استخدام طريقة تثبيط تمسخ الألبومين في تحديد الفعالية المضادة للالتهاب للمركبات الفينولية في بعض عصائر الفواكه المتوفرة محلياً

د. ديمة الدياب*
د. نعمى حسن**
أكرم نظام***

(تاريخ الإيداع 23 / 9 / 2020. قُبِل للنشر في 13 / 1 / 2021)

□ ملخّص □

تعد عصائر الفواكه من أهم مصادر الأغذية الغنية بالمركبات الفينولية وجرى اختيار ثلاثة عصائر طبيعية من أجل تحديد سويات المركبات الفينولية فيها ودراسة فعاليتها المضادة للالتهاب وهي عصائر التوت الأسود والرمان والبرتقال. جرى أيضاً تحضير خلاصة فينولية لكل نوع من العصائر الثلاثة وأُستخدمت طريقة Folin-Ciocalteau المرجعية لتحديد المحتوى الكلي من المركبات الفينولية في العصائر وخلاصتها الفينولية ثم دراسة الفعالية المضادة للالتهاب للعصائر وخلاصاتها الفينولية عند تراكيز متماثلة من المركبات الفينولية تراوحت بين (10–60 µg/ml) وذلك باستخدام طريقة تثبيط تمسخ الألبومين وأُستعمل الإيبوبروفين كشاهد إيجابي في الطريقة.

كان المحتوى الكلي من المركبات الفينولية في العصائر الثلاثة أعلى من خلاصاتها الفينولية وأبدى عصير التوت الأسود وخلاصته الفينولية المحتوى الأعلى من المركبات الفينولية وأظهر عصير التوت الأسود وخلاصته الفينولية الفعالية المضادة للالتهاب الأعلى بين العصائر المدروسة وخلاصاتها الفينولية ولوحظ أيضاً أنّ الخلاصة الفينولية أبدت فعالية مضادة للالتهاب أعلى من العصير الموافق لها عند نفس التركيز من المركبات الفينولية.

الكلمات المفتاحية: المركبات الفينولية، الفعالية المضادة للالتهاب، تثبيط تمسخ الألبومين، عصير الفواكه

* أستاذ مساعد – قسم الكيمياء التحليلية والغذائية، كلية الصيدلة، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية.
E-mail: dyabdima@yahoo.com dimaaldyab@tishreen.edu.sy
** مدرسة – قسم تأثير الأدوية والسموم، كلية الصيدلة، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية. E-mail: nouma.hasan@gmail.com
*** طالب دراسات عليا (ماجستير) – قسم الكيمياء التحليلية والغذائية، كلية الصيدلة، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية.
E-mail: akramyn99@gmail.com akramnizam@tishreen.edu.sy

Using Albumin Denaturation Inhibition Method to Determine the Anti-Inflammatory Activity of Phenolic Compounds in Some Locally Available Fruit Juices

Dr. Dima Al Diab[*]
Dr. Nouma Hasan[**]
Akram Nezam[***]

(Received 23 / 9 / 2020. Accepted 13 / 1 / 2021)

□ ABSTRACT □

Fruit Juices are considered as an important source of phenolic compounds. Three natural Black mulberry, Pomegranate and orange juices were selected to determine their phenolic content and assess their anti-inflammatory activity. A phenolic extract for each juice was also prepared. Total Phenolic content was determined using Folin-Ciocalteu method. The anti-inflammatory activity was evaluated using albumin denaturation inhibition method at concentration of phenolic compounds ranged between (10- 60 µg/ml). Ibuprofen was used as a standard drug.

Phenolic content in juices was higher than their phenolic extracts. The highest total phenolic content was found in black mulberry juice and its phenolic extract. Black mulberry juice and its phenolic extract also revealed the highest anti-inflammatory activity among the studied juices. Phenolic extracts showed higher anti-inflammatory activity than the juices at the same concentration of phenolic compounds.

Keywords: Phenolic compounds, anti-inflammatory activity, albumin denaturation inhibition, fruit juices.

[*] **Associate Professor - Analytical and Food Chemistry Department, Faculty of Pharmacy, Tishreen University, Lattakia, Syria. E-mail: dyabdima@yahoo.com dimaaldyab@tishreen.edu.sy**
[**] **Assistant Professor - Pharmacology and Toxicology Department, Faculty of Pharmacy, Tishreen University, Lattakia, Syria. E-mail: nouma.hasan@gmail.com**
[***] **Postgraduate Student (MSc) - Analytical and Food Chemistry Department, Faculty of Pharmacy, Tishreen University, Lattakia, Syria. E-mail: akramyn99@gmail.com akramnizam@tishreen.edu.sy**

مقدمة:

يوصف الالتهاب أنّه آلية دفاع يمارسها الجهاز المناعي تجاه عوامل عديدة مسببة للأذية مثل الجراثيم والفيروسات والجروح والرضوض والمركبات الكيميائية السامة وغيرها ويشارك في هذه العملية عدد كبير من الوسائط الالتهابية والتي تُفرز من قبل الخلايا المناعية (Chen *et al.*, 2018). يؤدي الالتهاب إلى التخلص من العامل المسبب للأذية إلّا أنّ الاستجابة الالتهابية غير المضبوطة تؤدي إلى أذيات نسيجية وحدوث الالتهاب المزمن والذي يتطور للإصابة بالعديد من الأمراض الالتهابية مثل الأمراض القلبية الوعائية والسرطانات وأمراض المناعة الذاتية وغيرها (Cai *et al.*, 2014). إنَّ الأذية النسيجية التي تحدث خلال العملية الالتهابية يكون سببها حدوث تمسخ البروتينات المتواجدة في الخلايا أو في الحيز بين الخلوي، كما أنّ حدوث هذا التمسخ يزيد من نفاذية الأوعية الدموية مما يحفز العملية الالتهابية (Opie, 1962). تتصف طريقة تثبيط تمسخ ألبومين البيض الطازج بأنَّها طريقة حساسة وموثوقة لقياس الفعالية المضادة للالتهاب في الزجاج للعديد من المركبات الطبيعية (Heendeniya *et al.*, 2018). أثبتت عدة دراسات قدرة بعض مضادات الالتهاب اللاستيروئيدية مثل الإندوميتاسين والفينيل بوتازون على تثبيط التمسخ الحراري لبروتين الألبومين (Mizushima and Kobayash 1968; Grant *et al.*, 1970) حيث يُفسر ذلك أنَّه عند تثبيط حدوث تمسخ حراري للألبومين يحدث تثبيط تحوله إلى تجمعات صغيرة تتصرف كمستضدات تحرض العملية الالتهابية وهذا يعني فعالية مضادة للالتهاب (Grant *et al.*, 1970). يرتبط حدوث تمسخ بروتينات الأنسجة أيضاً بحدوث الاستجابة الالتهابية ويؤدي لأمراض التهابية متعددة مثل التهاب المفاصل الرثياني، فعند حدوث تمسخ للألبومين في الجسم تنطلق مستضدات ذاتية مرتبطة بتفاعلات فرط الحساسية من النمط الثالث والتي تعد مسؤولة عن حدوث عدة أمراض التهابية مزمنة مثل التهاب المفاصل الرثياني والذئبة الحمامية وغيرها (Williams *et al.*, 2008).

