Determination of the free radical scavenging activity of the aqueous extracts of some abundant plants in the Syrian coast in order to use as reductants in green chemistry.

Dr. Mohammed Kousara [*]
Dr. Faten Sliman [**]
Dima Depp [***]

(Received 27 / 4 / 2021. Accepted 16 / 11 / 2021)

□ ABSTRACT □

Green chemistry has had a lot of attention in recent years, and searching for green agents has become a need. Plants have always been a renewable reservoir of active ingredients, especially polyphenols that are famous for their antioxidant effect. We studied the reducing capacity of the aqueous extracts of some abundant plants in the Syrian coast (Citrus sinensis peels, Citrus limone peels, Olea europea leaves, Laurus nobilis leaves). The scavenging activity of the DPPH (2,2 diphenyl 1, picrylhydrazyl) free radical was measured for the four extracts. All extracts showed a good antioxidant activity and significant differences between them were observed. Bay and olive leaves extracts were superior to the other extracts, so we calculated their (IC_{50}) concentration; there was no significant differences between the two extracts. Results were discussed according to the chemical structure of the most abundant polyphenols in each extract and structure-activity relationship. To sum up, all four aqueous extracts may be considered as good green reductants mainly bay and olive leaves extracts.

Keywords: Green chemistry, aqueous extract, DPPH test, polyphenols, green reductants.

***Assistant Professor, Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Quality Control- Faculty of Pharmacy- Thishreen University- Lattakia- Syria**mohammad.kousara@outlook.com**

[**]**Assistant Professor, Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Quality Control- Faculty of Pharmacy- Tartous University- Syria. fatensliman@tartous-univ.edu.sy**

[***]**Postgraduate student- Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Quality Control- Faculty of Pharmacy- Tishreen University- Syria. dima.m.deeb@tishreen.edu.sy**

تحديد القدرة الكانسة للجذور الحرّة للخلاصات المائيّة لبعض النّباتات المنتشرة في السّاحل السّوري بهدف استخدامها كمُرجِعات في الكيمياء الخضراء.

د. محمد قوصرة*

د. فاتن سليمان**

ديما ديب***

(تاريخ الإيداع 27 / 4 / 2021. قُبِل للنشر في 16 / 11 / 2021)

□ ملخّص □

تزايد الاهتمام مؤخراً بالكيمياء الخضراء وأصبح البحث عن بدائل للمواد الضارّة للبيئة حاجةً لابدّ منها، وهنا ظهرت النباتات كمصدر متجدّد للمواد الفعّالة وخاصة عديدات الفينول المعروفة بخواصها المُضادة للأكسدة. قمنا في هذه الدراسة بقياس التأثير المُرجِع للخلاصات المائيّة لنباتات متوفرة في البيئة الساحليّة السوريّة (قشور البرتقال، قشور الليمون، أوراق الزيتون، أوراق الغار). تمّ تحديد القدرة الكانسة لجذر DPPH (2,2 diphenyl 1, picrylhydrazyl) للخلاصات الأربعة، وأظهرت النتائج تمتّع الخلاصات المائيّة للنباتات الأربعة بخواص جيدة مضادة للأكسدة، مع وجود فروق إحصائيّة هامّة فيما بينها. تفوّقت كل من خلاصتي الغار والزيتون على الخلاصات الأخرى، لذلك قمنا بحساب التركيز الكانس لنصف كميّة الجذور الحرّة (IC_{50}) لكل منهما، ولم يظهر الحساب وجود فروق إحصائية معنويّة بينهما. تمّ تفسير النتائج بالعودة للبنية الكيميائية لعديدات الفينول الأساسية في كل خلاصة واعتماداً على علاقة البنية بالتأثير. باختصار، يمكننا اعتبار الخلاصات المائيّة للنباتات الأربعة مُرجعات خضراء جيدة وبشكل خاص خلاصتي الزيتون والغار.

الكلمات المفتاحيّة: كيمياء خضراء، خلاصات مائية، اختبار DPPH، عديدات الفينول، مرجعات خضراء.

* مدرس – قسم الكيمياء الصيدليّة والمراقبة الدوائيّة– كلية الصيدلة –جامعة تشرين – سورية. mohamad.kousara@outlook.com

**مدرس – قسم الكيمياء الصيدليّة والمراقبة الدوائيّة– كلية الصيدلة – جامعة طرطوس– سورية. fatensliman@tartous-univ.edu.sy

***طالبة دراسات عليا – قسم الكيمياء الصيدليّة والمراقبة الدوائيّة– كليّة الصيدلة – جامعة تشرين– سورية. dima.m.deeb@tishreen.edu.sy

