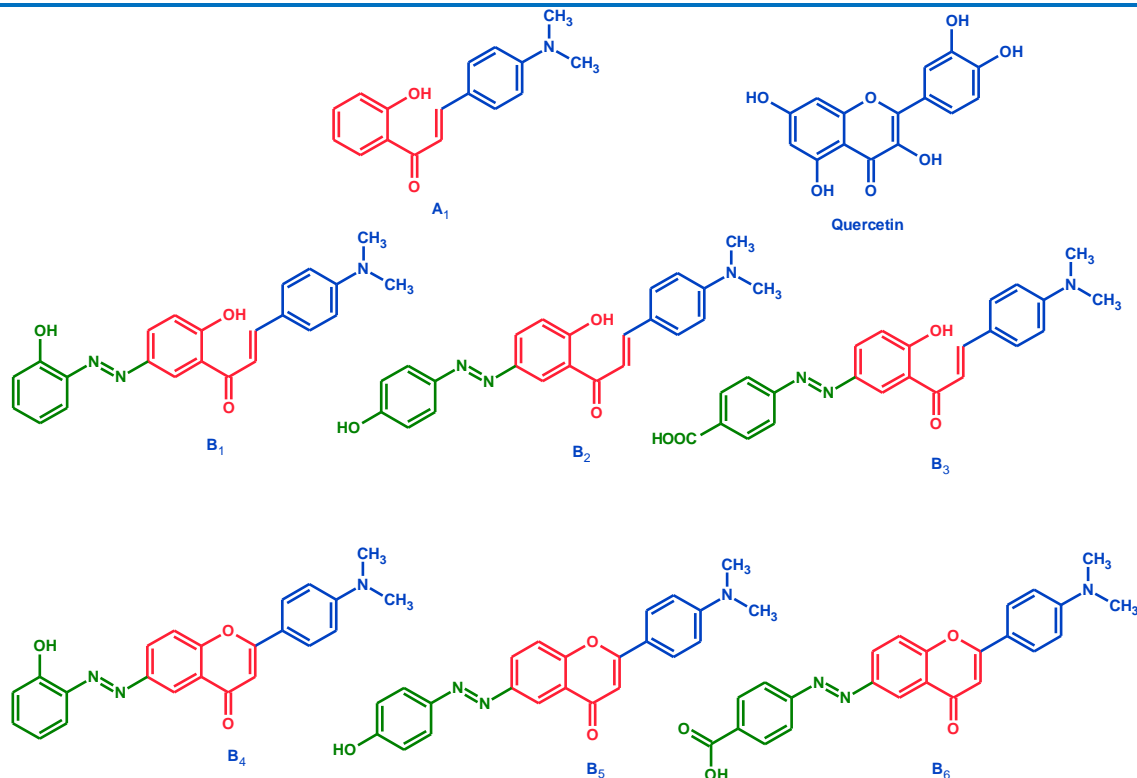
الأجهزة: مقياس الطيف الضوئي Shimadzu Spectrophotometer UV-1700 المجهز بخلايا كوارتز 1 سم.

1- العمل المخبري:

1-2- الاصطناع Synthesis:

حضرت المشتقات الفلافونيدية (B₆ - B₁, A₁)، حُدثت التراكيب البنوية للمركبات الجديدة باستخدام الطرائق المطيافية (¹³C-NMR, ¹H-NMR, FT-IR) في دراستنا السابقة [24].

وبيّن الشكل (1) الصيغ الكيميائية للمركبات الفلافونيدية المصنعة (B₆ - B₁):



- A₁:** (2*E*)-3-[4-(dimethylamino)phenyl]-1-(2-hydroxyphenyl) prop-2-en-1-one
B₁: (2*E*)-3-[4-(dimethylamino)phenyl]-1-{2-hydroxy-5-[(*E*)-(2-hydroxyphenyl)diazenyl]phenyl}prop-2-en-1-one
B₂: (2*E*)-3-[4-(dimethylamino)phenyl]-1-{2-hydroxy-5-[(*E*)-(4-hydroxy phenyl) diazenyl]phenyl}prop-2-en-1-one
B₃: 4-[(*E*)-(4-hydroxy-3-{(2*E*)-3-[4-(dimethylamino)phenyl]prop-2-enoyl} phenyl)diazenyl] benzoic acid
B₄: 2-[4-(dimethylamino)phenyl]-6-[(*E*)-(2-hydroxyphenyl)diazenyl]-4*H*-1-benzopyran-4-one
B₅: 2-[4-(dimethylamino)phenyl]-6-[(*E*)-(4-hydroxyphenyl)diazenyl]-4*H*-1-benzopyran-4-one
B₆: 4-[(*E*)-{2-[4-(dimethylamino)phenyl]-4-oxo-4*H*-1-benzopyran-6-yl]diazenyl] benzoic acid

الشكل (1) الصيغ الكيميائية لمشتقات أزو شالكون ومشتقات أزو فلافون (A₁, B₁ - B₆)

2-2- دراسة الفعالية المضادة للأكسدة بطريقة DPPH:

حُضرت سلسلة من التراكيز (250، 500، 750، 1000) جزء من المليون ppm لكل مركب من المركبات الفلافونيدية ونفس التراكيز لحمض الأسكوربيك والكويرستين كشاهد إيجابي. حُضّر محلول الـ DPPH في الميثانول بتركيز 0.2 mM/L بإذابة 78.86 ميلي غرام من الجذر الحر DPPH في 100 مل من الميثانول الجاف في بالون معايرة سعة 1000 مل ثم مُدّد بالميثانول حتى علامة السعة للحصول على التركيز 0.2 mM/L.

حُدّدت قدرة المركبات الفلافونيدية على كبح الجذور الحرة باختبار الـ (DPPH) بطريقة Blois [25]. وُضع في كل أنبوب اختبار 1 مل من المحلول المراد اختباره (كل مركب من المركبات الفلافونيدية والمركبات العيارية على حدى)، ثم أُضيف إليه 5 مل من محلول الـ DPPH مع التحريك، وُضعت الأنابيب في مكان مظلم في درجة حرارة الغرفة مدة

20 دقيقة، قيس الامتصاصية باستخدام جهاز UV-VIS عند طول موجة 516 نانومتر (يتكوّن المحلول الشاهد من 1 مل ميتانول جاف + 5 مل من الـ DPPH). حُسبت النسبة المئوية لكبح الجذور الحرة وفق العلاقة:

$$\text{DPPH} \% = \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \times 100$$

حيث A_1 : امتصاصية العينة، A_0 : امتصاصية العينة الشاهدة.

رُسم المنحني البياني للنسبة المئوية للتثبيط % DPPH بدلالة التراكيز، ثم حُسبت قيمة IC_{50} وهي معرفة بتركيز المحلول المعبر عنه بوحدة $\mu\text{g/ml}$ (ميكروغرام / مل) لكبح % 50 من جذور الـ DPPH.

تمت مقارنة قدرة المركبات الفلافونيدية على كبح الجذور الحرة مع قدرة المركبات العيارية (كويرستين، حمض الأسكوربيك).

