

تقييم الفعالية المضادة للأكسدة لمركب Propyl gallate المحضر نانويا.

ميس ابراهيم محمد زهراء رحيم مرشدي علي عبد الكاظم الغانمي
مدرس مساعد مدرس مساعد أستاذ

قسم علوم الحياة / كلية العلوم/جامعة كربلاء

zahraa_flo122@yahoo.com

المستخلص

تم تحضير مركب نانوي هجين PG -ZnO باستخدام طريقة Sol-Gel للتبادل الأيوني بين مضاد الأكسدة propyl gallate و أكسيد الزنك (Zinc oxide). تم تشخيص مضاد الأكسدة النانوي الجديد ذ كشفت مطيافية الأشعة تحت الحمراء عن ظهور مجاميع جديدة في طيف المضاد PG-ZnO مما يشير الى تكون مضاد أكسدة جديد كما اوضحت تقنية حيود الأشعة السينية (XRD) ظهور مستويات حيود جديدة في طيف المضاد PG-ZnO مقارنة بطيف حيود اوكسيد الزنك . درست الفعالية المضادة للأكسدة للمركب النانوي PG-ZnO بطريقة كسح الجذور الحرة و أوضحت النتائج أن قيمة IC₅₀ بلغت (75 ، 25) مايكروغرام/مل للمركبين النانوي و الحر , على التوالي.

Evaluation of the antioxidant activity to the nanoprepared propyl gal- late.

Mais Ibraheem Zahraa Murshidy Ali Al-Ghanimi
Assistant Lecturer Assistant Lecturer Professor
Biology Department / College of science / University of Kerbala.
zahraa_flo122@yahoo.com

Abstract :

A nanohybrid compound PG-ZnO was prepared using sol-gel ion exchange method between the antioxidant propyl gallate and zinc oxide . The new nanoantioxidant compound was identified. FT-IR spectroscopy revealed the appearance of new groups in the PG-ZnO spectrum which indicates the formation of new antioxidant . The X-Ray Diffraction (XRD) spectrum revealed the appearance of new diffraction planes in the PG-ZnO spectrum in compare with the spectrum of zinc oxide .

The antioxidant activity of PG-ZnO was studied using free radical scavenging method. Result revealed that IC₅₀ were (75 and 25) µg/ml for the nano and free anti-oxidant , respectively.

المقدمة:

استخدمت المضافات الغذائية (Food additives) منذ العصور القديمة لما تؤديه من أدوار عدة تشمل على حفظ الغذاء و تحسين قوامه و تعزيز نكهته و تحسين مظهره فضلا عن اطالة مدة خزنه (11) .
وتعد مضادات الأكسدة (Antioxdants) من أهم المضافات الغذائية بالنظر لأمكانية استخدامها في تثبيط الجذور الحرة (Free radicals) بصورة مباشرة او غير مباشرة . و تصنف تلك المضادات الى صنفين : الأول يمثل مضادات الأكسدة الأولية (Primary antioxidants) التي تتفاعل مباشرة مع الدهن و جذور البيروكسيل و تحولها الى مركبات غير فعالة ، أما الثاني فيمثل مضادات الأكسدة الثانوية التي تبطئ من سرعة الأكسدة من خلال قيامها بربط المعادن (Metal chelators) و تجهيز بروتون الى مضادات الأكسدة الأولية و غيرها من الآليات (15).

و يعد مركب Propyl gallate (PG) من أهم مضادات الأكسدة الأولية و هو أستر بروبيلي لحامض الكالكيك . و هو مضاد أكسدة فينولي مصنع و يبدي فعالية عالية في الحد من الأكسدة من خلال كبح عمليات بدء السلسلة (Chain initiation) أو كسر عملية تكاثر السلسلة (Chain propagation) للدهون غير المشبعة (1) .

دخلت التقنية النانوية (Nanotechnology) في المجال الغذائي و تسعت تطبيقاتها لتشمل التحسينات الحسية للمواد الغذائية من حيث النكهة و اللون و التعبئة و التغليف لزيادة صلاحية الأغذية و تصنيع المحسسات الحيوية لزيادة سلامة الأغذية فضلا عن مضادات الأحياء المجهرية المسببة لتلف الأغذية (4) .
و بالنظر لأهمية مضادات الأكسدة فقد هدفت هذه الدراسة الى الحصول على مضاد أكسدة نانوي كفوء و تقييم فعاليته المضادة للأكسدة .