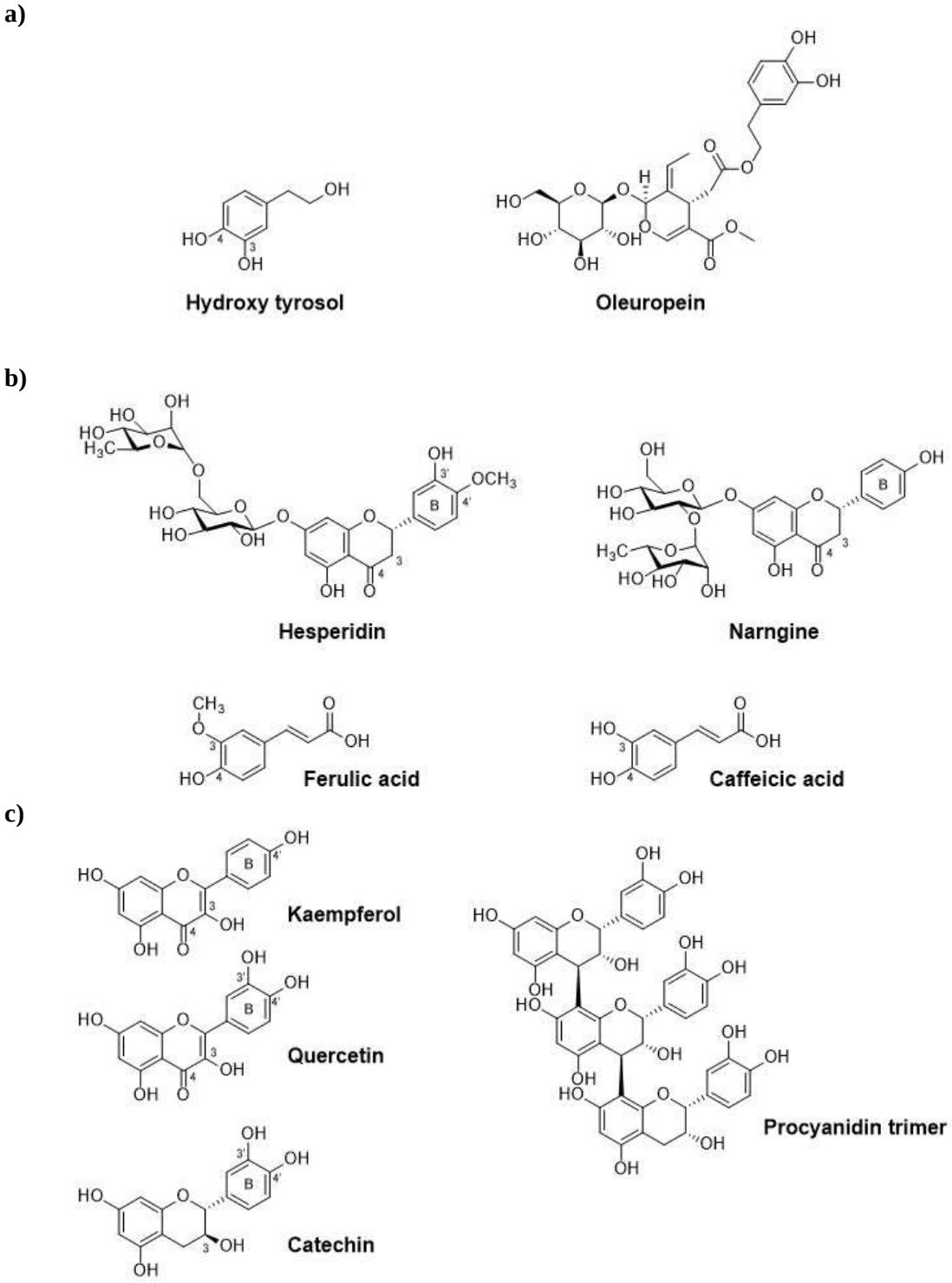
مقدّمة

تعرّف "الكيمياء الخضراء" حسب الجمعيّة الأمريكيّة للكيمياء American Chemical Society (ACS) بأنّها طريقة مختلفة للتفكير بالتّفاعلات الكيميائيّة بهدف تقليص النّفايات، حفظ الطّاقة، وحماية البيئة بالإضافة لاستخدام الموارد المتجدّدة ومحلات أكثر أماناً. تعتبر الكيمياء الخضراء من العلوم الحديثة، كما تتضمّن أبحاثها مجالات متعددة منها الكيمياء التحليلية، الاصطناع الكيميائي، تصميم مركبات آمنة، التحفيز الكيميائي، وغيرها من المجالات التي يمكن الاطلاع عليها على موقع ACS الالكتروني (1، 2).

يتضمن مصطلح " الإرجاع الأخضر" كل من أسلوبي الإرجاع الكيميائي وغير الكيميائي، يتبّع الإرجاع غير الكيميائي أساليباً متعددةً تعتمد على الحرارة والأشعة فوق البنفسجيّة، فيما يعتمد الإرجاع الكيميائي على استخدام عوامل مُرجعة متنوعة، ويترافق استخدام العوامل المُرجعة التقليديّة (كالهيدرازين مثلاً) مع مشاكل عديدة كالآثار السميّة للمادة نفسها أو لنواتجها الثانويّة على مستوى صحة الإنسان والبيئة، إضافةً للتكاليف الزّائدة نتيجة الحاجة لتجهيزات خاصّة للتّعامل مع هذه المواد. من هنا جاءت الحاجة لإيجاد بدائل مناسبة وتمّ تقديم عدد من العوامل المرجعة الخضراء خلال العقود السابقة، كالخلاصات النباتيّة، الأحياء الدقيقة، الأحماض الأمينيّة والبروتينات، السكاكر، والأحماض العضويّة (3، 4).

تمثّل النّباتات مخزناً كبيراً للمواد الفعّالة حيويّاً والتي ما زالت قيد الاكتشاف، وتشمل عديدات الفينول مجموعةً كبيرةً من المركبات ينتمي إليها حوالي 10000 مركباً مختلفاً، وهي تتكوّن من حلقة عطريّة واحدة أو أكثر تحمل مجموعتي هيدروكسيل على الأقل، وتشكّل الفلافونوئيدات والأحماض الفينوليّة أكثر عديدات الفينول انتشاراً. تعتبر عديدات الفينول مستقلباتٍ ثانويةً تصنّعها النّباتات كوسيلةٍ دفاعيةٍ ضد العوامل الخارجيّة التي تتعرض لها كالجذور الحرّة، الأشعة فوق البنفسجيّة، والعوامل الممرضة، وتملك هذه المركبات خصائص وتأثيراتٍ فيزيولوجيةً مميزةً أهمّها قدرتها الإرجاعيّة وألفتها العالية للمجموعات الحاوية على الأكسجين (5)، الأمر الذي لفت انتباه الباحثين إليها وأدى إلى نشر العديد من الأوراق البحثيّة عن استعمال الخلاصات النباتيّة في عمليّات اصطناع مواد نانويّة بوصفها عوامل مرجعةٍ صديقةٍ للبيئة، كجزيئات الفضة النانويّة المحضرة بواسطة خلاصات كحوليّة لشجرة الباولونيا (6)، أوراق الأوكاليبتوس، ماء الورد، أوراق الشاي الأخضر، كبش القرنفل وغيرها التي استخدمت في اصطناع الغرافين (7−10)، و عصير البرتقال الذي استعمل لاصطناع جزيئات ذهب نانويّة (11).

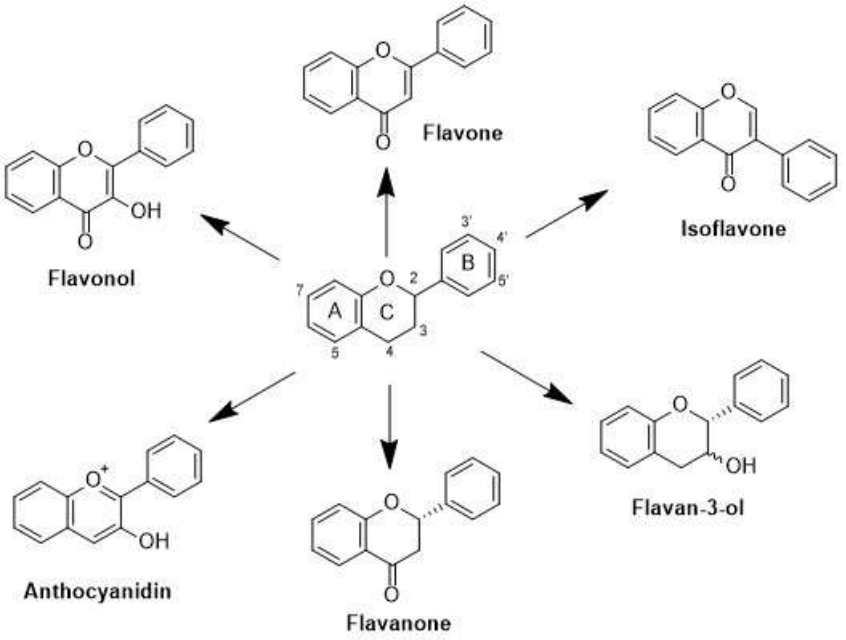
يشتهر حوض البحر المتوسط عموماً والبيئة الساحليّة السورية خصوصاً بزراعة الزّيتون والحمضيّات، كما تعتبر الموطن الأصليّ للغار النّبيل. تُعرف هذه النّباتات بغناها بعديدات الفينول وتتّفق الدّراسات على هويّة الفلافونوئيد الرئيسي في كل خلاصة إذ تحتوي خلاصة أوراق الزيتون على الأوليوروبين الذي يتفكك ليعطي الهيدروكسي تيروزول، بينما تحتوي كل من خلاصتي قشور الليمون والبرتقال على الهيسبيريدين والنارنجين بالإضافة لحمض القهوة وحمض الفيروليك، أمّا خلاصة أوراق الغار فتكون غنيّة بمشتقات الكامفيرول، مشتقات الكيرستين، ومشتقات الكاتشين، الشكل (1). ومن هنا جاءت فكرة دراسة القدرة الإرجاعيّة لخلاصات مائيّة لبعض الأجزاء النباتيّة المتجدّدة لتلك النباتات (أوراق الغار والزيتون، قشور الليمون والبرتقال) والتي تعتبر مخلّفات ثانويّة في بعض الصّناعات حيث يمكن إعادة تدويرها واستخدامها كعوامل مرجعة خضراء في عمليّات الاصطناع (12−15).