تعد مضادات الالتهاب اللاستيروئيدية العوامل الأكثر استخداماً ضمن خطة علاج الأمراض الالتهابية لكن يترافق استخدامها بالعديد من التأثيرات الجانبية الخطيرة خاصة خطر حدوث النزيف الهضمي والاحتشاءات القلبية (Süleyman *et al.*, 2007). بحثاً عن بدائل أكثر أماناً تقوم الكثير من الأبحاث بدراسة المركبات الطبيعية بصفتها مركبات واعدة في علاج الالتهاب ومن أهمها المركبات الفينولية والتي يمكن أيضاً استهلاكها ضمن النظام الغذائي اليومي للاستفادة من تأثيراتها الصحية (Chen *et al.*, 2016).

ازداد الاهتمام في السنوات الأخيرة بدراسة تأثير الغذاء على الصحة وقد نوهت الكثير من الأبحاث لاعتماد النظام الغذائي الغني بالخضار والفواكه وذلك بسبب ارتباط استهلاكه بانخفاض معدل الإصابة بالأمراض الالتهابية المزمنة ويُعتقد أنّ المركبات الفينولية المتواجدة في هذه الأغذية هي المسؤول الأكبر عن ذلك (Gutiérrez-Grijalva *et al.*, 2016). تمثل المركبات الفينولية المجموعة الأكبر من المستقلبات الثانوية التي تنتجها النباتات ويوجد أكثر من 8000 بنية من هذه المركبات جرى تحديدها حتى الآن (Tungmunnithum *et al.*, 2018). تُصنّف المركبات الفينولية إلى مجموعات عديدة ومتنوعة ومن أهمها الفلافونوئيدات والأحماض الفينولية ومركبات الليغنان بالإضافة إلى الكومارينات والتانينات (Kaurinovic and Vastag, 2019).يعرف عن المركبات الفينولية العديد من الفوائد الداعمة للصحة مثل تأثيراتها المضادة للأكسدة (Zhang and Tsao, 2016) وتأثيراتها المضادة للفيروسات (Kamboj *et al.*, 2012) وتأثيراتها المضادة للقرحة الهضمية (Rana and Gulliya, 2019) بالإضافة لدورها في دعم عمل الجهاز المناعي (Ding *et al.*, 2018). يتم استهلاك المركبات الفينولية عادةً ضمن النظام الغذائي وبسبب عدم

وجود دراسات كثيرة حول الفعالية المضادة للالتهاب للمركبات الفينولية المنتشرة في الأغذية (Dietary Phenolics) (Frontela-Saseta *et al*., 2013) يقدّم هذا البحث دراسة الفعالية المضادة للالتهاب للمركبات الفينولية ضمن الغذاء الطبيعي ممثلاً بعصائر الفواكه بالإضافة إلى تحضير خلاصات فينولية من هذه العصائر ودراسة فعاليتها المضادة للالتهاب وتم إنجاز هذا البحث في كلية الصيدلة بجامعة تشرين في الفترة الممتدة بين شهر آب 2017 وشهر شباط 2020.

أهمية البحث وأهدافه:

أهمية البحث: يبين هذا البحث أهمية الغذاء الوظيفي ممثلاً بعصائر الفواكه الطبيعية في العلاج والوقاية من الإصابة بالأمراض الالتهابية بالإضافة إلى تبيان أهمية المركبات الفينولية المتواجدة في الأغذية كمكونات وظيفية لها تأثير مضاد للالتهاب أكثر أماناً من مضادات الالتهاب اللاستيروئيدية

يهدف هذا البحث إلى تحديد سويات المركبات الفينولية في عصائر فواكه التوت الأسود والرمان والبرتقال الطبيعية والمتوفرة محلياً ثم دراسة فعاليتها المضادة للالتهاب اعتماداً على تركيز المركبات الفينولية فيها وذلك باستخدام طريقة تثبيط تمسخ الألبومين، كما يهدف البحث لتحضير خلاصات فينولية لهذه العصائر ودراسة فعاليتها المضادة للالتهاب ومن ثم المقارنة بين الفعالية المضادة للالتهاب للعصائر الثلاثة فيما بينها ومع خلاصاتها الفينولية الموافقة.

طرائق البحث ومواده:

المواد والتجهيزات المستخدمة: يوضح كل من الجدول (1) مجموعة من التجهيزات المخبرية المتواجدة في مخابر الكلية والتي استخدمت في هذه الدراسة كما يوضح الجدول (2) مجموعة المواد والمحلات المستعملة في الدراسة

الجدول (1): الأجهزة المستخدمة في الدراسة

الجهاز المستخدم	طراز الجهاز
ميزان ذو حساسية 0.0001 g	RADWAG, AS 220/C/2
حمام مائي Water bath Ultrasonic	K & H Industries
مقياس الطيف الضوئي Spectrophotometer	Jasco V-530 UV
فرن Oven	CARBOLITE
ميكروبيبت (10- 100 µl) و (1000 µl) Micropipette	Labkit (Chemelex,S.A.Spain)
حاضنة Incubator	JRAD

الجدول(2): المواد والمحلات المستخدمة في الدراسة

المادة	الشركة
كاشف (Folin-Denis)	Sigma- Aldrich, Switzerland
كربونات الصوديوم– Sodium Carbonate	BDH, England
حمض الغالي– Gallic acid	Biotech LTD
أسيتات الإيتيل – Ethyl acetate	CARLO ERBA
فوسفات أحادية الصوديوم– Sodium Dihydrogen Phosphate-2-Hydrate	Riedel-De Haen AG, Germany
فوسفات ثنائية الصوديوم– Di-Sodium Hydrogen Phosphate 12 Hydrate	Merck, Germany
كلور الصوديوم– Sodium Chloride	AVONCHEM
محلول ألبومين البيض الطازج	مستخلص من بيض طازج

تحضير المحاليل والكواشف

- **محلول العمل من كاشف Folin Denis:** يُحضر هذا المحلول بتمديد كاشف Folin Denis بالماء المقطر بنسبة 1:1
- **محلول كربونات الصوديوم 2%:** يحضر بوزن 0.5 g من كربونات الصوديوم ثم وضعها في بالون معايرة سعة 25 ml وإكمال الحجم بالماء المقطر حتى خط العيار.
- **سلسلة حمض الغالي العيارية:** حيث تم تحضير محاليل حمض الغالي وفق التراكيز التالية (0.1 – 0.2 – 0.4 – 0.5 – 0.6 g/l) ثم مزجها مع كاشف Folin-Ciocalteu وقياس امتصاصية كل محلول ثلاثة مرات، ثم حساب المتوسط الحسابي للامتصاصية (Asaad and Al Diab, 2015).
- **محلول ألبومين البيض الطازج:** حيث تم استخلاص ألبومين البيض من البيض الطازج وفق الطريقة التي ذكرها الباحث (Anderson, 2013). جرى بدايةً فصل الصفار عن البياض عبر كسر البيضة ثم تمرير الصفار بين جزئي البيضة مما يسمح للبياض بالتدفق إلى بيشر سعة 250 ml ثم إضافة 100 ml من الماء المقطر ببطء إلى البياض الموجود في البيشر ثم تحريك البياض stirring في جهاز حمام Ultrasonic (مجهز بالأمواج فوق الصوتية) لمدة 10 دقائق. يتشكل بعدها في أسفل البيشر راسب أبيض من الغلوبولين والذي يتم التخلص منه عبر الترشيح وجمع الرشاحة في أرلنماير سعة 100 ml وهي تحتوي محلول ألبومين البيض الطازج.
- **محلول وقاء الفوسفات الملحي Phosphate Saline Buffer pH= 6.4:** تم تحضيره بمزج 10 ml من محلول فوسفات أحادية الصوديوم 0.2 M (والذي حضر بوزن 0.78 g من فوسفات أحادية الصوديوم في بالون معايرة سعة 25 مل وأُكمل الحجم بالماء المقطر حتى خط العيار) و2.5 ml من محلول فوسفات ثنائية الصوديوم 0.2 M (والذي حضر بوزن 1.79 g من فوسفات ثنائية الصوديوم في بالون معايرة سعة 25 مل وأُكمل الحجم بالماء المقطر حتى خط العيار) وثم إضافة 2.25 g من ملح كلور الصوديوم إلى بالون معايرة سعة 25 ml ثم

إكمال الحجم بالماء المقطر حتى خط العيار ثم أُخذ 2.5 ml من المحلول النّاتج في بالون معايرة آخر سعة 25 ml وإكمال الحجم بالماء المقطر حتى خط العيار (Xu lab protocol and instructions, 2012).