المواد و طرائق العمل :

تحضير مضاد الأكسدة النانوي من طبقات أوكسيد الزنك مع مضاد الأكسدة propyl gallate بطريقة sol gel للتبادل الايوني :

أتبعت الطريقة الموصوفة من قبل (7) مع بعض التحوير في تحضير مضاد الأكسدة النانوي الهجين و ذلك بإضافة 50 مل من مضاد الأكسدة PG (المذاب في محلول 50% يثانول) قطرة-قطرة الى محلول أوكسيد الزنك (الناتج من اذابة 1 غم من أوكسيد الزنك في 50% يثانول) و حرك المزيج مغناطيسيا بدرجة حرارة الغرفة لمدة ساعتين ثم وضع المزيج في الحاضنة الهزازة عند درجة حرارة 37 م° لمدة 18 ساعة ثم وضع المزيج المذكور في الحاضنة الساكنة عند درجة حرارة 40 م° لمدة 24 ساعة أعقبه فصل الراسب بواسطة جهاز الطرد المركزي بسرعة 5000 دورة/دقيقة لمدة 20 دقيقة و من ثم غسل بالماء المقطر اللاأيوني مرات عدة و بعدها جفف الراسب عند درجة حرارة 40 م° و تم طحنه بالهاون الخزفي و أخيرا خزنه في الثلاجة.
تشخيص مضاد الأكسدة النانوي الهجين :

1- التشخيص باستخدام طيف الأشعة تحت الحمراء (FT-IR):

تم عمل قرص من مضاد الأكسدة النانوي الهجين مع بروميد البوتاسيوم (KBr) بعد طحنهما بصورة جيدة و تم قياس طيف الأشعة تحت الحمراء في مدى من الموجبة (400-4000) سم⁻¹.

2- التشخيص باستخدام طيف حيود الأشعة السينية (X-Ray Diffraction , XRD)

تم تشخيص مضاد الأكسدة النانوي الهجين PG-ZnO باستخدام طيف حيود الأشعة السينية و الذي يوضح الأختلاف في سمك الطبقة قبل عملية الإقحام و بعدها لمضاد الأكسدة الهجين و ذلك باستخدام قانون براك لاستخراج قيمة سمك الطبقة (d) قبل عملية الإقحام و بعدها .

تحديد الفعالية المضادة للأكسدة للمركب النانوي الهجين: PG-ZnO

1- تقدير الفعالية المضادة للأكسدة بطريقة كسح الجذور الحرة:

استخدمت الطريقة الموصوفة من قبل (3) مع بعض التحوير في تقدير الفعالية المضادة للأكسدة لكل من المركب النانوي الهجين PG-ZnO و الحر PG فضلا عن إستخدام المضاد القياس Trolox لغرض المقارنة . تعتمد الطريقة المذكورة أعلاه على قياس نسبة تثبيط الجذر 2,2-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonicacid(1Mm) الحاوي على محلول (2.45 Mm) potassium persulfate عند الطول الموجي 734 نانوميتر . إذ قدرت نسبة تثبيط الجذر ABTS بحسب المعادلة الآتية :

$$PI (\%) = [1 - (At / Ar)] \times 100$$

إذ أن At و Ar هما امتصاصي العينة و ABTS ، على التوالي .

2- تقدير الفعالية المضادة للأكسدة بطريقة الفعالية المخيلية لأيون الحديدوز (ferrous ion chelating activity) :

قدرت النسبة المئوية للتأثير المخليبي وفقا للطريقة الموصوفة من قبل(7). إذ تم عمل سلسلة من التخفيف لكل من مضاد الأكسدة النانوي PG-ZnO و مضاد PG الحر فضلا عن المضاد القياسي Butylated Hydroxy Anizole (BHA) { انحصرت التراكيز بين 1 ملغم/مل الى 10 مايكروغرام/مل }.