الشكل (1): الصيغ الكيميائيّة للمركبات الفينولية المتواجدة في خلاصة a) أوراق الزيتون، b) قشور الليمون والبرتقال، c) أوراق الغار

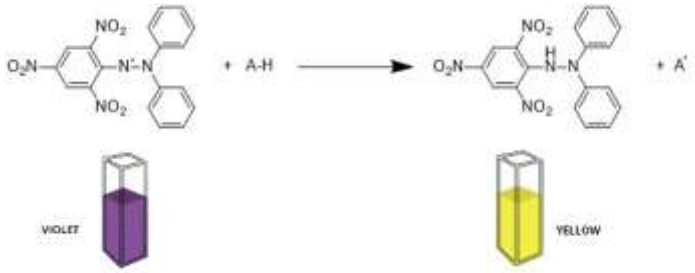
تعتبر الفلافونوئيدات من أشيع عديدات الفينول النّباتيّة، وهي تتألف من 15 ذرة كربون، وتتكوّن بنيتها الكيميائيّة بشكل أساسيّ من حلقتين عطريتين تصل بينهما حلقة بيران، الشكل (2). تملك الفلافونوئيدات خواصاً مُرجعة حيث تعمل

كمضادات أكسدة عن طريق كنس الجذور الحرّة، وتلعب البنية الكيميائيّة للمركب الفلافونوئيديّ دوراً هامّاً في تحديد قدرته المضادة للأكسدة، فهي تتأثر بعدة نقاط أهمّها: موقع وعدد مجموعات الهيدروكسيل (OH) في المركب ككل (على الحلقة B بشكل خاص، والموقع (3) من الحلقة C)، وجود رابطة مضاعفة بين ذرات الكربون في الموقعين (2–3)، بالإضافة لوجود مجموعة كربونيل في الموقع (4). تلعب المتبادلات الهيدروكسيلية من بين البنى السّابقة الدّور الأساسيّ المسؤول عن التّأثير الكانس للجذور الحرّة، ويعتبر عدد وتوضع جذور الهيدروكسيل على الحلقة B هو الأهم، إذ تزداد القدرة المضادة للأكسدة بزيادة عدد جذور الهيدروكسيل على الحلقة B، في حين يكون تأثير توضع باقي مجموعات ال (OH) في المركب أقل وضوحاً (16، 17).



الشكل (2): البنية العامة للفلافونوئيدات

يوجد العديد من الطّرق المتّبعة لتحديد القدرة الإرجاعيّة لمادة ما، يعتبر اختبار قياس القدرة الكانسة للجذور الحرّة أو ما يعرف باختبار ال DPPH (2,2 diphenyl 1, picrylhydrazyl) اختباراً روتينيّاً مُعتمداً، وأحد الطّرق اللونيّة، المعياريّة، السّريعة، والفعّالة لإعطاء معلومات تسمح بتقييم الخصائص المضادة للأكسدة الإجماليّة للعينة المدروسة. يتميّز ال DPPH بأنّه جذر حرّ مستقر بسبب عدم توّضع (delocalization) الكترون ذرة الآزوت على الجزيء ككل. يبدو محلول ال DPPH الكحوليّ بلون بنفسجي غامق، وهو ذو طول موجة امتصاص أعظمي تتراوح ما بين (515-520nm) (18). يعتمد مبدأ الاختبار على استقبال ال DPPH لذرّة هيدروجين من جزيئة المادة المُرجِعة مما سيؤدّي لإرجاع ال DPPH إلى $DPPH_2$ وسيترافق ذلك مع تحوّل لون المحلول من البنفسجيّ إلى اللون الأصفر مع انخفاض الامتصاصيّة عند طول الموجة الأعظميّ، الشكل (3).



الشكل (3): الصيغة الكيميائية لجذر ال DPPH ومبدأ الاختبار

يتم قياس هذا النّقصان باستخدام جهاز Spectrophotometer (19، 20). ثمّ يتم حساب النّسبة المئويّة الكانسة لجذر ال DPPH أو ما يعرف بال Inhibition% حسب المعادلة (1) المذكورة في الأسفل. كذلك يتم استخدام مفهوم "التركيز الفعّال Efficient Concentration" (EC_{50}) أو أحيانا (IC_{50} من Inhibition) لتفسير نتائج اختبار ال DPPH حيث يعرّف ال IC_{50} بأنّه تركيز المادة ذات الخواص المُرجعة الذي يسبب انخفاضاً قدره 50% في امتصاصيّة محلول ال DPPH، أو بطريقةٍ أخرى، التركيز الكانس لنصف كميّة الجذور الحرّة في العيّنة. وعليه كلما زادت القدرة المضادة للأكسدة كلما كانت قيمة ال IC_{50} صغيرة (19).

المعادلة (1):

$$Inhibition\% = \frac{A_0 - A_s}{A_0} \times 100$$

A_0 امتصاصيّة الشاهد السلبي

As امتصاصيّة العينة بعد الإرجاع

أهميّة البحث وأهدافه

أهميّة البحث: إنّ الحاجة للتعرف على مواد مُرجعة جديدة يمكن استعمالها كعوامل مُرجعة خضراء اقتصادية وصديقة للبيئة، والانتشار الكبير لأوراق الغار والزيتون وقشور البرتقال والليمون كمخلّفات صناعيّة دفعنا إلى دراسة خلاصات هذه النباتات وبشكل خاص الخلاصات المائية.

ليكون الهدف من البحث: دراسة القدرة الإرجاعيّة للخلاصات المائيّة للنباتات الأربعة المختارة عبر تحديد النّسبة المئويّة الكانسة لجذر الـ DPPH وحساب الـ IC_{50}، لمعرفة إمكانيّة استعمالها كعوامل مُرجعة صديقة للبيئة والتي قد تشكّل بديلاً جيّداً للعوامل المرجعة التقليديّة أو حتى للخلاصات المحضّرة باستخدام محلات عضويّة مختلفة.

طرائق البحث ومواده

1. المواد

- العينات المدروسة: تمّ الحصول على الأجزاء النباتيّة للنباتات المستخدمة (أوراق الغار، أوراق الزيتون، قشور البرتقال، قشور الليمون) من قرية رويسة قسمين في ريف مدينة اللاذقيّة في شهر آذار، حيث تمّ تجفيفها في الظّل.
- المواد المستخدمة في اختبار تحديد القدرة الكانسة للجذور الحرّة: DPPH (Sisco Research laboratories, India). ماء مقطر. إيثانول مطلق (Honeywell, Germany).

2. الأجهزة

تم إجراء البحث في مخبر التحليل الآلي في كلية الصيدلة في جامعة القلمون الخاصة، وتم استخدام الأجهزة التالية: أدوات زجاجية. جهاز تقطير زجاجي. (Pipptte (DrAgon Lab, China. أوراق ترشيح. ميزان حسّاس (RADWAG As 220/2, Poland). حمام مائي مع أمواج فوق صوتيّة (Power sonic 410, Lab Tech, Korea). جهاز قياس الرطوبة (Sartorius, MA35, France). مقياس الطيف الضوئي (Jasco V-530 UV/visible Spectrophotometer, Japan). عدد من الخلايا البلاستيكيّة cuvette بسماكة 1 سم. طاحونة منزليّة. برنامج (IBM SPSS statistics, One-way ANOVA test).