2-3 دراسة الفعالية المضادة للأكسدة بطريقة بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 :

2-3-a-تحضير محلول منظم الفوسفات (50 mM, pH=7.4):

وُزن 6.9 غرام من فوسفات أحادية الصوديوم $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ و 13.4 غرام من فوسفات ثنائية الصوديوم $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ ، وضعت في بالون معايرة سعة 1000 مل وأضيف إليه 800 مل من الماء المقطر، ضبط PH الوسط بإضافة محلول بيروكسيد الصوديوم حتى الحصول على pH=7.4، ثم مُدّد بالماء المقطر حتى علامة السعة [26].

2-3-b-تحضير محلول بيروكسيد الهيدروجين (40 mM) في محلول منظم الفوسفات (50 mM, pH=7.4):

حُضّر محلول بيروكسيد الهيدروجين بتركيز (40 mM) وفق ما يلي:

$$\text{Mole} = \frac{\text{weight (g)}}{\text{molecular weight}}$$

$$\text{Mole} = \frac{\text{Concentration (M)} \times \text{Volume (ml)}}{1000}$$

$$\frac{\text{weight (g)}}{\text{molecular weight}} = \frac{\text{Concentration (M)} \times \text{Volume (ml)}}{1000}$$

$$\text{weight (g)} = \frac{0.04 \times 1000 \times 34.01}{1000} = 1.36 \text{ gr}$$

وهو وزن بيروكسيد الهيدروجين النقي % 100.

كل 1 مل من بيروكسيد الهيدروجين w/v % 30 يحتوي 0.3 غرام من H_2O_2 النقي

كل X مل من بيروكسيد الهيدروجين w/v % 30 يحتوي 1.36 غرام من H_2O_2 النقي

$$\Rightarrow X = 4.53 \text{ ml}$$

أخذ 4.53 مل من بيروكسيد الهيدروجين % 30 ووضعت في بالون معايرة سعة 1000 مل، وأضيف إليه محلول منظم الفوسفات (50 mM, pH=7.4) حتى علامة السعة.

3-3-c-تحديد قدرة المركبات الفلافونيدية على كبح بيروكسيد الهيدروجين:

تمّ تحديد قدرة المركبات الفلافونيدية على كبح بيروكسيد الهيدروجين وفق الطريقة الآتية [27]:

وضع في كل أنبوب اختبار 1 مل من المركب الفلافونيدي المراد اختباره (والمحضّر بتركيز مختلفة كما وردت في الفقرة (2-3-4)) المذاب في الميتانول و 1 مل من محلول بيروكسيد الهيدروجين (40 mM) في منظم الفوسفات، وضعت الأنابيب في مكان مظلم في درجة حرارة الغرفة مدة 10 دقائق، قيس الامتصاصية في جهاز UV-VIS عند طول موجة 230 نانومتر، يتكون المحلول الشاهد من مزيج من الميتانول ومنظم الفوسفات وبيروكسيد الهيدروجين.

اتبعت الطريقة السابقة في تحضير المحاليل للمركبات العيارية (كويرستين، حمض الأسكوربيك).

حُسبت نسبة كبح بيروكسيد الهيدروجين بالطريقة الحسابية التالية:

$$\% \text{النسبة المئوية للتثبيط} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

حيث A₁: امتصاصية العينة، A₀: امتصاصية العينة الشاهدة.

رُسم المنحني البياني للنسبة المئوية للتثبيط % H₂O₂ بدلالة التراكيز، ثم حُسبت قيمة IC₅₀ لـ H₂O₂.

تمت مقارنة قدرة المركبات الفلافونيدية على كبح بيروكسيد الهيدروجين مع قدرة المركبات العيارية (كويرستين، حمض الأسكوربيك).

النتائج والمناقشة:

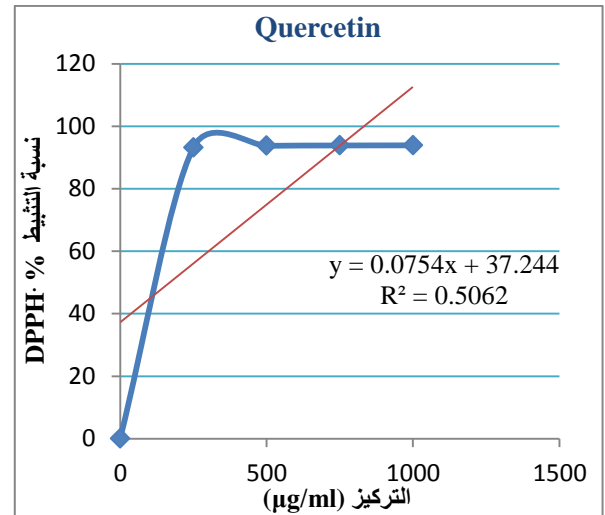
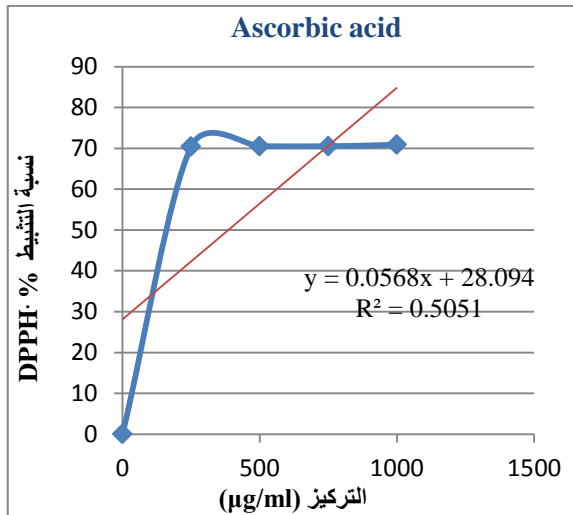
تم قياس قدرة الفلافونيد على الكبح بطريقتي الـ DPPH[•] وبيروكسيد الهيدروجين بأربعة تراكيز مختلفة، أي عند (250, 500, 750 and 1000 µg/ml) عند الطول الموجي 516 نانومتر بطريقة الـ DPPH[•] و 230 نانومتر بطريقة بيروكسيد الهيدروجين.

يوضح الجدول (1) النسب المئوية لقدرة المركبات الفلافونيدية (A₁, B₆ - B₁) على تثبيط الـ DPPH[•] و H₂O₂.