وضع 1 مل من محلول كبريتات الحديد سباعية جزيئ الماء المحضرة بتركيز (0.375 mM) في انبوبة اختبار ثم أضيف إليه 1 مل من مادة Ferrozine (1Mm) و بعد مزج المحلولين جيدا اضيف 1مل من كل تركيز من المركبات المحضرة قيد الدراسة (كلا على إنفراد). و بعد رج الأنبوب باستخدام جهاز المازج (vortex) تم حضنها بدرجة حرارة الغرفة لمدة 10 دقائق في مكان معتم . تم قياس الأمتصاص عند الطول الموجي 562 نانوميتر بعد تصفير الجهاز على المحلول المتكون من الماء المقطر و كبريتات الحديد و مادة ferrozine .

قدرت نسبة التأثير المخليبي (chelating effect) باستعمال المعادلة الآتية :

$$\text{Chelating effect \%} = (\text{A control} - \text{A sample}) / \text{A control} \times 100$$

النتائج و المناقشة :

تشخيص مضاد الأكسدة النانوي الهجين :

1- التشخيص باستخدام طيف الأشعة تحت الحمراء :

1- طيف الأشعة تحت الحمراء لمضاد الأكسدة : propyl gallate

أوضحت النتائج المبينة في الشكل 1 ان مركب PG بحالته الحرة يظهر العديد من الحزم المميزة عند ترددات معينة إذ أن ظهور الحزم عند الترددات (3504 و 3468 و 3223) سم⁻¹ يشير الى إهتزاز مط مجاميع الهيدروكسيل OH . بينما تشير الحزمتان عند الترددين (2879 و 2968) سم⁻¹ الى إهتزاز مط مجموعة CH₃ المتماثل و غير المتماثل ، على التوالي . أما الحزمة عند التردد 1693 سم⁻¹ فتشير الى مط كاربونيل C = O الأستر . كما يتضح من الشكل نفسه ظهور مط هيكل للبنزين عند ثلاثة ترددات (1616 و 1539 و 1469) سم⁻¹ ، على التوالي . في حين يلاحظ ظهور حني اواصر CH البنزين عند الترددين (868 و 746) سم⁻¹ . (13)

2- طيف الأشعة تحت الحمراء لطبقات أكسيد الزنك :

من ملاحظة الشكل 2 فإن طبقات أكسيد الزنك تظهر حزمة غير واضحة واقعة عند التردد (400-500) سم⁻¹ و التي تعزى الى اهتزاز رابطة المعدن Zn-O (2).

ج- طيف الأشعة تحت الحمراء لمضاد الأكسدة الهجين : PG-ZnO

من خلال النتائج في الشكل 3 يتضح نجاح عملية إقحام مضاد الأكسدة PG بين طبقات أكسيد الزنك و ذلك من خلال ظهور العديد من الحزم المميزة الجديدة ، إذ يلاحظ ظهور حزمة حادة عند التردد 3742 سم⁻¹ و التي تشير الى إهتزاز مط مجموعة OH . أما الحزمتان عند الترددين (2893 و 2968) سم⁻¹ فتشير الى مط CH₃ المتماثل و غير المتماثل على التوالي . كما يتضح من الشكل نفسه ظهور مط كاربونيل C=O الأستر و قد حصل لها إنزياح نحو التردد الأوطأ (1645) سم⁻¹ في حين أن ظهور الحزم الثلاث عند الترددات (1550 و 1514 و 1462) سم⁻¹ تشير الى مط هيكل للبنزين (13) .

2- التشخيص باستخدام طيف حيود الأشعة السينية :

تم دراسة طيف حيود الأشعة السينية لمضاد الأكسدة الهجين PG-ZnO فضلا عن طبقات أكسيد الزنك (ZnO) لمعرفة الأختلاف في سمك الطبقة قبل عملية إقحام مضاد الأكسدة بين طبقات أكسيد الزنك .