طرائق البحث ومواده

▪ حساب رطوبة المساحيق

بعد تجفيف النباتات في الظّل وطحنها بواسطة طاحونة منزليّة، تمّ حساب محتوى الرّطوبة لمسحوق كل نبات بأخذ 3 عينات (1 g لكل عينة) من المسحوق ووضعها في جهاز تحديد محتوى الرطوبة، الذي يعمل على قياس الوزن قبل وبعد التجفيف في الجهاز، ثمّ حساب النسبة المئويّة للرطوبة في كل مسحوق. تمّ التعبير عن النتائج بطريقة المتوسط الحسابي ± الانحراف المعياري.

▪ تحضير الخلاصات النباتيّة

تم تحضير الخلاصات المائيّة للنباتات بنسبة استخلاص (1:50) حيث تمّ أخذ 1 g وزن جاف من مسحوق النبات ووضعها في 50 mL ماء مقطر ليتم الاستخلاص بمساعدة الأمواج فوق الصوتيّة بدرجة حرارة 50° مئوية لمدة 30 دقيقة. تمّت عمليّة التّرشيح والحصول على الخلاصات، ثمّ إكمال الحجم إلى 50 mL بالماء المقطّر ضمن بالون معايرة لتعويض الماء الذي تمت خسارته أثناء عملية الاستخلاص على شكل بخار والحصول على خلاصات ذات تراكيز دقيقة ليكون تركيز الخلاصات الأربعة الأم 20 mg/mL (وزن جاف/حجم).

▪ اختبار القدرة الكانسة للجذور الحرّة (DPPH Assay)

في البداية، كان لابدّ من رسم طيف محلول ال DPPH ذو التركيز (0.1 mM) المحضّر في الإيثانول لتحديد طول موجة الامتصاص الأعظمي، التي سيتم قياس امتصاصية العينات عندها. تمّ إجراء الاختبار وفقاً للباحث (Brand-Williams) (21) مع بعض التعديلات في الأحجام المأخوذة لإجراء الاختبار، تم أخذ 200 µL من الخلاصة الأم مع 2 mL من محلول ال DPPH الإيثانولي وضعت في أنبوب اختبار مع التحريك الجيد يدوياً. بالإضافة لإجراء عيّنة شاهد سلبي التي استُبدِل فيها الماء المقطر بالخلاصة، عينة شاهد إيجابي باستبدال محلول فيتامين ث (20mg/mL) بالخلاصة، وناصع Blank يحتوي إيثانول وماء مقطّر وتمّ الحضن لمدة 30 دقيقة في الظلام بدرجة حرارة الغرفة. ليتمّ بعدها قياس الامتصاصية عند 520 nm بهدف حساب النسبة المئويّة الكانسة لجذر الـ DPPH أو ما يعرف بالنسبة المئويّة للتثبيط Inhibition% حسب المعادلة (1) المذكورة سابقاً، خضعت كل عينة لمكررين مع قياس كل عينة 3 مرات، كذلك تمّ التعبير عن النتائج بطريقة المتوسط الحسابي ± الانحراف المعياري.

- **حساب التركيز الكانس لنصف كميّة الجذور الحرّة (IC_{50})**

تمّ تحضير سلاسل عياريّة بتمديدات مختلفة بدءاً من الخلاصات الأم لكل من خلاصتي الزيتون والغار، اللتين أظهرتا أفضل قدرة إرجاعيّة من بين الخلاصات المدروسة، بشكل يكون فيه التركيز الموافق للـ IC_{50} ضمن السلسة. كانت تراكيز السلسلة العيارية لخلاصة أوراق الزيتون mg/mL (4, 3.6, 3.2, 2.8, 2.4, 2, 1.6)، بينما كانت تراكيز السلسة العيارية لخلاصة أوراق الغار mg/mL (2, 1.8, 1.6, 1.4, 1.2, 1, 0.8). أجري اختبار الـ DPPH على كل تركيز من تراكيز السلسة العيارية بحسب الطريقة المذكورة سابقاً، تمّ تحضير 3 مكررات لكل تركيز، وتحضير ناصع Blank لكل تركيز من تراكيز السلسلة العيارية (حيث يحوي الناصع على الخلاصة بالتركيز المراد قياسه وإيثانول)، وذلك لإلغاء امتصاصّية الخلاصة ومنع تداخلها مع النتائج. تمّ حساب الـ Inhibition% لكل تركيز ثمّ رسم الخط البياني للتراكيز بدلالة الـ Inhibition% والتأكّد من الخطيّة وإيجاد المعادلة الموافقة لكل خط بياني لحساب الـ IC_{50}.

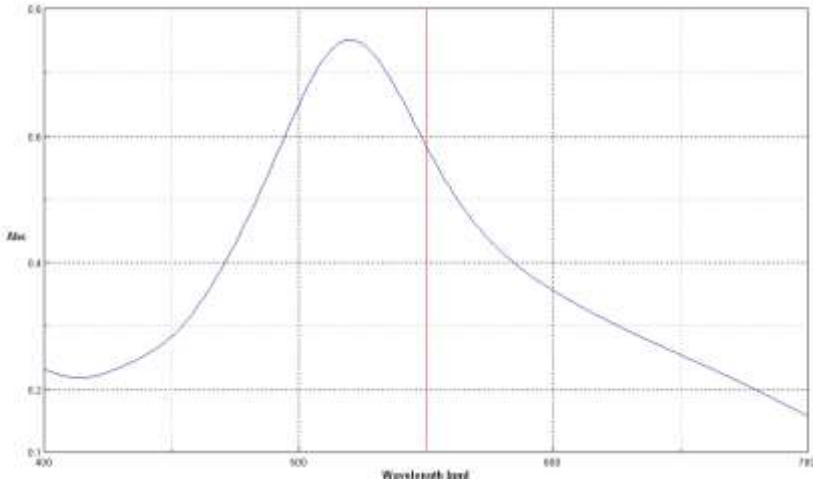
النتائج والمناقشة

أظهرت مساحيق أوراق وقشور النباتات المحضّرة نسباً متفاوتةً من الرطوبة، كان مستوى الرطوبة في قشور الليمون والبرتقال مرتفعاً على عكس أوراق الزيتون والغار، حيث تكون خسارة الماء من الأوراق أسرع. تمّ حساب النسبة المئويّة لرطوبة المساحيق لتحديد الوزن الجاف اللازم من المسحوق لتحضير الخلاصة بالتركيز المطلوب، الجدول1)(.

جدول (1): النسبة المئويّة لرطوبة المساحيق

النبات	النسبة المئويّة للرطوبة
قشور البرتقال	%15±1.6
قشور الليمون	%13±1.1
أوراق الزيتون	%10.4±0.7
أوراق الغار	%9.5±0.7

أظهر طيف محلول ال DPPH في الإيثانول امتصاص أعظمي عند طول موجة λ=520nm والتي سيتم العمل على قياس شدّة الامتصاص عندها لتحديد القدرة الكانسة للجذور الحرّة، الشكل (4).