الجدول (1) النسب المئوية لتثبيط الـ H₂O₂, DPPH[•] بفعل المركبات الفلافونيدية المصنعة (A₁, B₆ - B₁):

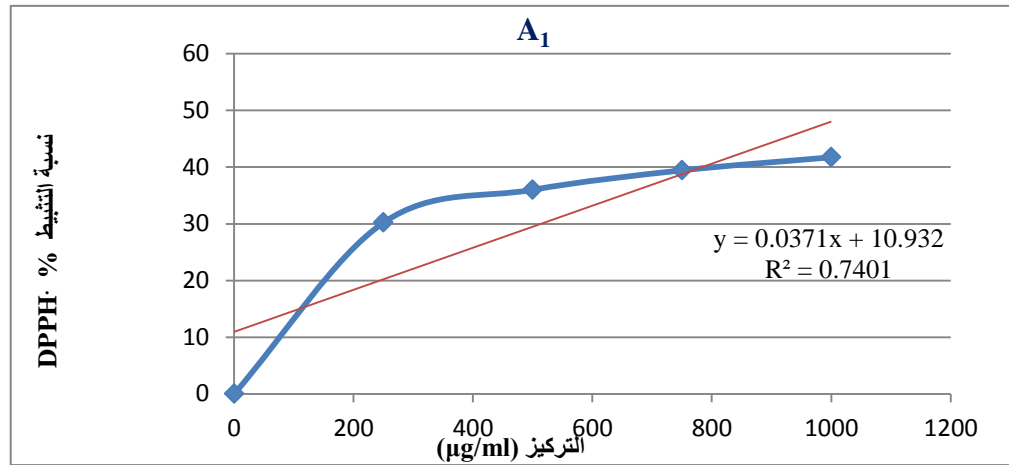
1000		750		500		250		0	التركيز µg/ml
DPPH [•] %	H ₂ O ₂ %	DPPH [•] %	H ₂ O ₂ %	DPPH [•] %	H ₂ O ₂ %	DPPH [•] %	H ₂ O ₂ %		المركب
41.74	27.08	39.43	20.31	36.00	15.92	30.20	12.68	0	A ₁
53.66	44.66	51.92	40.70	50.18	37.31	48.07	33.71	0	B ₁
54.19	39.04	51.97	36.74	50.71	34.29	48.55	31.12	0	B ₂
50.71	34.14	49.02	31.12	47.23	27.59	45.49	24.63	0	B ₃
44.22	33.35	42.64	31.91	40.80	23.77	39.06	19.09	0	B ₄
49.44	33.50	48.44	29.75	45.38	22.98	42.17	18.29	0	B ₅
44.28	24.63	40.95	19.66	37.42	15.41	36.68	10.95	0	B ₆
93.93	92.57	93.88	91.93	93.77	91.78	93.19	91.49	0	كويرستين
70.90	78.53	70.53	77.80	70.53	76.80	70.42	75.86	0	حمض الأسكوربيك

تبين الأشكال (2، 3، 4، 5، 6، 7، 8، 9، 10) المنحنيات البيانية لنسبة التثبيط المئوية % DPPH[•] بفعل المركبات الفلافونيدية المصنعة والكويرستين وحمض الأسكوربيك بدلالة التركيز وعلاقة الربط بين نسبة التثبيط وتركيز المركب.

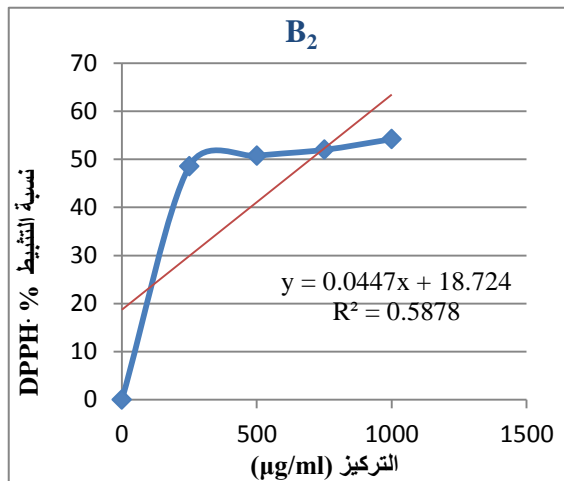


الشكل (3) النسب المئوية لتثبيط الـ DPPH بدلالة تركيز حمض الأسكوربيك

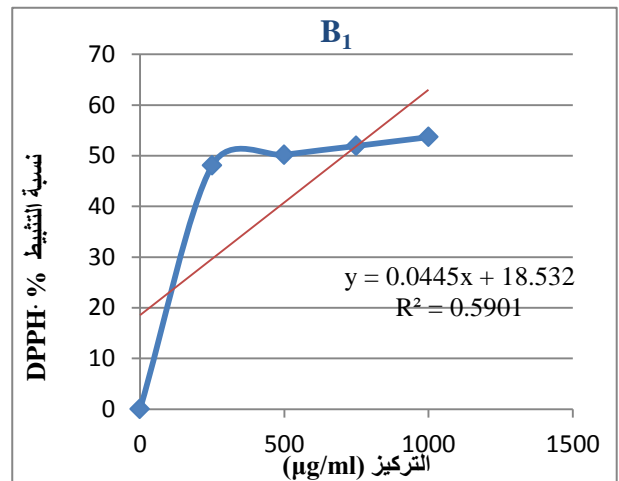
الشكل (2) النسب المئوية لتثبيط الـ DPPH بدلالة تركيز مركب الكويرستين



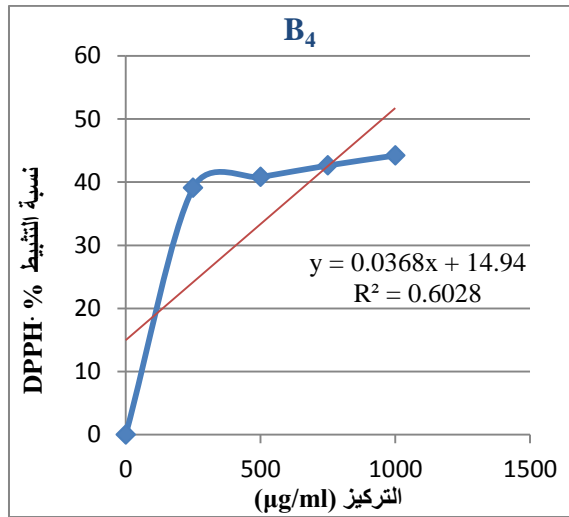
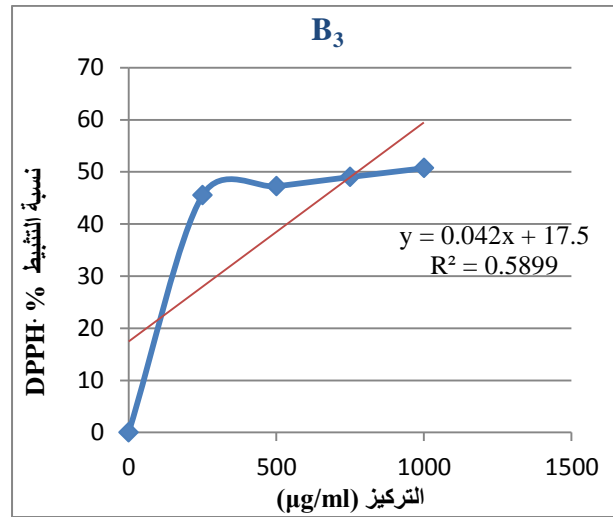
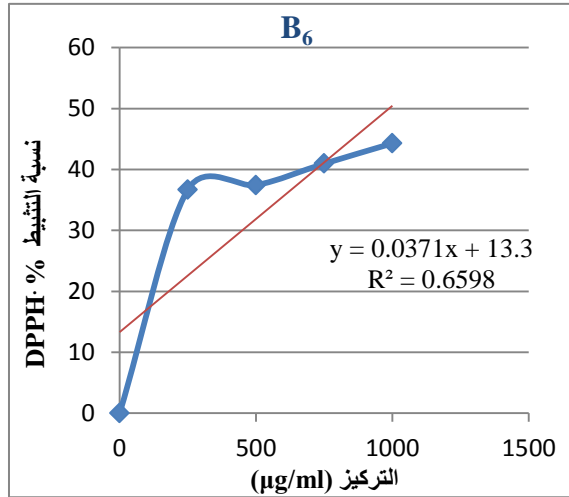
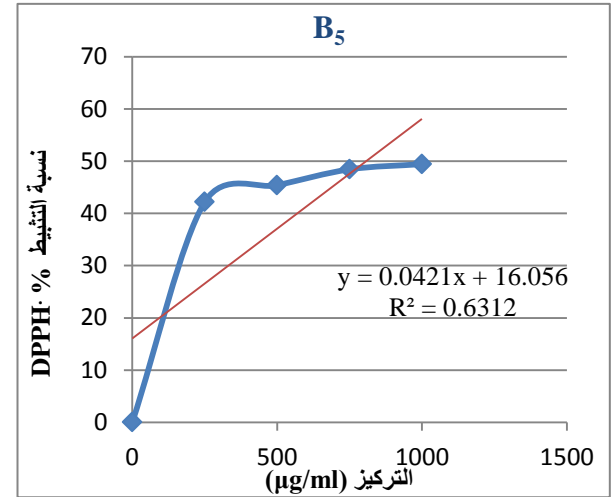
الشكل (4) النسب المئوية لتثبيط الـ DPPH بدلالة تركيز المركب A₁