فمن خلال طيف حيود الأشعة السينية لأوكسيد الزنك في الشكل 4 يلاحظ ظهور حيود المستويات 100 عند الزاوية 31.29° و لها مسافة بلورية d تساوي 0.281 نانومتر و المستوى 002 عند الزاوية 34.82° بمسافة

بلورية تساوي 0.259 نانوميتر أما المستوي 101 فقد ظهر عند الزاوية 36.29° و له مسافة بلورية تساوي 0.247 نانوميتر (2) .

و عند اجراء عملية التبادل الايوني بين طبقات اوكسيد الزنك و مضاد الأوكسدة PG يظهر حيود للمستوي 003 بمسافة بلورية 1.83 نانوميتر إضافة الى وجود المستويات العائدة الى طبقات أوكسيد الزنك مما يدل على أن طبقات أوكسيد الزنك لا تزال تحافظ على تركيبها الطبيعي و أن المضاد PG قد إنحسر بين طبقات أوكسيد الزنك كما موضح في الشكل 5.

تقدير الفعالية المضادة للأوكسدة :

1- الفعالية المضادة للأوكسدة بطريقة كسح الجذور الحرة :

أستخدمت طريقة كسح الجذور الحرة في تقدير الفعالية المضادة للأوكسدة للمركبين PG-ZnO النانوي و PG الحر من خلال تحديد تركيزالمركب الذي له القابلية على اختزال أوتثبيط امتصاص الجذر ABTS الى النصف (IC_{50}) و الذي عادة ما يعبر عنه بشكل نسبة مئوية % PI .

يتضح من الشكل 6 ان للمركب النانوي الهجين PG-ZnO فعالية مضادة للأوكسدة عند التركيز 75 مايكروغرام/مل بينما بلغت 25 مايكروغرام/مل للمركب PG الحر (الشكل 7) و هي القيمة ذاتها التي يمتلكها مضاد الأوكسدة القياسي Trolox الشكل 8 .

بينت احدى الدراسات التي قام بها (10) ان عملية اقحام جزيئات الفلافونويدين Quercetin و Catechin الى الدقائق النانوية لبوليمر (D, L-lactide - co- glycolide, PLGA) تؤدي الى زيادة فعاليتها المضادة للأوكسدة من خلال زيادة قابليتها التثبيطية لجذر الاوكسجين (O_2) مقارنة مع جزيئات الفلافونويد الحرة و يعزى السبب في ذلك الى الحماية التي توفرها الدقائق النانوية لبوليمر PLGA من الاوكسجين الجزيئي (Molecular oxygen) المتولدة أثناء عملية الحضان ، أذ تتحرر جزيئات الفلافونويد بعد إنتهاء الحضان و تقوم بكسح الجذور الحرة في حين أن جزيئات الفلافونويد الحرة تكون غير محمية مما يؤدي الى إنخفاض فعاليتها الكاسحة للجذور الحرة.

تعد الفينولات (phenols) من المواد التي تمتلك فعالية مضادة للأوكسدة عالية (14) . إذ أشار (5) الى ان حامض الكاليك يمتلك فعالية عالية لكسح الجذور الحرة مقارنة مع مركبات فينولية اخرى مثل Thymol و Carvaerol و Hydroquinone و ربما يعزى السبب في ذلك الى عدد مجاميع الهيدروكسيل (hydroxyl groups) المرتبطة بالحلقة الأروماتية إضافة الى أن الفينولات الأحادية أقل فعالية من الفينولات المتعددة (12).

تستعمل طريقة ABTS بشكل واسع في تقدير الفعالية المضادة للأوكسدة للعديد من المواد إذ ان الجذر ABTS الذي يمتص عند الطول الموجي 734 نانوميتر (معطيا لونا اخضر مزرق) يتكون من فقدان الالكترتون

من ذرة النيتروجين من (ABTS) (2,2-azino-bis3-ethylbenzthiazolin) و في وجود المركبات أو المستخلصات المضادة للأكسدة التي لها القابلية على وهب ذرة هيدروجين فإن ذرة النيتروجين لـ ABTS سوف تقتنص ذرة الهيدروجين مما يؤدي الى إزالة لون المحلول (decolorization) (8) .