طرائق البحث:

1-الاعتيان:

تضمنت عينات الدراسة ثلاثة أنواع من عصائر الفواكه الطبيعة المنتشرة في سورية وهي عصير التوت الأسود وعصير الرمان وعصير البرتقال حيث جُمعت عينات الفواكه في موسم إنتاجها من ريف محافظة طرطوس ومن ثم عصرها كما يظهر في الجدول (3). حُضّر العصير بدايةً عن طريق عصر الفواكه باستخدام عصارة يدوية منزلية ثم جرى ترشيح العصير الناتج، واستخدم العصير بعد الترشيح لتحديد تركيز المركبات الفينولية فيه وفق طريقة فولين سيوكالتو، كما تم تحضير خلاصة فينولية لكل نوع من أنواع العصائر الثلاثة.

الجدول (3): عينات الفواكه المدروسة وتصنيفها وتاريخ الحصول عليها

الاسم العربي	الاسم الإنكليزي	الاسم العلمي	الفصيلة	تاريخ الحصول عليها	مكان الحصول عليها
الرمان اللفاني	Pomegrante Lefan	*Punica Granatum*	Lythraceae	الشهر 2018/10	ريف طرطوس
برتقال أبو صرة	Navel Orange	*Citrus Sinensis*	Rutaceae	الشهر 2019/1	ريف طرطوس
توت أسود	Black Mulberry	*Morus Nigra*	Moraceae	الشهر 2019/5	ريف طرطوس

2-تحديد المحتوى الكلي من المركبات الفينولية في العصائر والخلاصات الفينولية:

جرى تحديد المحتوى الكلي من المركبات الفينولية في كل نوع من أنواع العصائر الثلاثة وخلاصته الفينولية وفق طريقة Folin-Ciocalteu التي ذكرها الباحثان Vermerris وNicholson (2006) مقارنةً بالسلسلة العيارية لحمض الغالي. تمت إضافة 2 ml من محلول كربونات الصوديوم اللامائية (w/v) 2% إلى 0.1 ml من الخلاصة أو العصير الممدد ثم مزجها جيداً والانتظار لمدة 5 دقائق. تلا ذلك إضافة 0.1 ml من كاشف Folin Denis الممدد بالماء المقطر وفق نسبة (1:1). تُرك المزيج الناتج بحرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة وبعد انتهاء المدة تمت قراءة امتصاصية العينات عند طول الموجة 750 nm. جرى في نفس الوقت تحضير blank للطريقة وذلك بتطبيق نفس الخطوات السابقة ولكن باستبدال 0.1 ml من العينة بـ 0.1 ml من الماء المقطر. وثم جرى حساب المحتوى الكلي من المركبات الفينولية بالاعتماد على السلسلة العيارية لحمض الغالي والتي تراوحت تراكيزها بين (0.1- 0.6 g/l) والتعبير عن النتائج بعدد غرامات حمض الغالي (Gallic Acid Equivalents GAE) المكافئة للمركبات الفينولية الموجودة في 1 ليتر من العصير أو الخلاصة حيث تم التحديد باستخدام جهاز سبيكتروفوتومتر.

3-استخلاص المركبات الفينولية من عصائر البرتقال والتوت والرمان:

يستخدم محل خلات الإيتيل ethyl acetate لاستخلاص المركبات الفينولية من عصائر الفواكه (Azar *et al.*, 1987; Al Asaad and Al Diab, 2015) وجرى استخلاص المركبات الفينولية من عصائر التوت الأسود والرمان والبرتقال من خلال ترشيح عينة العصير بدايةً ثم تسخين 8 ml منها ضمن بيشر في حمام مائي بحرارة 75°C ولمدة 30 دقيقة وذلك بهدف التخلص من حمض الأسكوربي (Al Asaad and Al Diab, 2015). تمت بعدها إضافة 16 ml من محل خلات الإيتيل Ethyl acetate ووضع المزيج ضمن حمام Ultrasonic لمدة 20– 30 دقيقة وذلك لتحسين انحلال المركبات الفينولية بالمحل. وُضع البيشر الحاوي على خلاصة المواد الفينولية في الفرن الكهربائي بحرارة 60 درجة مئوية لمدة 40– 60 دقيقة للتخلص من المحل. جُمعت البقية الجافة من الخلاصة في عبوة خاصة وتم تخزينها في الثلاجة بحرارة (-20 °C) حتى اليوم التالي من أجل القيام بتحديد تركيز المركبات الفينولية فيها ودراسة فعاليتها المضادة للالتهاب.

4–تحديد الفعالية المضادة للالتهاب وفق طريقة تثبيط تمسخ ألبومين البيض

أجري الاختبار وفق الطريقة المتبعة من قبل (Kumari *et al.*, 2015; Osman *et al.*, 2016) حيث أضيف لكل أنبوب اختبار 400 µl من محلول ألبومين البيض المستخلص من البيض الطازج، وتلا ذلك إضافة 1700 µl من وقاء الفوسفات الملحي ذو pH=6.4، وأخيراً أُضيف 400 µl من عينة العصير الممددة أو الخلاصة الفينولية الممددة بحيث تراوحت تراكيز المركبات الفينولية بعد التمديد بين (10– 60 µg/ml). حُضّر الشاهد السلبي في أنبوب اختبار باستبدال عينة العصير أو الخلاصة الفينولية بالماء المقطر بينما استخدم الإيبوبروفين كشاهد إيجابي في الطريقة حيث حُضّر وفق تراكيز تتراوح بين (10– 60 µg/ml). حُضن المزيج السابق بعدها في الحاضنة بحرارة 37 C° لمدة 15 دقيقة ثم تم تسخين المزيج في حمام مائي في درجة حرارة 70 C° لمدة حوالي 5 دقائق. بعد تبريد الأنابيب تمت قراءة امتصاصية العكارة المتشكلة عند طول الموجة 660 nm بحيث كان blank هو محلول التمديد (الوقاء الفوسفاتي). وتم حساب نسبة تثبيط تمسخ ألبومين البيض الطازج وفق العلاقة التالية:

$$\text{Percent inhibition} = \frac{\text{Abs control - Abs sample}}{\text{Abs control}} \times 100\%$$

حيث أنَّ:

Abs control: قيمة امتصاصية الشاهد السلبي.

Abs sample: الامتصاصية التي أظهرتها العينة سواء العصير أو الخلاصة الفينولية أو الشاهد الإيجابي (الإيبوبروفين).