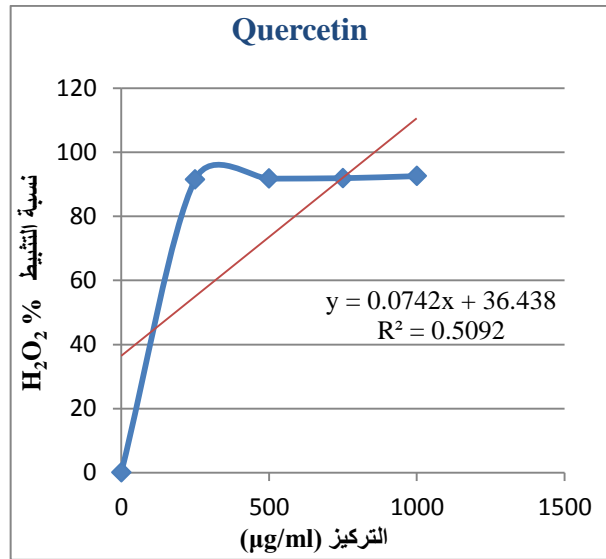
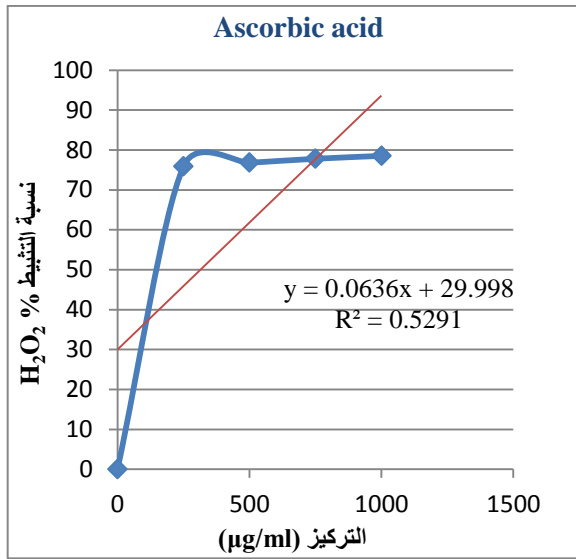
الشكل (6) النسب المئوية لتثبيط الـ DPPH بدلالة تركيز المركب B₂



الشكل (5) النسب المئوية لتثبيط الـ DPPH بدلالة تركيز المركب B₁

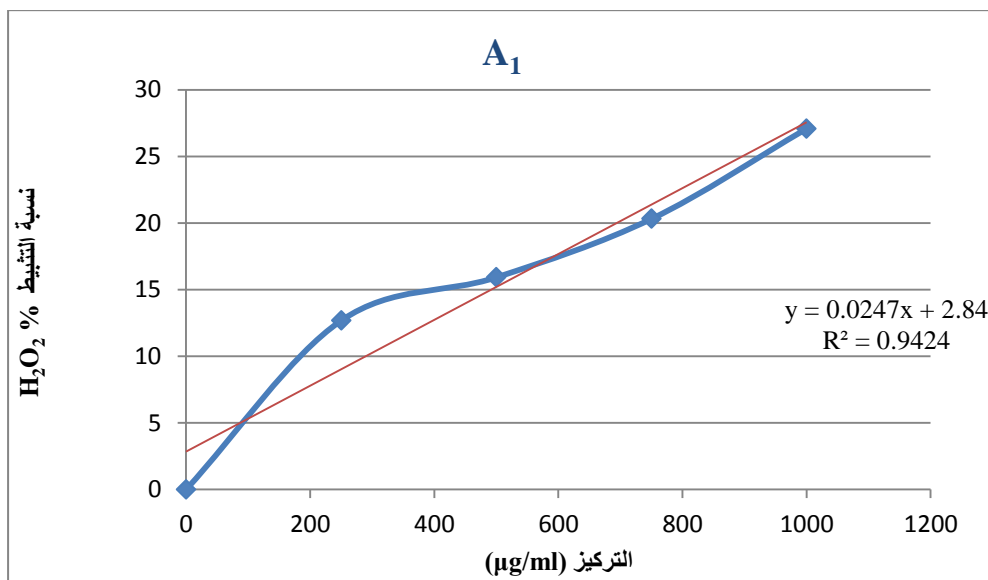
الشكل (8) النسب المئوية لتثبيط الـ DPPH بدلالة تركيز المركب B₄الشكل (7) النسب المئوية لتثبيط الـ DPPH بدلالة تركيز المركب B₃الشكل (10) النسب المئوية لتثبيط الـ DPPH بدلالة تركيز المركب B₆الشكل (9) النسب المئوية لتثبيط الـ DPPH بدلالة تركيز المركب B₅

تبين الأشكال الآتية (11، 12، 13، 14، 15، 16، 17، 18، 19) المنحنيات البيانية للنسبة المئوية لتثبيط H₂O₂ بفعل المركبات الفلافونيدية المصنعة والكويرستين وحمض الأسكوربيك بدلالة التركيز وعلاقة الربط بين النسبة المئوية للتثبيط بتركيز المركب:

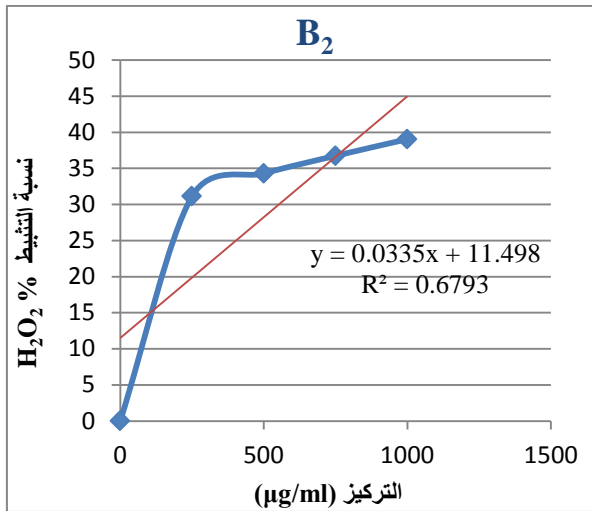


الشكل (12) النسب المئوية لتنشيط الـ H_2O_2 بدلالة تركيز حمض الأسكوربيك

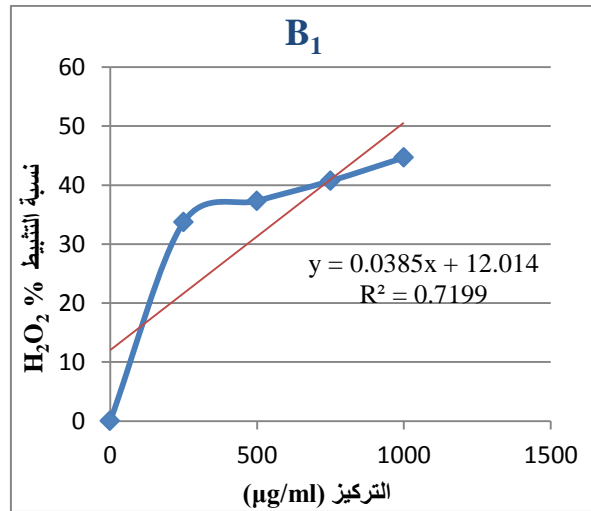
الشكل (11) النسب المئوية لتنشيط الـ H_2O_2 بدلالة تركيز الكويرستين



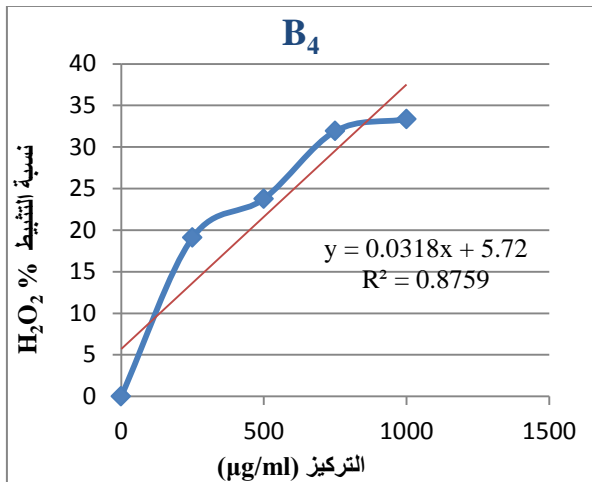
الشكل (13) النسب المئوية لتنشيط الـ H_2O_2 بدلالة تركيز المركب A_1



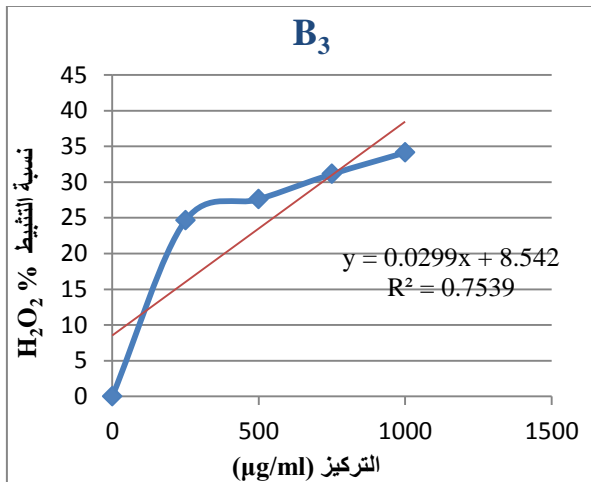
الشكل (15) النسب المئوية لتثبيط الـ H₂O₂ بدلالة تركيز المركب B₂



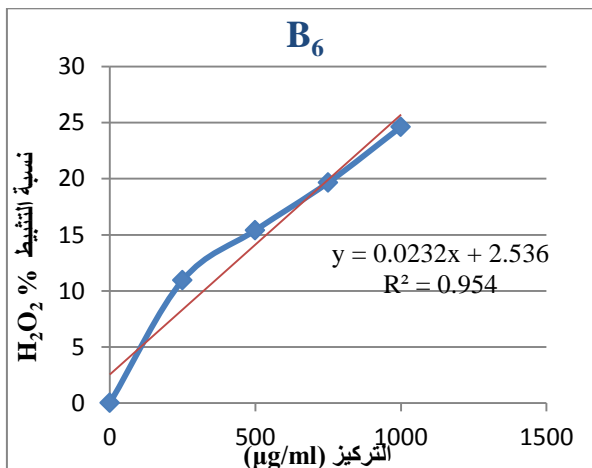
الشكل (14) النسب المئوية لتثبيط الـ H₂O₂ بدلالة تركيز المركب B₁



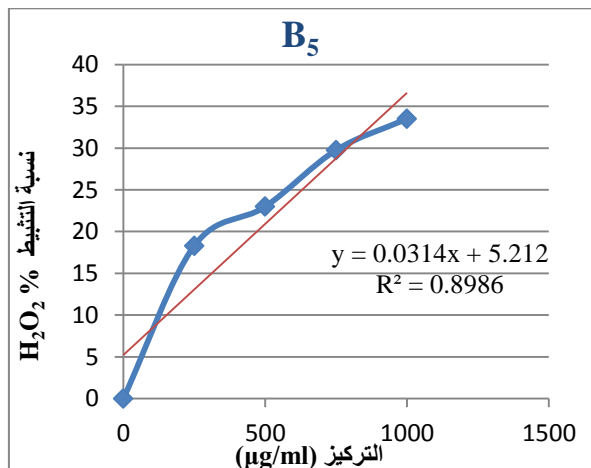
الشكل (17) النسب المئوية لتثبيط الـ H₂O₂ بدلالة تركيز المركب B₄



الشكل (16) النسب المئوية لتثبيط الـ H₂O₂ بدلالة تركيز المركب B₃



الشكل (19) النسب المئوية لتثبيط الـ H₂O₂ بدلالة تركيز المركب B₆



الشكل (18) النسب المئوية لتثبيط الـ H₂O₂ بدلالة تركيز المركب B₅

لوحظ في الأشكال السابقة جميعها أنه بازياد تركيز المركبات الفلافونيدية ازدادت نسبة التثبيط المئوية لها على الجذور الحرة. حُسبت القيمة IC_{50} لكل مركب من معادلة المنحني البياني لنسبة التثبيط بدلالة التركيز وهي معادلة مستقيم من الدرجة الأولى (تم حساب قيمة IC_{50} من العلاقات الموجودة ضمن الأشكال من 2 إلى 19)، فمثلاً عند حساب قيمة IC_{50} لمركب الكويرستين (بطريقة بيروكسيد الهيدروجين) من معادلة المستقيم $y = 0.0742x + 36.438$ الموجودة في الشكل (11) حيث تمثل y نسبة التثبيط المئوية وعند حساب العامل IC_{50} تكون $y = 50\%$.