الشكل (4): طيف الـUV لمحلول الـDPPH في الإيثانول

- **اختبار القدرة الكانسة للجذور الحرّة (DPPH Assay) وتحديد الـ IC_{50}**

تمّ أخذ الأحجام المطلوبة من كل خلاصة أمّ محضّرة بتركيز 20mg/mL وحضنها مع محلول الـ DPPH بحسب الطريقة المذكورة سابقاً وقياس امتصاصيّة كل عينة مع إجراء مكررين لكل خلاصة بهدف حساب النّسبة المئويّة للتّثبيط Inhibition%، وكما أشرنا سابقاً تمّ استخدام محلول فيتامين ث كشاهد إيجابي للإرجاع. أظهرت النّتائج تمتُّع خلاصة قشور البرتقال بقدرة إرجاعية جيدة والتي بلغت 81.23%، ولكنّها كانت الأقل بين الخلاصات المدروسة، حيث جاءت بعدها خلاصة قشور الليمون، وخلاصة أوراق الزّيتون بقدرة إرجاعيّة 87.64%، 89.53% على التوالي، مع تفوّق لخلاصة الغار حيث بلغت قدرتها 91.21%، جدول (2).

جدول (2): قيم النسبة المئويّة الكانسة لجذر الDPPH للخلاصات النباتيّة المدروسة وفيتامين ث كشاهد إيجابي

العينة	Inhibition%
فيتامين ث	%95.72 ± 0.08
غار	%91.21 ± 0.20
زيتون	%89.53 ± 0.75
ليمون	%87.64 ± 0.04
برتقال	%81.23 ± 0.74

أظهر التحليل الإحصائي للنتائج الملاحظة وجود فروق هامّة إحصائيّاً بين القدرة الإرجاعيّة للخلاصات الأربعة حيث كانت [1]($P<0.05$). كذلك تمت مقارنة الخلاصات السابقة مع خلاصة الغار كونها ذات القدرة الإرجاعيّة الأعلى، فأظهرت النتائج وجود اختلافات معنويّة بين خلاصتي البرتقال والليمون عند مقارنتهما مع خلاصة الغار ($P<0.05$)، في حين وُجد أنّ الاختلاف غير معنوي إحصائيّاً بين خلاصتيّ الغار والزّيتون، وقد تكون هذه الفروق ناجمة عن الصدفة أو العشوائيّة ($P>0.05$). لتأكيد النتائج تمّ تحضير سلاسل عياريّة لكل من خلاصتيّ الغار والزّيتون وحساب ال IC_{50} بالطريقة المذكورة سابقاً، وأظهرت النتائج الموضّحة في الجدول (3)، أنّ خلاصة الغار تتمتّع بقيمة IC_{50}

[1] ***P*-Value القيمة الاحتمالية**

تعادل IC_{50}= 1.38 mg/mL وهي أقل من خلاصة الزّيتون ذات IC_{50}= 2.65 mg/mL، ولكن دون وجود فروق معنويّة إحصائيّاً (***P***>0.05).

جدول (3): التركيز الكانس لنصف كميّة الجذور الحرّة لكل من خلاصتي الزيتون و الغار

النبات	IC_{50} (mg/mL)	معامل التّحديد (R^2)
غار	1.38±0.62	0.9931±0.004
زيتون	2.65±0.59	0.9916±0.003

عند الرجوع إلى دراسات سابقة للتحرّي عن المحتوى الفينولي لخلاصات النّباتات المستخدمة، وجدنا تفاوتاً كبيراً في النّتائج. يعود هذا التفاوت إلى تأثُّر المحتوى الفينولي بعوامل عديدة منها ما هو متعلّق بالنّبات كالأنواع النباتيّة للنبات نفسه، وظروف النّمو كالتربة، والمناخ، بالإضافة لزمن الجني. ومنها ما هو خاضع لتأثير عمليّة الاستخلاص مثل طريقة الاستخلاص، المحل المستخدم، وزمن الاستخلاص. اهتمت أغلب الدّراسات السابقة بدراسة القدرة الإرجاعيّة للخلاصات الكحوليّة (ميثانوليّة أو إيثانوليّة)، أو استخدام مزيج من الكحول والماء، بسبب الطبيعة القطبية لعديدات الفينول، في حين تميّز عملنا بدراسة القدرة الإرجاعيّة لأربع خلاصات مائيّة، وذلك لمراعاة أسلوب الكيمياء الخضراء. وعلى الرّغم من وجود تفاوت في قيم المحتوى الفينولي بين الدّراسات، إلّا أنّها تتفق على هوية المركب الفينولي الأكثر تواجداً في كل خلاصة، الأمر الذي ساعدنا في تفسير النّتائج السابقة من وجهة نظر كيميائيّة اعتماداً على علاقة البنية الكيميائيّة للفلافونويد بالتأثير المُرجِع.

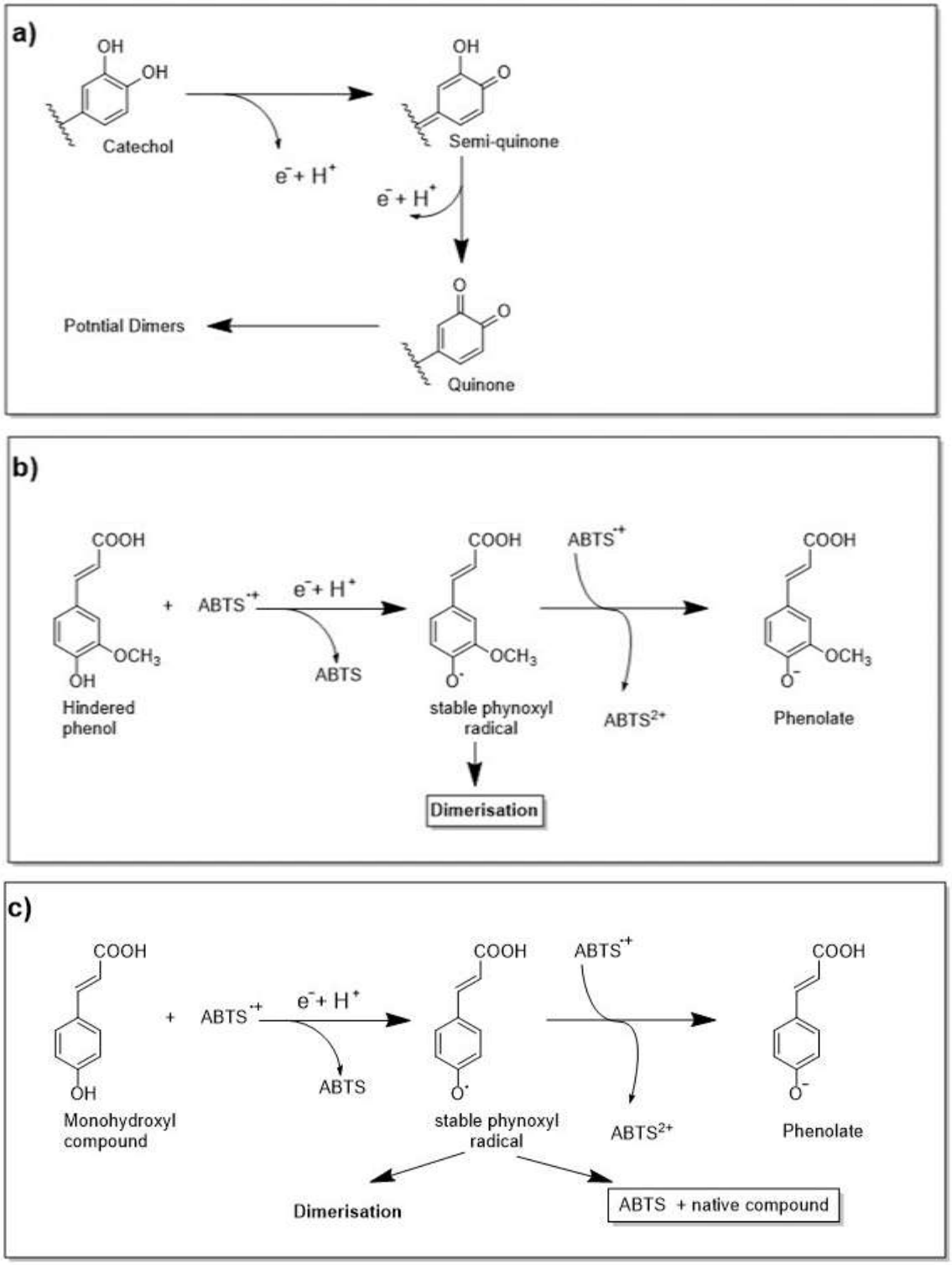
بدايةً، وبالرجوع إلى آلية تفاعل المركبات الفينولية مع الجذور الحرّة نلاحظ ثلاث حالات:

1- عديدات الفينول (منها المركبات الفينولية الحاوية على مجموعة كاتيكول)

2- الفينولات الأحادية (مركبات فينولية حاوية على مجموعة OH وحيدة)

3- الفينولات المُعاقة hindered phenols (مركبات فينولية حاوية على مجموعة ميتوكسي)

تقوم عديدات الفينول بعملها في كنس الجذور الحرّة عن طريق منح الكترون وحيد لكاتيون الجذر الحرّ ممّا ينتج عنه تشكّل نصف كينون، يستطيع المركب الحاوي على مجموعة كاتيكول أن يمنح بدوره الكترون إضافي ليشكّل الكينون الأكثر ثباتاً، بينما تكون المركبات الحاوية على مجموعة هيدروكسيل وحيدة في الموقع (4') على الحلقة B أقل قدرة مضادة للأكسدة ويعود السبب غالباً إلى عدم ثباتيّة جذر الفينوكسيل المتشكّل، خاصّةً إذا لم يكن هناك اقتران conjugation بين الحلقة B مع الحلقة C، كأن تكون الحلقة C مشبعة، أو غير حاوية على كربونيل في الموقع (4)، أو لدى غياب الـ OH في الموقع (3)، أضف إلى ذلك، قد يعمل جذر الفينوكسيل الناتج عن وحيدات الفينول كمُؤكسِد، على عكس نصف الكينون الناتج عن مجموعة الكاتيكول. أمّا بالنسبة للمركبات التي تسمى الفينولات المعاقة hindered phenols فهي عبارة عن فينولات حاوية على مجموعة ميتوكسي، يزيد وجود هذه المجموعة من الخواص المانحة للالكترونات للمركّب وتجعله أقوى من الفينولات الأحاديّة لأن جذر الفينوكسيل المتشكّل يكون أكثر ثباتاً، كما يكون موقع وعدد مجموعات الميتوكسي مهماً للفعاليّة، إلّا أنّها تبقى أقل قدرة من الفينولات الحاوية على مجموعة كاتيكول، يبيّن الشكل (5) الآليّة المقترحة من قبل الباحثة (Rice-Evance) للتأثير المضاد للأكسدة للفينولات الأحاديّة، الفينولات المعاقة، و الحاوية على مجموعة كاتيكول. (16، 17)



الشكل (5): الآليّة المقترحة للتأثير المضاد للأكسدة للفينولات. a) عديدات الفينول الحاوية على مجموعة كاتيكول. b) الفينولات المعاقة. c) وحيدات الفينول، (ABTS= 3.1 2, 2′-Azino-bis (3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic Acid وهو عبارة عن جذر حر يستخدم لتحديد القدرة المضادة للأكسدة لمركب ما). المرجع (16)

يملك النّارنجين Narngine المتواجد في خلاصتيّ الليمون والبرتقال، الشكل (1)، قدرةً ضعيفةً مضادةً للأكسدة تعود غالباً لبطء تشكّل جذر الفينوكسيل وثباتيّته الضعيفة، الأمر الذي قد يُعزى لكونه أحادي ال OH على الحلقة B، غياب الاقتران بين الحلقة B والحلقة C العائد لعدم وجود رابطة مضاعفة في الموقع (2−3)، وغياب الـ OH في الموقع (3). كما يشكّل الهيسبيريدين Hesperidin، وهو من الفينولات المعاقة، النّسبة الأكبر من الفلافونوئيدات المتواجدة في قشور الليمون والبرتقال، يتمتّع هذا المركّب بفعاليّة ضعيفة مضادة للأكسدة، ولكنّها أفضل من النّارنجين، قد يعود سبب ضعف الفعاليّة إلى موقع مجموعة OH على الحلقة B حيث أنّ وجودها في الموقع (3') يجعل الهيسبيريدين أقرب إلى بنية فينوليّة حاوية على هيدروكسيل في الموقع ميتا m-hydroxyphenolic structure حيث تتمتّع هذه المركبات بقدرة ضعيفة مانحة للالكترونات بالمقارنة مع المركبات الحاوية على هيدروكسيل (OH) في الموقع (4') أو بارا، بالإضافة للإعاقة الفراغيّة التي تسببها مجموعة الميتوكسي (16، 17، 22، 23).

على الرّغم من تشابه الليمون والبرتقال بهويّة الفلافونوئيد الأساسيّ، أظهرت النّتائج وجود اختلاف هام إحصائيّاً في قدرتهما الإرجاعيّة ($P<0.05$)، وتوافقت نتائجنا مع نتائج الباحث (Xi) وزملاؤه حيث أظهرت نتائج اختبار الـ DPPH تمتُّع الليمون بقدرة إرجاعيّة أفضل من البرتقال (13). كذلك توافقت نتائجنا مع (Kanan) وزملاؤه الذّين وجدو أنّ تحضير جزيئات ذهب نانويّة عبر إرجاع $AuCl_4$ بواسطة عصير الليمون كان أفضل من عصير البرتقال (11). يمكن تفسير هذه النتائج بسبب تأثير اختلاف تركيز الهيسبيريدين والنارنجين في الخلاصة واختلاف الحموض الفينوليّة الأساسيّة في النباتين، حيث وُجد أنّ حمض القهوة Caffeicic acid، هو الحمض الفينولي الأكثر تواجداً في عصير وقشور اللّيمون، في حين كان حمض الفيروليك Ferulic acid، هو الأكثر تواجداً في عصير وقشور البرتقال، الشكل (1). وبالعودة للبنية الكيميائية لكل من الحمضين الفينوليين السّابقين نلاحظ أنّ كلاهما يملك مجموعة OH في الموقع بارا (4)، الأمر الذي يحسّن القدرة المضادة للأكسدة لمشتقات الهيدروكسي سينامات، إلّا أنّ حمض الفيروليك يحمل مجموعة ميتوكسي (hindered phenol) تزيد الخواص المانحة للالكترونات ولكنّها تغيّر من البنية المسطّحة وتشكّل إعاقة فراغيّة، في حين يحتوي حمض القهوة على مجموعة كاتيكول ذات الخواص القويّة المضادة للأكسدة (13، 14).