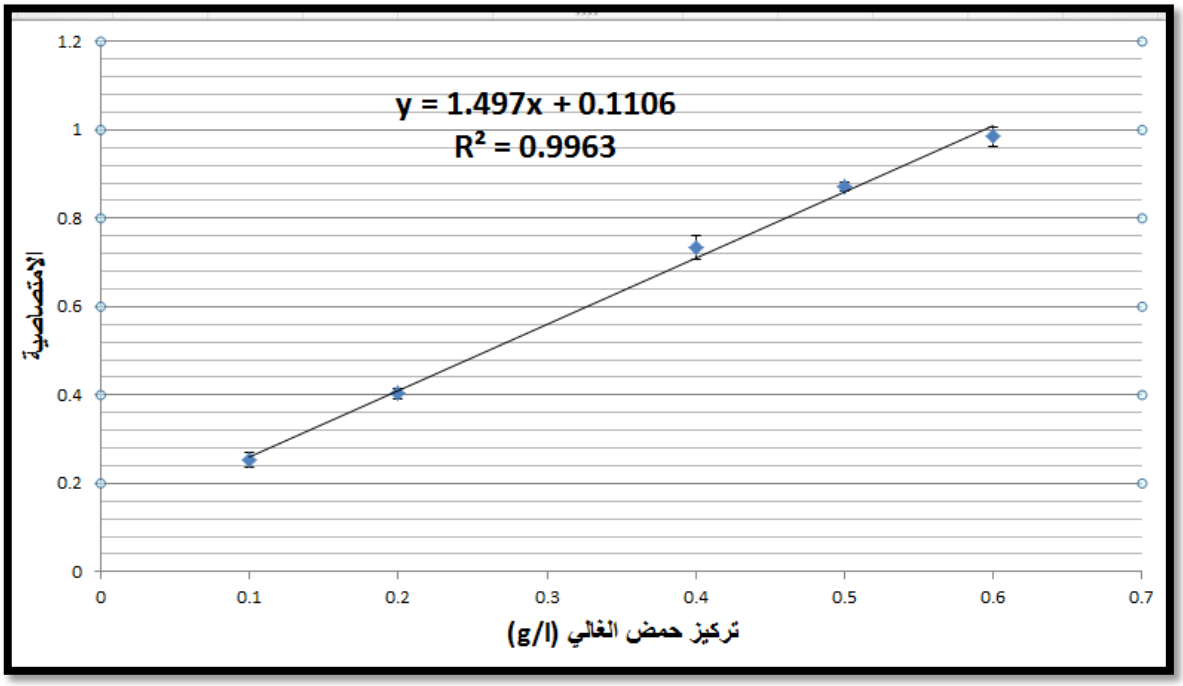
5–التحليل الإحصائي:

تم التعبير عن النتائج بالمتوسط الحسابي لثلاثة مكررات ± الانحراف المعياري. استخدمت برمجية Microsoft Excel 2016 لإجراء اختبار ستيودينت Students' t-test للتأكد من وجود فرق إحصائي هام بين النتائج المعبِّرة عن نسب التثبيط التي حققتها تراكيز المركبات الفينولية في عينات العصير والخلاصة والنتائج المعبرة عن نسب التثبيط التي حققها كل تركيز مماثل من الشاهد الإيجابي (الإيبوبروفين). تم الاعتماد على قيم p في تحديد وجود الفروق الهامة إحصائياً بحيث إذا كانت قيمة p أكبر من 0.05 فهذا يعني عدم وجود فرق إحصائي هام، أما إذا كانت قيمة p أصغر من 0.05 فهي تشير لوجود فرق إحصائي هام.

النتائج والمناقشة:

1-تحديد سويات المركبات الفينولية في العصائر

يستخدم عادةً حمض الغالي للتعبير عن المركبات الفينولية لذا جرى حساب المحتوى الكلي من المركبات الفينولية في العصائر الوظيفية وخلاصاتها الفينولية بالاعتماد على المعادلة الخطية للسلسلة العيارية لحمض الغالي والتي تراوحت تراكيزها بين (0.1– 0.6 g/l) والموضحة في الشكل (1).



الشكل (1): السلسلة العيارية لحمض الغالي المستخدمة في حساب المحتوى الكلي من المركبات الفينولية في العصائر الثلاثة وخلاصاتها الفينولية

يبين الجدول (4) تركيز المركبات الفينولية في كل من العصائر الطبيعية الثلاثة واحتوى عصير التوت الأسود على الكمية الأكبر من المركبات الفينولية مقارنة ببقية العصائر المدروسة وذلك بتركيز 3.024 g_{GAE}/l.أظهر عصير التوت الأسود أيضاً المحتوى الأعلى من المركبات الفينولية مقارنةً باثني عشر نوع من العصائر الطبيعية المتوفرة في سورية والذي تراوح بين (8.7 g_{GAE}/l و11.4 g_{GAE}/l) وفق دراسة (Al Asaad and Al Diab, 2015). احتوى عصير الرمان في الدراسة الحالية على 1.837 g_{GAE}/l من المركبات الفينولية. كان هذا المحتوى أعلى من النتائج التي حصل عليها الباحث Gözlekçi وزملاؤه في تركيا (2011) حيث تراوح تركيز المركبات الفينولية في عصائر الرمان العائدة لأنواع مختلفة بين (0.784– 1.551 g_{GAE}/l). كان محتوى عصير البرتقال من المركبات الفينولية في الدراسة الحالية 0.76 g_{GAE}/l. تتوافق هذه النتيجة مع دراسة (Rapisarda *et al.*, 1999) والتي أجريت على عصائر البرتقال الطازجة العائدة لأنواع مختلفة من البرتقال حيث تراوح تركيز المركبات الفينولية فيها بين (0.361– 1.147 g_{GAE}/l). إنَّ الاختلاف بالمحتوى بين المركبات الفينولية للعصائر الطبيعية الثلاثة في هذه الدراسة مقارنةً مع الدراسات الأخرى يعود إلى اختلاف الطرق التحليلية المستخدمة، أو إلى نوع محصول الفاكهة التي تم الحصول على

العصير منها بالإضافة إلى درجة نضج الفاكهة واختلاف الشروط البيئية التي تنمو بها بين منطقة وأخرى. (Akhavan *et al*., 2015).

الجدول (4): تركيز المركبات الفينولية في العصائر المدروسة

نوع العصير	تركيز المركبات الفينولية $SD \pm g_{GAE}/l$
عصير التوت الأسود	3.024 ± 0.08
عصير الرمان	1.837 ± 0.001
عصير البرتقال	0.760 ± 0.049

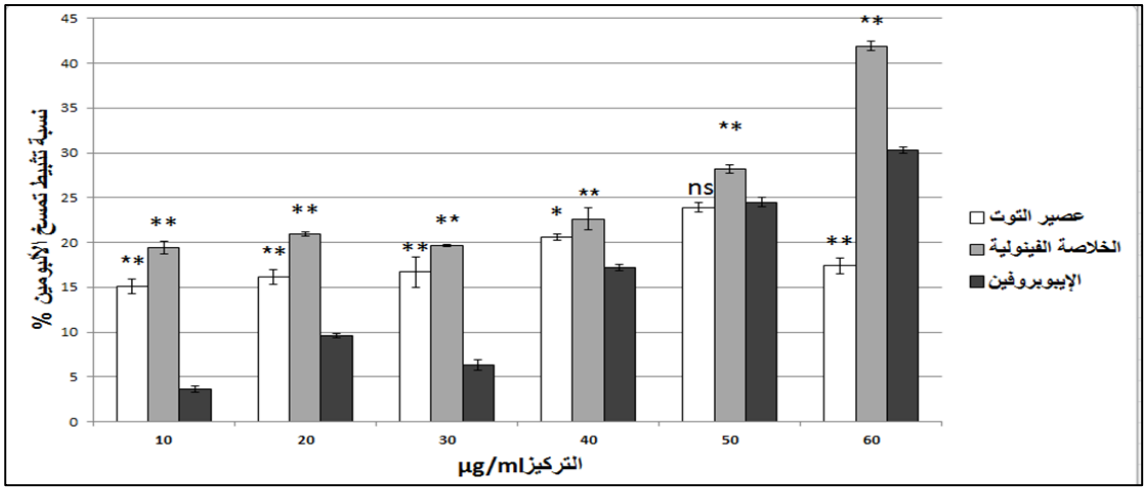
2-تحديد سويات المركبات الفينولية في الخلاصات الفينولية