تمثل x قيمة IC_{50} للكويرستين عندما تكون $y = 50\%$

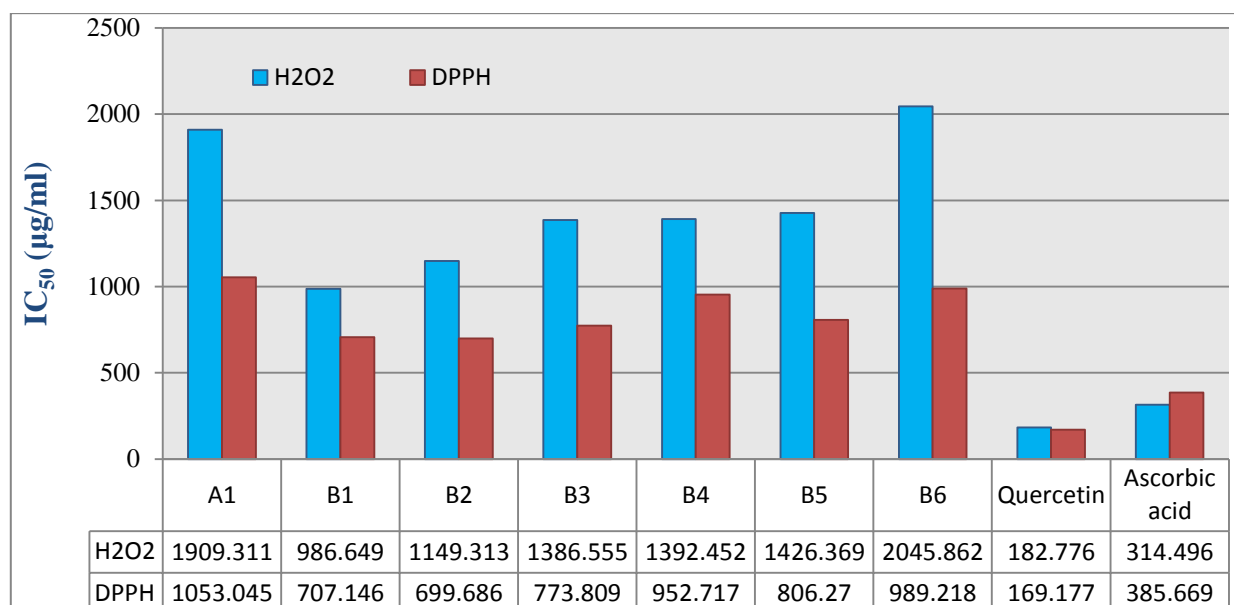
وبالتعويض نجد:

$$50 = 0.0742x + 36.438 \Rightarrow 0.0742x = 50 - 36.438$$

$$\Rightarrow 0.0742x = 13.562 \Rightarrow x = 182.776 \mu\text{g/ml} = IC_{50}$$

حسبت قيمة الـ IC_{50} لبقية المركبات بنفس الطريقة السابقة.

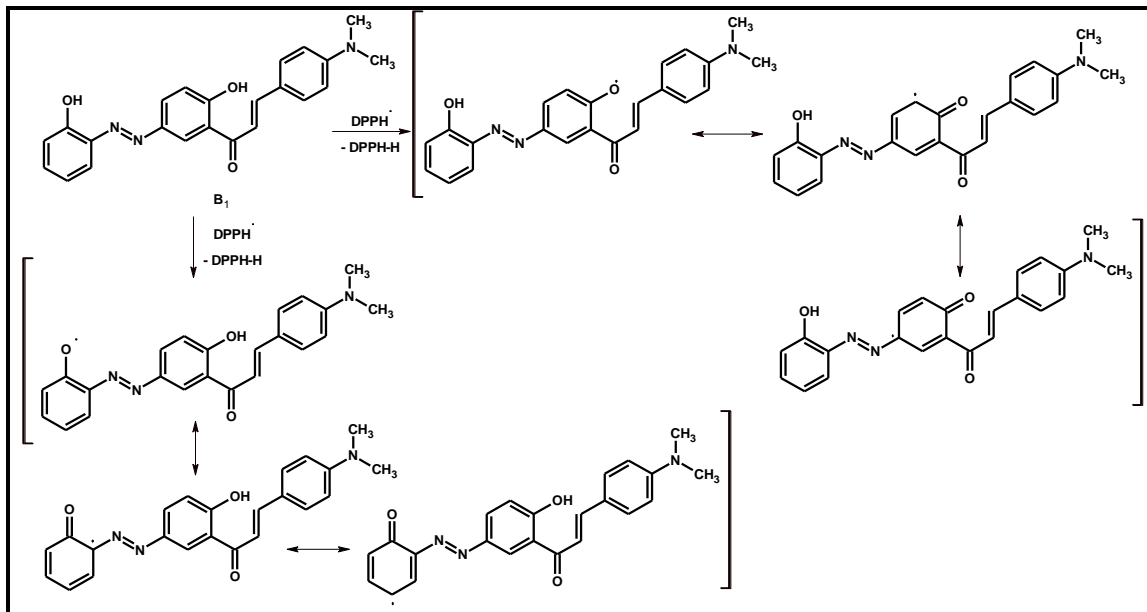
يوضح الشكل (20) قيم الـ IC_{50} للمركبات الفلافونيدية (B_6 - B_1 , A_1) بطريقتي DPPH و H_2O_2 .



الشكل (20) قيم IC_{50} للمركبات الفلافونيدية (B_6 - B_1 , A_1) بطريقتي DPPH و H_2O_2