فيما يتعلّق بأوراق الزّيتون يشكّل الأوليوروبين Oleuropein المركب الفينوليّ الأكثر تواجداً في الخلاصة، وهو عبارة عن مركب حاوٍ على مجموعة كاتيكول ذو قدرة إرجاعيّة عاليّة. وجد (Vergine) وزملاؤه أنّ زيادة المحتوى الفينولي لخلاصة أوراق الزيتون الإيثانولية تتوافق مع زيادة قدرتها المضادة للأكسدة عند مقارنة 4 أنواع من نبات الزيتون (24). كذلك توافقت نتائجنا مع (Zaïry) وزملاؤها حيث أظهرت دراستهم للخلاصة المائيّة لأوراق نوعين من نبات الزيتون قدرة إرجاعيّة عالية معتمدة على التركيز (12). تمت الاستفادة من الخواص المُرجعة لهذه الخلاصة المائيّة الحاوية على الأوليوروبين منذ أكثر من عشر سنوات في منع صدأ الحديد من قبل الباحث (El-Etry) (25)، و حديثاً قام (Maqbool) وزملاؤه بإجراء تفاعل إرجاع $Ce(NO_3)_3.6H_2O$ بواسطة خلاصة الزّيتون لاصطناع جزيئات نانوية من CeO_2 (26). أظهرت دراستنا أنّ القدرة الإرجاعيّة لخلاصة الزيتون كانت أكبر لدى مقارنتها مع خلاصة البرتقال مع وجود فروق إحصائيّة هامّة ($P<0.05$)، في حين لم يكن الاختلاف معنوي إحصائيّاً عند مقارنتها مع خلاصة الليمون ($P>0.05$). وقد يكون السبب وراء الفعاليّة العالية المضادة للأكسدة لخلاصة الزّيتون أنّ الأوليوروبين يتفكك ليعطي هيدروكسي تيروزول Hydroxy tyrosol الحاوي أيضاً على مجموعة كاتيكول في موقعين (4-3)، الشكل (1).

من جهة أخرى، تمتاز خلاصة أوراق الغار بغناها بالفلافونوئيدات ، منها مشتقات الكامفيرول Kaempferol الحاوية على مجموعة OH وحيدة على الحلقة B، ومشتقات الكيرستين Quercetin، والكاتشين Catechin الحرّة والمتماثرة، الحاوية على مجموعة كاتيكول، كما في الشكل (1) (27، 28). وجد (Dall'Acqua) وزملاؤه أنّ مشتقات الكيرستين والكاتشين ذات قدرة مضادة للأكسدة أكبر من مشتقات الكامفيرول، وتؤكّد هذه النّتائج أهميّة مجموعة الكاتيكول في تحسين الفعاليّة المضادة للأكسدة للمركبات. هذا بدوره قد يفسّر عدم وجود فروق معنويّة إحصائياً بين خلاصتي الزيتون والغار ($P>0.05$) كون كلا الخلاصتين غنيّتين بعديدات فينول حاوية على مجموعة كاتيكول. كذلك، وجدو أنّ الفرق في المحتوى الفينولي والقدرة الإرجاعيّة غير كبير وغير معنوي إحصائياً بين الخلاصة الميثانوليّة والخلاصة المائيّة. أيّ يمكننا القول أنّنا نحصل على مكونات فينوليّة متشابهة محبة للماء في حال تمّ استخلاصها بالماء أو بالميثانول (29). و توافقت نتائجنا أيضاً مع (Aguilar) وزملاؤه حيث أظهرت نتائج اختبار الـ DPPH قيمة تثبيط تعادل 94,73±0.49 =Inhibition% عند الاستخلاص بالإيثانول 35%، حيث أرجعوا هذه القدرة العالية المضادة للأكسدة لوجود مركبات حاوية على مجموعات هيدروكسيلية كثيرة تساعد في القدرة الكبيرة لمنح بروتونات وتثبيت جذر الـ DPPH (30). كذلك توافقت نتائجنا مع (Mnif) وزملاؤه الذين وجدوا أنّ خلاصة المثانوليّة لأوراق الغار تتمتّع بقدرة عالية مضادة للأكسدة حيث بلغت قيمة الـ IC_{50}= 3mg/ml، في حين أظهرت دراستنا أنّ قيمة الـIC_{50}=1.38 mg/mL للخلاصة المائيّة، مع الأخذ بعين الاعتبار الاختلاف بطريقة الاستخلاص والمحل المستخدم (15). وكان (Vaseeharan) وزملاؤه أول من استغلّ خلاصة الغار لتحضير جزيئات نانويّة من أكسيد الزنك ZnO عبر إرجاع خلات الزنك المائيّة $[Zn(CH_3COO)_2].2H_2O$ (27).

في النّهاية، يمكننا القول أنّ عديدات الفينول الموجودة في كل من خلاصتيّ الغار والزّيتون والتي تحتوي على مجموعة كاتيكول هي غالباً السّبب في تفوّق هاتين الخلاصتين على خلاصتيّ البرتقال والليمون. حيث يترافق وجود مجموعة الكاتيكول مع زيادة الخواص المضادة للأكسدة كون هذه المجموعة تلعب دوراً مهمّاً في زيادة القدرة على منح البروتونات وتثبيت جذر الـ DPPH.

الاستنتاجات والتوصيات

استطعنا في هذه الدّراسة إعادة تدوير واستعمال (قشور البرتقال، قشور الليمون، أوراق الزّيتون، أوراق الغار)، والتي تعتبر نواتج ثانويّة لبعض الصّناعات، بهدف استخلاص المواد الفينوليّة ذات التّأثيرات الكانسة للجذور الحرّة. تمتّعت الخلاصات المائيّة للنّباتات الأربعة بقدرة إرجاعيّة جيّدة حيث اقتربت من القدرة الإرجاعيّة للخلاصات الكحوليّة، الأمر الذي يعود إلى المحتوى الفينولي العالي، ممّا يمكّن من الاستغناء عن استخدام المحلات الكحوليّة الضارّة وبشكل خاص الميثانول لاستخلاص عديدات الفينول القطبيّة، والاستعاضة عنها بالماء كونه أكثر أماناً، أرخص ثمناً، وصديق للبيئة. ومن هنا يمكننا أن نوصي باستخدام هذه الخلاصات المائيّة، وبشكل خاص خلاصة أوراق الغار والزيتون، والاستفادة من قدرتها الإرجاعيّة العالية في العديد من التفاعلات الكيميائيّة كبديل آمن للعوامل المُرجعة التقليديّة واستخدامها في تطبيقات متعدّدة.

المراجع

.1TÖRÖK B., DRANSFIELD T. Chapter 1.1 - Green Chemistry: Historical Perspectives and Basic Concepts. In: Török B, Dransfield T, editors. Green Chemistry: Elsevier; 2018. p. 3-16.

.2American Chemical Society (ACS). Available from: https://www.acs.org/content/acs/en/greenchemistry.html.

.3K.K.H. DE SILVA H.-H. H., R.K. JOSHI, M. YOSHIMURA. *Chemical reduction of graphene oxide using green reductants*. Carbon. Vol., No. 119, 2017, 190-199.