استخدم محل خلات الإيتيل لاستخلاص المركبات الفينولية من هذه العصائر باعتباره مناسباً لاستخلاص المركبات الفينولية من العينات السائلة كعصائر الفواكه (de Simón *et al*., 1992). أبدت خلاصة عصير التوت الأسود المحتوى الأعلى من المركبات الفينولية بتركيز g_{GAE}/l 0.953 ثم تلتها خلاصة عصير الرمان بتركيز g_{GAE}/l 0.542 وأخيراً خلاصة عصير البرتقال بتركيز g_{GAE}/l 0.096 كما يظهر في الجدول (5). نلاحظ أنَّ تراكيز المركبات الفينولية في هذه الخلاصات أقل من تراكيزها في العصائر المقابلة لها. ويمكن تفسير هذا الانخفاض بتأثير شروط عملية الاستخلاص من حرارة وزمن وتأثيرها على المركبات الفينولية بالإضافة إلى احتمال حدوث استخلاص جزئي فقط للمركبات الفينولية. يتوافق ذلك مع دراسة بينت أنَّ محل خلات الإيتيل لا يحقق عادةً استخلاصاً كاملاً للمركبات الفينولية في طريقة الاستخلاص (سائل-سائل) رغم أنّه يعتبر المحل الأنسب لاستخلاص المركبات الفينولية ذات الأوزان الجزيئية العالية مثل الكاتشينات والأنتوسيانيدات (de Simón *et al*., 1990).

الجدول (5): تراكيز المركبات الفينولية في الخلاصات الفينولية

نوع الخلاصة الفينولية	تركيز المركبات الفينولية $SD \pm g_{GAE}/l$
خلاصة عصير التوت	0.953 ± 0.001
خلاصة عصير الرمان	0.542 ± 0.002
خلاصة عصير البرتقال	0.096 ± 0.001

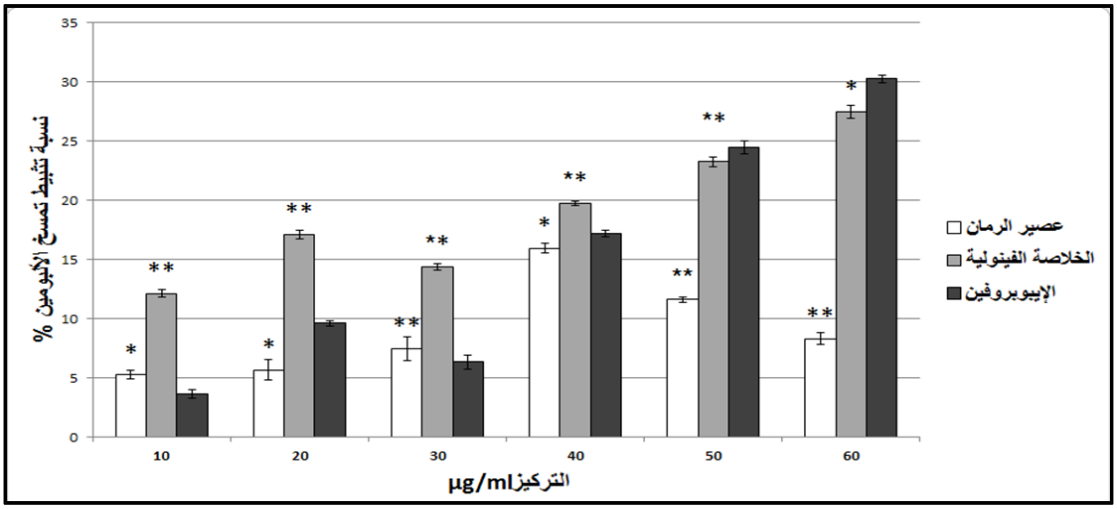
3-الفعالية المضادة للالتهاب لعصير التوت الأسود وخلاصته الفينولية



الشكل (2): نسب تثبيط تمسخ الألبومين لعصير التوت وخلاصته الفينولية (: فرق إحصائي هام (p<0.01)، *: فرق إحصائي هام (p<0.05)، ns: لا فرق إحصائي هام (p>0.05) وذلك مقارنةً بالإيبوبروفين)**

يبين الشكل (2) أنَّ عصير التوت الأسود ثبَّط تمسخ الألبومين المحرض بالحرارة بنسب تتراوح بين (15.12- 23.92%) محققاً أعلى نسبة تثبيط (23.92 %) عند تركيز المركبات الفينولية الموافق 50 µg/ml وهي تقارب نسبة التثبيط التي حققها الإيبوبروفين (24.47 %) مع عدم وجود فرق إحصائي بينهما عند هذا التركيز (p> 0.05). أظهرت الخلاصة الفينولية لعصير التوت الأسود نسب تثبيط تتراوح بين (19.40- 41.92%) محققةً أعلى نسبة تثبيط (41.92 %) عند تركيز المركبات الفينولية 60 µg/ml وكانت عند هذا التركيز أعلى من النسبة التي أظهرها الإيبوبروفين (30.26 %) مع وجود فرق إحصائي (p<0.05). تعود الفعالية المضادة للالتهاب لعصير التوت الأسود وخلاصته الفينولية إلى محتواها من الأنتوسيانيدات خاصةً Cyanidine-3-O- rutinoside وCyanidine-3-O-glucoside بالإضافة إلى فلافونول Rutin وهي المركبات الفينولية المسيطرة في العصير. أظهرت دراسة Chen وزملاؤه عام 2016 الفعالية المضادة للالتهاب لخلاصة فاكهة التوت الأسود حيث أدت الخلاصة إلى تخفيف وذمة الأذن المحرضة بالكزايلين ووذمة القدم المحرضة بالكاراجينان عند الجرذان، وقد بين تحليل الخلاصة الفينولية وجود أنتوسيانيدين فقط وهما Cyanidine-3-O- rutinoside و Cyanidine-3-O-glucoside بالإضافة إلى فلافانول Rutin، ولقد توصلت الدراسة أيضاً إلى أنَّ فاكهة التوت الأسود الغنية بالفلافونوئيدات تعد من أهم الأغذية الوظيفية المفيدة لصحة الإنسان.