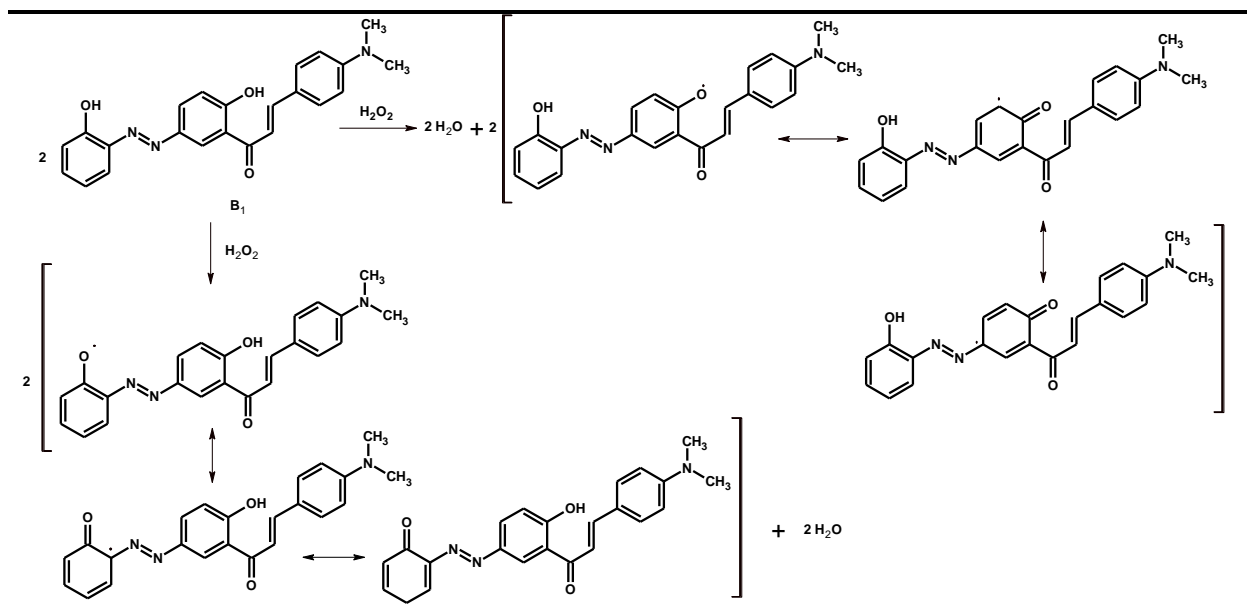
أظهرت نتائج اختبار القدرة التثبيطية للمركبات الفلافونيدية المصنعة (B_6 - B_1 , A_1) أن النسبة المئوية لكبح الجذور الحرة كانت متفاوتة وجميعها تمتلك قيم IC_{50} أعلى مقارنة بالمركبين العياريين حمض الأسكوربيك والكويرستين أي أنها مضادات أكسدة أضعف. لوحظ أن النسبة المئوية لكبح المركب الشالكوني A_1 كانت منخفضة حيث بلغت 41.74 % بطريقة DPPH و 27.08 % بطريقة H_2O_2 عند التركيز 1000 ppm وكانت قيمة الـ IC_{50} لهما (1053.045 $\mu\text{g/ml}$ ، 1909.311 $\mu\text{g/ml}$) على التوالي. ازدادت النسب المئوية لكبح عند ادخال زمر أزو فينيل للمركبات الفلافونيدية (B_6 - B_1) ووصلت أعلاها لدى المركبين B_1 و B_2 حيث يحتوي كل منهما على زمري أورثو هيدروكسي فينيل وبارا هيدروكسي فينيل فقد وصلت نسبة المركبين (B_1 و B_2) بطريقة DPPH إلى (53.66 %، 54.19 %) وكانت قيمة الـ IC_{50} لهما (707.147 $\mu\text{g/ml}$ ، 699.686 $\mu\text{g/ml}$) على الترتيب، وبطريقة H_2O_2 وصلت النسب

المئوية للمركبين (B₁ و B₂) إلى (44.55 %، 39.04 %) عند التركيز 1000 ppm وكانت قيمة الـ IC₅₀ لهما (986.649 µg/ml، 1149.313 µg/ml). في حين انخفضت قيم النسب المئوية لكبح الجذور الحرة بفعل المركبين B₄ و B₅ عند اجراء تفاعلات التحلق على المركبين B₁ و B₂ باستخدام اليود في ثنائي ميثيل سلفوكسيد [24] حيث بلغت النسب المئوية لكبح الجذور الحرة بفعل المركبين B₄ و B₅ بطريقة DPPH (44.22 % و 49.44 %) عند التركيز 1000 ppm وكانت قيم الـ IC₅₀ لهما (952.717 µg/ml، 806.270 µg/ml) على التوالي، في حين بلغت النسب المئوية لكبح الجذور الحرة بطريقة الـ H₂O₂ (33.35 %، 33.50 %) عند التركيز 1000 ppm وكانت قيم الـ IC₅₀ لهما (1392.452 µg/ml، 1426.369 µg/ml) على التوالي. لوحظ انخفاض قليل في النسبة المئوية لكبح الجذور الحرة عند استبدال زمرة -OH في المركب B₂ بزمرة كربوكسيل في المركب B₃ [25] حيث بلغت نسبة المركب B₃ بطريقة DPPH (50.71 %) وبطريقة H₂O₂ (34.14 %) عند التركيز 1000 ppm وكانت قيمة الـ IC₅₀ (773.809 µg/ml، 1386.555 µg/ml) على التوالي. انخفضت النسبة المئوية للكبح للمركب B₆ بطريقة البيروكسيد حيث بلغت نسبته 24.63 % وكانت قيمة الـ IC₅₀ (2045.862 µg/ml) على التوالي، بينما ازدادت النسبة المئوية للكبح للمركب B₆ بطريقة DPPH حيث بلغت نسبته 44.28 % عند التركيز 1000 ppm وكانت قيمة الـ IC₅₀ (989.218 µg/ml). نستنتج مما سبق أن أعلى فعالية لمركب كمضاد أكسدة هما المركبين B₁، B₂ ويعزى السبب إلى وجود زمرة هيدروكسي في الموقعين أورثو وبارا على الترتيب [25]. وأقل فعالية لمركب كمضاد أكسدة هو المركب B₆ لوجود زمرة كربوكسيل في الموقع بارا. ويبين الشكل (21) الآلية المقترحة للمركب B₁ كمضاد أكسدة [28].



الشكل (21) الآلية المقترحة للمركب B₁ كمضاد أكسدة [28]

يلاحظ في الشكل (20) أن القدرة التثبيطية للمركبات الفلافونيدية على الجذر الحر DPPH أعلى من القدرة التثبيطية لها على بيروكسيد الهيدروجين H₂O₂. أي أن قيم IC₅₀ بطريقة DPPH أقل. يوضح الشكل (22) الآلية المقترحة لقدرة المركبات الفلافونيدية على كبح بيروكسيد الهيدروجين [29]:



الشكل (22) آلية مقترحة لقدرة المركب الفلافونيدي على كبح بيروكسيد الهيدروجين [29]

النتائج والمناقشة:

يُعد المركب مضاداً للأكسدة، عندما يتم تثبيت جذور الفينوكسي الناتجة. فإذا فشل في تثبيت الجذور غير المستقرة، انتشر تفاعلاً متسلسلاً بواسطة الجذور الحرة والذي يمكن أن يؤدي إلى تأثيرات ضارة في جسم الإنسان [28]. لكن استقرار الجذور الحرة غير المستقرة يمكن تحقيقه بسهولة بواسطة المركبات الفينولية (وخاصة الفلافونيدية) عن طريق عدم تموضع الإلكترون لأن المركب يحتوي على نظام هيكل مترافق سواء في الحلقة العطرية أو الحلقة البيرانية (كما في الآلية المقترحة في الشكل (20)). لذا فإن جذور الفينوكسي المتكونة تخضع لعملية إزالة تمرکز الإلكترون على الهيكل الفلافونيدي وتجعل الجذور غير المستقرة في شكل مستقر [28].

تساهم الحلقة غير المتجانسة للفلافونيدات في نشاط مضادات الأكسدة من خلال وجود اقتران بين الحلقتين العطريتين (A, B) ووجود زمرة الهيدروكسيل -OH الفينولية. يؤدي إزالة زمرة ال-OH إلى انخفاض فعالية الفلافونيد كمضاد أكسدة [25]. بينت النتائج التي وردت في الجدول (1) أن المركبان (B₁ و B₂) يتميزان بفعالية مضادة للأكسدة بسبب احتوائها على زمرة هيدروكسي التي تعمل على منح الهيدروجين إلى الجذر الحر DPPH[•] (وتثبيته متحولاً إلى الشكل المستقر ثنائي فينيل بيكريل هيدرازين (DPPH-H) أو إلى بيروكسيد الهيدروجين (وتثبيته متحولاً إلى جزيئات ماء)، ويتم تحويل جزيئات المركبات المانحة للهيدروجين إلى جذور حرة مستقرة بالطنين [28, 29] كما هو موضَّح في الآليات المقترحة في الشكلين (21 و 22).