.4AUNKOR M., MAHBUBUL I., SAIDUR R., METSELAAR H. *The green reduction of graphene oxide*. RSC Advances. Vol. 6, No. 33, 2016, 27807-27828.

.5BRGLEZ MOJZER E., KNEZ HRNČIČ M., ŠKERGET M., KNEZ Ž., BREN U. *Polyphenols: Extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic effects*. Molecules. Vol. 2 ،1No. 7, 2016, 901.

.6PONTAZA-LICONA Y. S., RAMOS-JACQUES A., CERVANTES-CHAVEZ J., LÓPEZ-MIRANDA J. L., DE JESÚS RUÍZ-BALTAZAR Á., MAYA-CORNEJO J., RODRÍGUEZ-MORALES A. L., ESPARZA R., ESTEVEZ M., PÉREZ R. *Alcoholic extracts from Paulownia tomentosa leaves for silver nanoparticles synthesis*. Results in Physics. Vol. 12, No. 2019, 1670-1679.

.7WANG Y., SHI Z., YIN J. *Facile synthesis of soluble graphene via a green reduction of graphene oxide in tea solution and its biocomposites*. ACS Applied Materials & Interfaces. Vol. 3, No. 4, 2011, 1127-1133.

.8SURESH D., NAGABHUSHANA H., SHARMA S. *Clove extract mediated facile green reduction of graphene oxide, its dye elimination and antioxidant properties*. Materials Letters. Vol. 142, No. 2015, 4-6.

.9JIN X ،.LI N., WENG X., LI C., CHEN Z. *Green reduction of graphene oxide using eucalyptus leaf extract and its application to remove dye*. Chemosphere. Vol. 208, No. 2018, 417-424.

.10HAGHIGHI B., TABRIZI M. A. *Green-synthesis of reduced graphene oxide nanosheets using rose water and a survey on their characteristics and applications*. RSC Advances. Vol. 3, No. 32, 2013, 13365-13371.

.11SUJITHA M. V., KANNAN S. *Green synthesis of gold nanoparticles using Citrus fruits (Citrus limon, Citrus reticulata and Citrus sinensis) aqueous extract and its characterization*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. Vol. 102, No. 2013, 15-23.

.12ZAÏRI A., NOUIR S., ZARROUK A., HADDAD H., KHELIFA A., ACHOUR L. *Phytochemical profile, cytotoxic, antioxidant, and allelopathic potentials of aqueous leaf extracts of Olea europaea*. Food Science & Nutrition. Vol. 8, No. 9, 2020, 4805-4813.

.13XI W., LU J., QUN J., JIAO B. *Characterization of phenolic profile and antioxidant capacity of different fruit part from lemon (Citrus limon Burm.) cultivars*. Journal of food science and technology. Vol. 54, No. 5, 2017, 1108-1118.

.14LIEW S. S., HO W. Y., YEAP S. K., SHARIFUDIN S. A. B. *Phytochemical composition and in vitro antioxidant activities of Citrus sinensis peel extracts*. PeerJ. Vol. 6, No. 2018, e5331.

.15DHIFI W., BELLILI S., JAZI S., NASR S. B., EL BEYROUTHY M., MNIF W. *Phytochemical composition and antioxidant activity of Tunisian Laurus nobilis*. Pakistan journal of pharmaceutical sciences. Vol. 31, No. 6, 2018, 2397-2402.

.16PANNALA A. S., CHAN T. S., O'BRIEN P. J., RICE-EVANS C. A. *Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics*. Biochemical and biophysical research communications. Vol. 282, No. 5, 2001, 1161-1168.

.17HEIM K. E., TAGLIAFERRO A. R., BOBILYA D. J. *Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships*. The Journal of nutritional biochemistry. Vol. 13, No. 10, 2002, 572-584.

.18KEDARE S. B., SINGH R. *Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay*. Journal of food science and technology. Vol. 48, No. 4, 2011, 412-422.

.19MISHRA K., OJHA H., CHAUDHURY N. K. *Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results*. Food Chemistry. Vol. 130, No. 4, 2012, 1036-1043.
.20AKAR Z., KÜÇÜK M., DOĞAN H. *A new colorimetric DPPH• scavenging activity method with no need for a spectrophotometer applied on synthetic and natural antioxidants and medicinal herbs*. Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry. Vol. 32, No. 1, 2017, 640-647.
.21BRAND-WILLIAMS W., CUVELIER M.-E., BERSET C. *Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity*. LWT-Food science and Technology. Vol. 28, No. 1, 1995, 25-30.
.22KHAN M. K., ABERT-VIAN M., FABIANO-TIXIER A.-S., DANGLES O., CHEMAT F. *Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (Citrus sinensis L.) peel*. Food Chemistry. Vol. 119, No. 2, 2010, 851-858.
.23DONG X., HU Y., LI Y., ZHOU Z. *The maturity degree, phenolic compounds and antioxidant activity of Eureka lemon [Citrus limon (L.) Burm. f.]: A negative correlation between total phenolic content, antioxidant capacity and soluble solid content*. Scientia Horticulturae. Vol. 243, No. 2019, 281-289.
.24NICOLÌ F., NEGRO C., VERGINE M., APRILE A., NUTRICATI E., SABELLA E., MICELI A., LUVISI A., DE BELLIS L. *Evaluation of phytochemical and antioxidant properties of 15 Italian olea europaea L. Cultivar Leaves*. Molecules. Vol. 24, No. 10, 2019, 1998.
.25EL-ETRE A. *Inhibition of acid corrosion of carbon steel using aqueous extract of olive leaves*. Journal of colloid and interface science. Vol. 314, No. 2, 2007, 578-583.
.26MAQBOOL Q., NAZAR M., NAZ S., HUSSAIN T., JABEEN N., KAUSAR R., ANWAAR S., ABBAS F., JAN T. *Antimicrobial potential of green synthesized CeO2 nanoparticles from Olea europaea leaf extract*. International journal of nanomedicine. Vol. 11, No. 2016, 5015.
.27VIJAYAKUMAR S., VASEEHARAN B., MALAIKOZHUNDAN B., SHOBIYA M. *Laurus nobilis leaf extract mediated green synthesis of ZnO nanoparticles: characterization and biomedical applications*. Biomedicine & Pharmacotherapy. Vol. 84, No. 2016, 1213-1222.
.28MEDEIROS-FONSECA B., MESTRE V., COLAÇO B., PIRES M., MARTINS T., DA COSTA R. G., NEUPARTH M., MEDEIROS R., MOUTINHO M. S., DIAS M. I. *Laurus nobilis (laurel) aqueous leaf extract's toxicological and anti-tumor activities in HPV16-transgenic mice*. Food & function. Vol. 9, No. 8, 2018, 4419-4428.
.29DALL'ACQUA S., CERVELLATI R., SPERONI E ،.COSTA S., GUERRA M. C., STELLA L., GRECO E., INNOCENTI G. *Phytochemical composition and antioxidant activity of Laurus nobilis L. leaf infusion*. Journal of Medicinal Food. Vol. 12, No. 4, 2009, 869-876.
.30MUÑIZ-MÁRQUEZ D. B., MARTÍNEZ-ÁVILA G. C., WONG-PAZ J. E., BELMARES-CERDA R., RODRÍGUEZ-HERRERA R., AGUILAR C. N. *Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from Laurus nobilis L. and their antioxidant activity*. Ultrasonics sonochemistry. Vol. 20, No. 5, 2013, 1149-1154.