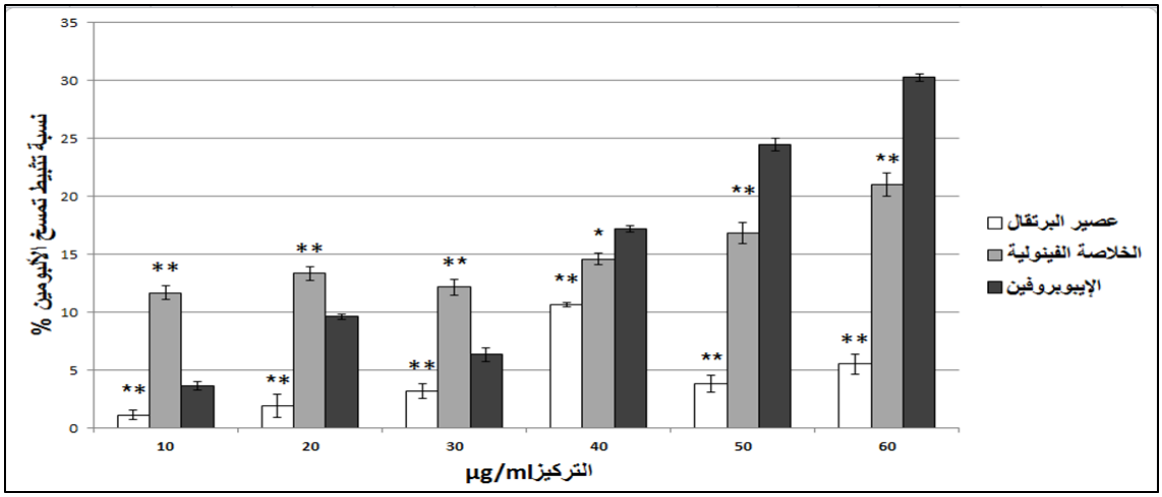
4-الفعالية المضادة للالتهاب لعصير الرمان وخلاصته الفينولية



الشكل (3): نسب تثبيط تمسخ الألبومين لعصير الرمان وخلاصته الفينولية (: فرق إحصائي هام (p<0.01)، *: فرق إحصائي هام (p<0.05) وذلك مقارنةً بالإيبوبروفين)**

حقق عصير الرمان نسب تثبيط جيدة لتمسخ الألبومين المحرض بالحرارة كما يظهر الشكل (6- 3)، وقد تراوحت بين (5.25- 15.95%) حيث كانت أعلى نسبة تثبيط (15.95%) عند تركيز المركبات الفينولية 40 µg/ml وكانت عند هذا التركيز أقل من النسبة التي حققها الإيبوبروفين (17.198 %) مع وجود فرق هام إحصائياً (p<0.05). أظهرت خلاصة عصير الرمان نسب تثبيط جيدة تراوحت بين (12.12-27.47%) محققةً أعلى نسبة تثبيط (27.47%) عند تركيز المركبات الفينولية 60 µg/ml، وكانت عند هذا التركيز أقل من نسبة التثبيط التي حققها الإيبوبروفين (30.26%) مع وجود فرق هام إحصائياً (p<0.05). تعود الفعالية المضادة للالتهاب لعصير الرمان وخلاصته الفينولية بشكل أساسي إلى ما تحتويه من مركبات الإيلاجي تانين Ellagitannins وخاصة مركب Punicalagin والذي يعد المركب الفينولي المسيطر في عصير الرمان (Adams et al., 2006; González-Trujano *et al.*, 2015). أظهرت إحدى الدراسات أنّ عصير الرمان بتركيز 50 mg/l قادر على تثبيط التعبير الجيني لبروتين COX-2 (السيكلواوكسيجيناز) المُحفز بالوسيط الالتهابي TNF-α (عامل التنخر الورمي) في خلايا الكولون السرطانية بنسبة 79% كما أظهرت الدراسة قدرة الخلاصة الفينولية لعصير الرمان (50 mg/l) الغنية بالتانينات على تحقيق نسبة تثبيط قدرها 55% ، في حين حقق مركب Punicalagin نسبة تثبيط قدرها 48% بالإضافة لقدرة عصير الرمان على تثبيط إشارة سبيل NF-kB (العامل النووي kB) المحفز للالتهاب (Adams *et al.*, 2006).

5-الفعالية المضادة للالتهاب لعصير البرتقال وخلاصته الفينولية



الشكل (4): نسب تثبيط تمسخ الألبومين لعصير البرتقال وخلاصته الفينولية (: فرق إحصائي هام ($p<0.01$)، *: فرق إحصائي هام ($p<0.05$) وذلك مقارنةً بالإيبوبروفين)**

أظهر عصير البرتقال نسب تثبيط لتمسخ الألبومين المحرَّض بالحرارة تتراوح بين (1.12- 10.68%) كما يظهر في الشكل (4) وقد كانت أعلى نسبة تثبيط (10.68%) عند تركيز 40 µg/ml من المركبات الفينولية وكانت أقل من نسبة التثبيط التي سببها الإيبوبروفين (17.198%) عند ذات التركيز مع وجود فرق هام إحصائياً ($p<0.05$) وكان من الملاحظ أيضاً أنّ نسب التثبيط التي حققها العصير كانت أقل من نسب التثبيط التي سببها الإيبوبروفين عند كل التراكيز المشمولة في الدراسة الحالية. تراوحت نسب التثبيط التي حققتها خلاصة عصير البرتقال بين (11.69-21%) وأظهرت أعلى نسبة تثبيط (21 %) عند تركيز المركبات الفينولية الموافق 60 µg/ml وكانت أقل من النسبة التي حققها الإيبوبروفين (30.269 %) عند نفس التركيز مع وجود فرق هام إحصائياً ($p<0.05$). تعود الفعالية المضادة للالتهاب التي يتمتع بها عصير البرتقال إلى الفلافونوئيدات المتواجدة فيه وخاصة الهيسبيريدين والنارينجين في حين لم يظهر حمض الأسكوربي هذه الفعالية وذلك وفق دراسة (Ghanim *et al.*, 2007). بينت دراسة أخرى تأثير عصير البرتقال على سويات CRP (وهو بروتين يرتبط بحدوث حالة التهابية ويجب ألا يتجاوز تركيزه في الدم 0.3 mg/dL) وقد وجدت الدراسة أن عصير البرتقال قد خفض سويات CRP بنسبة 52% عند الأشخاص ذوي الوزن الطبيعي، وبنسبة 66% عند الأشخاص ذوي الوزن الزائد، بالإضافة لخفض تراكيز وسائط التهابية أخرى مثل TNF-α (Dourado and Cesar, 2015).

6-المقارنة بين الفعالية المضادة للالتهاب للعصير والخلاصة الفينولية

إنَّ قدرة كل من العصائر الوظيفية الثلاثة وخلاصاتها الفينولية على تثبيط تمسخ ألبومين البيض الطازج يوجه لامتلاكها فعالية مضادة للالتهاب، ويمكن تفسير ذلك بسبب حدوث ارتباط للفلافونوئيدات والتانينات مع المنطقة الأليفاتية من الألبومين التي تضم ثمالة حمض الليزين و ثمالات حمض التيروزين. حيث أظهر الرنين النووي المغناطيسي أحادي البعد وثنائي البعد للبروتين أنّ العوامل التي لها قدرة على تثبيط تمسخ بروتين الألبومين ترتبط بهذين الموقعين، وذلك لأنّ الارتباط مع ثمالة الليزين يثبط تحفيزها للجذور الحرة من أنواع الأوكسجين التفاعلية المساهمة في حدوث الالتهاب في حين أنّ الارتباط مع ثمالات التيروزين يساهم في تحرر السيتوكينات المضادة للالتهاب(Williams *et al.*,

2002). من الملاحظ أنَّ الخلاصة الفينولية لكل نوع من أنواع العصائر الثلاثة قد أبدت نسب تثبيط أعلى من العصير الوظيفي المقابل لها عند نفس التركيز من المركبات الفينولية ويمكن أن يعود ذلك لاحتمال أن تحتوي الخلاصة على المركبات الفينولية ذات القدرة الأعلى على تحقيق الفعالية المضادة للالتهاب. من جهة ثانية يعد العصير وسطاً غذائياً معقداً بالتالي يمكن أن يمنع وجود السكر أو الأحماض العضوية فيه ارتباط كامل المركبات الفينولية مع مواقع ارتباطها في الألبومين وبالتالي فعالية مضادة للالتهاب أقل بالنسبة للعصير. أشارت العديد من الدراسات إلى أنّ فعالية الخلاصات الفينولية أكبر من فعالية العصائر الطبيعية التي استخلصت منها فعلى سبيل المثال قارنت إحدى الدراسات الفعالية المضادة للأكسدة لعصير التوت الأسود مع الخلاصة الفينولية عند التركيز نفسه وأظهرت الخلاصة الفينولية فعالية مضادة للأكسدة أعلى بكثير من العصير وفسرت النتيجة بأنَّ الخلاصة يمكن أن تحتوي على كميات أكبر من مجموعات الهيدروكسيل التي تساهم بالفعالية المضادة للأكسدة (Naderi *et al.*, 2004).