أظهرت النتائج أن القدرة التثبيطية للمركبات الفلافونيدية على الجذر الحر DPPH[•] أعلى منها على بيروكسيد الهيدروجين، قد يكون السبب أن الجذر الحر DPPH[•] عبارة عن مركب وسطي (غير مستقر) مقارنة ببيروكسيد

الهيدروجين (مركب ثابت) وبالتالي يتميز DPPH بنشاط عالٍ فهو يتفاعل مع المركبات الفلافونيدية بسرعة أكبر من بيروكسيد الهيدروجين.

الاستنتاجات والتوصيات:

الاستنتاجات:

- i- تتمتع المركبات الفلافونيدية التي تحوي زمر هيدروكسيلية بفعالية جيدة مقارنة بالمركبات العيانية.
- ii- فعالية المركبات التي تحتوي في بنيتها على زمرة كربوكسيل أقل كمضادات أكسدة من المركبات الحاوية زمر هيدروكسيلية.
- iii- فعالية المركبات الفلافونيدية كمضاد أكسدة على الجذر الحر DPPH أكبر من فعاليتها على بيروكسيد الهيدروجين.
- iiii- كانت فعالية المركبات الفلافونيدية أعلى عند قيم IC50 صغيرة.

التوصيات:

اجراء دراسة تتناول تأثير المركبات الفلافونيدية في الخلايا الحية (على حيوانات التجارب).

References:

1. Middleton, E. J. *Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function*. Adv Exp Med Biol, 439, 1998, 175-182.
2. de Groot, H.; Rauen, U. *Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids*. Fundam Clin Pharmacol, 12, 1998, 249-255.
3. FERNANDEZ S, P.; Wasowski, C.; Loscalzo, L. M.; Granger, R. E.; Johnston, G. A. R.; Paladini, A. C.; Marder, M. *Central nervous system depressant action of flavonoid glycosides*. European Journal of Pharmacology, 539 (3), 2006, 168-176.
4. HEIM K, E.; Tagliaferro, A. R.; Bobliya, D. J. *Flavonoids antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships*. The Journal of Nutritional Biochemistry, 13 (10), 2002, 572-584.
5. Weber, J. M.; Ruzindana-Umunyana, A.; Imbeault, L.; Sircar, S. *Inhibition of adenovirus infection and adenain by green tea catechins Antivir*. Antiviral Research, 58, 2003, 167-173.
6. Alvesalo, J.; Vuorela, H.; Tammela, P.; Leinonen, M.; Saikku, P.; Vuorela, P. *Inhibitory effect of dietary phenolic compounds on Chlamydia pneumoniae in cell cultures*. Biochem Pharmacol, 71, 2006, 735-741.
7. Subarnas, A.; Wagner, H. *Analgesic and anti-inflammatory activity of the proanthocyanidins shelleagueain A from Polypodium feei*. Phytomedicine, 7, 2000, 401-405.
8. Calderone, V.; Chericoni, S.; Martinelli, C.; Testai, L.; Nardi, A.; Morelli, I. *Vasorelaxing effects of flavonoids: investigation on the possible involvement of potassium channels Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol*, 370, 2004, 290-298.
9. Formica, J. V. W. *Regelson Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids*. Food Chem Toxicol, 33, 1995, 1061-1080.
10. Rocházková, D.; Bousová, I.; Wilhelmová, N. *Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids*. Fitoterapia, 82(4), 2011, 513-23.
11. Malešev, D.; Kunti, V. *Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions*. J Serb Chem Soc, 72(10), 2007, 921-39.
12. MUKHERJI, S. M.; SINGH, S. P. *Reaction mechanism in organic chemistry*. Madras: Macmillan IndiaPress; 1986.

13. Pham-Huy, L. A.; Hua, H.; Pham-Huy, C. *Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health*. Int J Biomed Sci, 2, 2008, 89-96.
14. Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncola, J.; Cronin, M. T.; Mazura, M.; Telser, J. *Review Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. Int J Biochem Cell Biol, 39(1), 2007, 44-84.
15. Nordberg, J.; Arner, E. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian Thioredoxin system. *Free Radical Biol Med*, 31(11), 2001, 1287-1312.
16. Yla-Herttuala, S. *Oxidized LDL and atherogenesis*. Ann N Y Acad Sci, 874, 1999, 134-137.
17. Stadtman, E. R.; Levine, R. L. *Protein oxidation*. Ann N Y Acad Sci, 899, 2000, 191-208.
18. Marnett, L. J. *Oxyradicals and DNA damage*. Carcinogenesis, 21(3), 2000, 361-370.
19. Kohen, R.; Nyska, A. *Invited review Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification*. Toxicol Pathol, 30(6), 2000, 620-650.
20. Halliwell, B. *Free Radicals and other reactive species in disease*. Nature Encyclopedia of life sciences, 2001, 1-7..
21. Genestra, M. *Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants*. Review Cell Signal, 19(9), 2007, 1807-1819.
22. Cheeseman, K. H.; Slater, T. F. *An introduction to free radical biochemistry*. Br Med Bull, 49(3), 1993, 481-493.
23. Pham-Huy, L. A.; Hua, H.; Pham-Huy, C. *Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health*. Int J Biomed Sci, 4(2), 2008, 89-96.
24. Khdera, H. A.; Saad, S. Y.; Moustapha, A.; Kandil, F. *Synthesis of azochalcone and azoflavone derivatives from chalcone (2E)-3-[4-(dimethylamino)phenyl]-1-(2-hydroxyphenyl)propen-2-one-1 and study the antifungal activity for some of it*. Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Basic Sciences Series, 45(3), 2023, 39-58.
25. Bors, W.; Heller, W.; Michel, C.; Saran, M. *Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies*. Methods in Enzymology, 186, 1990, 343-355.
26. Mohan, C. *Calbiochem: A guide for the preparation and use of buffers in biological systems*, 3rd. Germany: EMD Bioscience, 2006.
27. Ruch, R. J.; Cheng, S. J.; Klaunig, J. E. *Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea*. Carcinogenesis, 10, 1989, 1003-1008.
28. Assa, J. R.; Widjanarko, S. B.; Kusnadi, J. K.; Berhimpon, S. *Antioxidant Potential of Flesh, Seed and Mace of Nutmeg (Myristica fragrans Houtt)*. Int.J. ChemTech Res. 6(4), 2014, 2460-2468.
29. Prahadeesh, N.; Sithambaresan, M.; Mathiventhan, U. *A Study on Hydrogen Peroxide Scavenging Activity and Ferric Reducing Ability of Simple Coumarins*. Emerging Science Journal. 2 (6), 2018, 417 - 427.