7- علاقة تركيز المركبات الفينولية بالفعالية المضادة للالتهاب

لوحظ في الدراسة الحالية عدم وجود تناسب طردي بين تراكيز المركبات الفينولية (10- 60 µg/ml) ونسب التثبيط التي حققتها ويمكن أن يعود ذلك للتداخل الذي حصل بين المركبات الفينولية و الوسط الحيوي المستخدم في التجربة (محلول الألبومين الطازج) وقد عزت إحدى الدراسات المرجعية حالة عدم التناسب بين التركيز والاستجابة عند استخدام الأوساط الحيوية إلى عدة مركبات مثل المعادن الثقيلة و المضادات الحيوية ومبيدات الأعشاب وكذلك المركبات الفينولية (Nweke and Ogbonna, 2017). تم تسجيل حالة عدم التناسب الطردي بين تركيز المركبات الفينولية والاستجابة (الفعالية المضادة للالتهاب) في دراسات عديدة اعتمدت طريقة تثبيط تمسخ الألبومين حيث أظهرت دراسة أنّ الخلاصة المائية لجذور نبات السيزية Syzygium caryophyllatum بتراكيز (781.25- 1562.5- 3125- 6250- 12500 µg/ml) حققت نسب ثبيط تمسخ للألبومين توافق (35-24-42-109-176%) على الترتيب وقد عزت الدراسة الفعالية المضادة للالتهاب للخلاصة إلى محتواها من الفلافونوئيدات (Heendeniya et *al.*, 2018). في دراسة أخرى أيضاً جرى تحديد الفعالية المضادة للالتهاب للخلاصة الفينولية لأوراق نبات Canthium Parviflorum بتراكيز (1- 100- 200- 500 µg/ml) وأبدت نسب تثبيط تمسخ الألبومين التالية (67.5- 46.6- 23.7- 12.2 %) على الترتيب وقد استخدم الإيبوبروفين كشاهد إيجابي في ذات الدراسة وحقق نسبة تثبيط 71.89% عند تركيز 100 µg/ml (Karthik *et al.*, 2013). لوحظ أيضاً تناقص في نسب تثبيط تمسخ الالبومين مع ازدياد التركيز في دراسة (Tatti *et al.*, 2012) والتي جرى فيها تحديد الفعالية المضادة للالتهاب لمركب حمض الهيبوغاليك المعزول من شجرة BUTEA MONOSPERMA وقد حضر بتراكيز (1- 10- 20- 30 µg/ml) وحققت هذه التراكيز نسب تثبيط توافق (85.68- 47.04- 32.92- 21.55 %) على الترتيب وإنَّ إظهار نسبة تثبيط عالية بتراكيز قليلة قد يشير لفعالية جيدة للمركب كمضاد التهاب وقد فُسّرَ ذلك بسبب البنية الفينولية لهذا المركب. إنّ عدم التناسب الطردي بين الجرعة والاستجابة شمل أيضاً الإيبوبروفين في دراسات استخدمته كشاهد إيجابي في التجربة فمثلاً قام الباحث Dharmadeva وزملاؤه (2018) باستخدام الإيبوبروفين كشاهد إيجابي في دراسة الفعالية المضادة للالتهاب للخلاصة المائية للحاء شجرة التين باستخدام طريقة تثبيط تمسخ الالبومين وحُضر الإيبوبروفين بتراكيز

(0.01− 0.1− 1− 10− 100− 1000 µg/ml) وحقق نسب تثبيط لتمسخ الالبومين توافق (15.3− 12.09− 11.71− 11.29− 12.16− 9.77 %) على الترتيب.

الاستنتاجات والتوصيات:

الاستنتاجات:

- أعطى عصير التوت الأسود وخلاصته الفينولية الفعالية الأعلى كمضاد للالتهاب ثم تلاه عصير الرمان وخلاصته الفينولية وبعدها عصير البرتقال وخلاصته الفينولية وذلك عند القياس وفق طريقة تثبيط تمسخ الالبومين مقارنة بالشاهد الإيجابي (الإيبوبروفين)
- لم تتحقق علاقة (تركيز− استجابة) عند دراسة الفعالية المضادة للالتهاب للمركبات الفينولية وفق طريقة تثبيط تمسخ الألبومين.
- استخلاص ألبومين البيض الطازج مخبرياً والاستفادة منه في دراسة الفعالية المضادة للالتهاب للمركبات الطبيعية وفق طريقة تثبيط تمسخ الألبومين.

التوصيات:

- ضرورة جعل عصائر الفواكه الطبيعية ضمن النظام الغذائي اليومي وخاصة تلك الغنية بالمركبات الفينولية وذلك من أجل الوقاية من الإصابة بالأمراض الالتهابية المزمنة.
- متابعة الدراسة على أنواع أخرى من عصائر الفواكه المتوفرة محلياً والغنية بالمركبات الفينولية.

References:

1. ADAMS, L. S., SEERAM, N. P., AGGARWAL, B. B., TAKADA, Y., SAND, D., & HEBER, D. *Pomegranate juice, total pomegranate ellagitannins, and punicalagin suppress inflammatory cell signaling in colon cancer cells*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54(3), 2006, 980-985.
2. AKHAVAN, H., BARZEGAR, M., WEIDLICH, H., & ZIMMERMANN, B. F. *Phenolic compounds and antioxidant activity of juices from ten Iranian pomegranate cultivars depend on extraction*. Journal of Chemistry. J Chem, 2015, 7.
3. Al Asaad, N., & Al Diab, D. *Determination of Phenolic Compounds Levels and Their Antioxidant Activity in Some Local Functional Juices*. Tishreen University Journal for Studies and Scientific Research- Health Sciences Series. Vol (73) No (1) 2015, 237-250.
4. ANDERSON, J.N. *Chromatographic separation of proteins*. MODERNBIO. 2013.
5. AZAR, M., VERETTE, E., & BRUN, S. *Identification of some phenolic compounds in bilberry juice Vaccinium myrtillus*. Journal of food science, 52(5), 1987, 1255-1257.
6. CAI, C., CHEN, Y., ZHONG, S., JI, B., WANG, J., BAI, X., & SHI, G. *Anti-inflammatory activity of N-butanol extract from Ipomoea stolonifera in vivo and in vitro*. PloS one, 9(4), 2014, e95931.
7. CHEN, H., PU, J., LIU, D., YU, W., SHAO, Y., YANG, G., . . . HE, N. *Anti-inflammatory and antinociceptive properties of flavonoids from the fruits of black mulberry (Morus nigra L.)*. PloS one, 11(4), 2016, e0153080.
8. CHEN, L., DENG, H., CUI, H., FANG, J., ZUO, Z., DENG, J., . . . ZHAO, L.. *Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs*. Oncotarget, 9(6), 2018, 7204

9. DE SIMÓN, B. F., PÉREZ-ILZARBE, J., HERNÁNDEZ, T., GÓMEZ-CORDOVÉS, C., & ESTRELLA, I. *HPLC study of the efficiency of extraction of phenolic compounds*. Chromatographia, 30(1-2), 1990, 35-37.

10. DE SIMÓN, B. F., PÉREZ-ILZARBE, J., HERNÁNDEZ, T., GÓMEZ-CORDOVÉS, C., & ESTRELLA, I. Importance of phenolic compounds for the characterization of fruit juices. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1992. 40(9): p. 1531-1535.

11. DING, S., JIANG, H., & FANG, J. *Regulation of immune function by polyphenols*. Journal of immunology research, vol. 2018, Article ID 1264074,2018, 8 pages,.

12. DOURADO, G. K., & CESAR, T. B. *Investigation of cytokines, oxidative stress, metabolic, and inflammatory biomarkers after orange juice consumption by normal and overweight subjects*. Food & nutrition research, 59(1), 2015, 28147.

13. FRONTELA-SASETA, C., LÓPEZ-NICOLÁS, R., GONZÁLEZ-BERMÚDEZ, C. A., MARTÍNEZ-GRACIÁ, C., & ROS-BERRUEZO, G. *Anti-inflammatory properties of fruit juices enriched with pine bark extract in an in vitro model of inflamed human intestinal epithelium: The effect of gastrointestinal digestion*. Food and chemical toxicology, 53, 2013, 94-99.

14. GHANIM, H., MOHANTY, P., PATHAK, R., CHAUDHURI, A., SIA, C. L., & DANDONA, P. *Orange juice or fructose intake does not induce oxidative and inflammatory response*. Diabetes care, 30(6), 2007, 1406-1411.

15. GONZÁLEZ-TRUJANO, M. E., PELLICER, F., MENA, P., MORENO, D. A., & GARCÍA-VIGUERA, C. *Antinociceptive and anti-inflammatory activities of a pomegranate (Punica granatum L.) extract rich in ellagitannins*. International journal of food sciences and nutrition, 66(4), 2015, 395-399.

16. GÖZLEKÇI, Ş., SARAÇOĞLU, O., ONURSAL, E., & ÖZGEN, M. *Total phenolic distribution of juice, peel, and seed extracts of four pomegranate cultivars*. Pharmacognosy Magazine, 7(26), 2011, 161.

17. GRANT, N. H., ALBURN, H. E., & KRYZANAUSKAS, C. *Stabilization of serum albumin by anti-inflammatory drugs*. Biochemical pharmacology, 19(3), 1970, 715-722.

18. GUTIÉRREZ-GRIJALVA, E. P. *1. Review: dietary phenolic compounds, health benefits and bioaccessibility*. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, , 2016, 66.2.

19. HEENDENIYA, S., RATNASOORIYA, W., & PATHIRANA, R. *In vitro investigation of anti-inflammatory activity and evaluation of phytochemical profile of Syzygium caryophyllatum.* Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 7 (1),2018, pp. 1759-1763

20. KAMBOJ, A., SALUJA, A. K., KUMAR, M., & ATRI, P. *Antiviral activity of plant polyphenols*. J Pharm Res, 5(5), 2012, 2402-2412.

21. KARTHIK K, BHARATH R, KUMAR P, PRIYA VR, KUMAR SK, RATHORE RSB .*Evaluation of anti-inflammatory activity of Canthium parviflorum by in-vitro method*. Ind J Res Pharm Biotechnol 1(5), 2013,729–731

22. KAURINOVIC, B., & VASTAG, D. *Flavonoids and Phenolic Acids as Potential Natural Antioxidants*: IntechOpen.2019.

23. KUMARI, C. S., YASMIN, N., HUSSAIN, M. R., & BABUSELVAM, M. *invitro anti-inflammatory and anti-arthritic property of rhizopora mucronata leaves*. Int J Pharma Sci Res, 6(3), 2015, 482-485.

24. MIZUSHIMA, Y., & KOBAYASHI, M. *Interaction of anti-inflammatory drugs with serum proteins, especially with some biologically active proteins*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 20(3), 1968, 169-173.

25. NADERI, G. A., ASGARY, S., SARRAF-ZADEGAN, N., OROOJY, H., & AFSHIN-NIA, F. *Antioxidant activity of three extracts of Morus nigra. Phytotherapy Research*: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives, 18(5), 2004, 365-369.

26. NWEKE, C. O., & OGBONNA, C. J. *Statistical models for biphasic dose-response relationships (hormesis) in toxicological studies*. Ecotoxicology and Environmental Contamination, 12(1), 2017, 39-55.

27. OPIE, E. L. *On the relation of necrosis and inflammation to denaturation of proteins*. Journal of Experimental Medicine, 1962, 115(3), 597-608.

28. OSMAN, N. I., SIDIK, N. J., AWAL, A., ADAM, N. A. M., & REZALI, N. I. *In vitro xanthine oxidase and albumin denaturation inhibition assay of Barringtonia racemosa L. and total phenolic content analysis for potential anti-inflammatory use in gouty arthritis*. Journal of intercultural ethnopharmacology, 5(4), 2016, 343.

29. RANA, A. C., & GULLIYA, B. *Chemistry and pharmacology of flavonoids-A review*. Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research, 53(1), 2019, 8-20.

30. RAPISARDA, P., TOMAINO, A., LO CASCIO, R., BONINA, F., DE PASQUALE, A., & SAIJA, A. *Antioxidant effectiveness as influenced by phenolic content of fresh orange juices*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47(11), 1999, 4718-4723.

31. SULEYMAN, H., DEMIRCAN, B., & KARAGOZ, Y. *Anti-inflammatory and side effects of cyclo-oxygenase inhibitors*. Pharmacological reports, 59(3), 2007, 247.

32. TATTI, P. N., ANITHA, S., SHASHIDHARA, S., DEEPAK, M., & BIDARI, S. *Evaluation of in-vitro anti-denaturation activity of isolated compound of Butea monosperma bark*. Pharm Sci Monitor, 3, 2012, 2314-2320.

33. TUNGMUNNITHUM, D., THONGBOONYOU, A., PHOLBOON, A., & YANGSABAI, A. *Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical aspects: An overview*. Medicines, 5(3), 2018, 93.

34. VERMERRIS, W.,NICHOLSON,R. *Phenolic Compound Biotchemistry*. Springer, The Netherlands, 2006, 276.

35. WILLIAMS L, O'CONNAR A, LATORE L, DENNIS O, RINGER S, WHITTAKER JA, ET AL. *The in vitro anti-denaturation effects induced by natural products and non-steroidal compounds in heat treated (immunogenic) bovine serum albumin is proposed as a screening assay for the detection of anti-inflammatory compounds, without the use of animals, in the early stages of the drug discovery process*. West Indian Med J , 57, 2008; 327-331.

36. WILLIAMS, L., VASQUEZ, E., MILAN, P., ZEBITZ, C., & KRAUS, W. *In vitro anti-inflammatory and antimicrobial* activities *of phenylpropanoids from Piper betle L.(Piperaceae) Natural Products in the New Millennium*: Prospects and Industrial Application ,2002, (pp. 221-227): Springer.

37. Xu, S. *Phosphate Buffer (PB) or Phosphate Buffered Saline (PBS)*. (2012). Retrieved from http://xulab.anat.uci.edu/Resources/PBS_solutions

38. ZHANG, H., & TSAO, R. *Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects*. Current Opinion in Food Science, 8, 2016, 33-42.