2- الفعالية المضادة للأكسدة بطريقة الفعالية المخيلية لأيون الحديدوز :

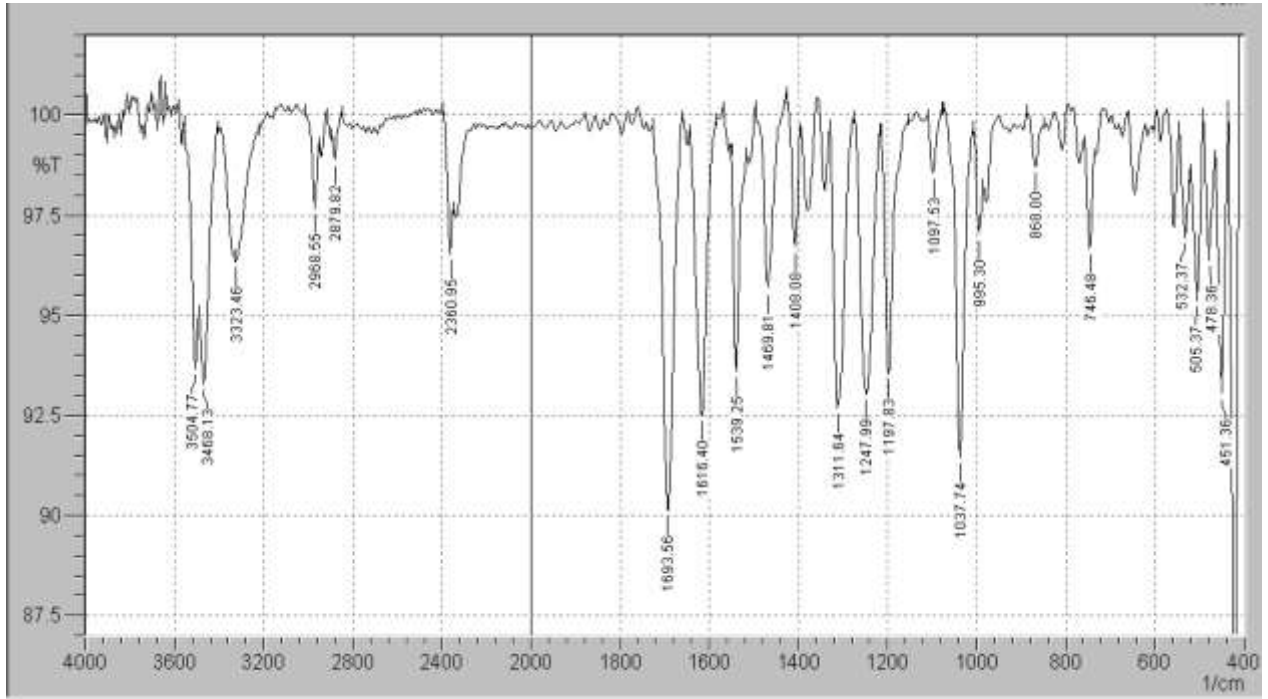
تم تقدير الفعالية المضادة للأكسدة لثلاثة مركبات إشتملت على المركب النانوي الهجين PG-ZnO والمركب PG الحر فضلا عن مضاد الأكسدة القياسي BHA من خلال قابلية تلك المركبات في التنافس مع المركب Ferrozine للارتباط مع أيون الحديدوز و الذي يعبر عنه بالنسبة المئوية للتأثير المخيلي (chelating effect%).

يتضح من الشكلين 9 و 10 أن النسبة المئوية للتأثير المخيلي للمركبين PG-ZnO النانوي و المركب PG الحر كانت متقاربة إذ بلغت (15.77 و 15.34) %، على التوالي عند أعلى تركيز تم استخدامه من هذه المركبات و البالغ 1ملغم/مل. و إذ ما أخذنا بنظر الاعتبار ان المركب النانوي متكون من المركب PG + المركب ZnO فهذا يعني انه تم استخدام تركيز اقل من المضاد PG في حالته النانوية مقارنة بالمضاد PG الحر مما يقود الى الاستنتاج بأن المركب النانوي PG-ZnO كان أكفاً من حيث فعله المضاد للأكسدة.

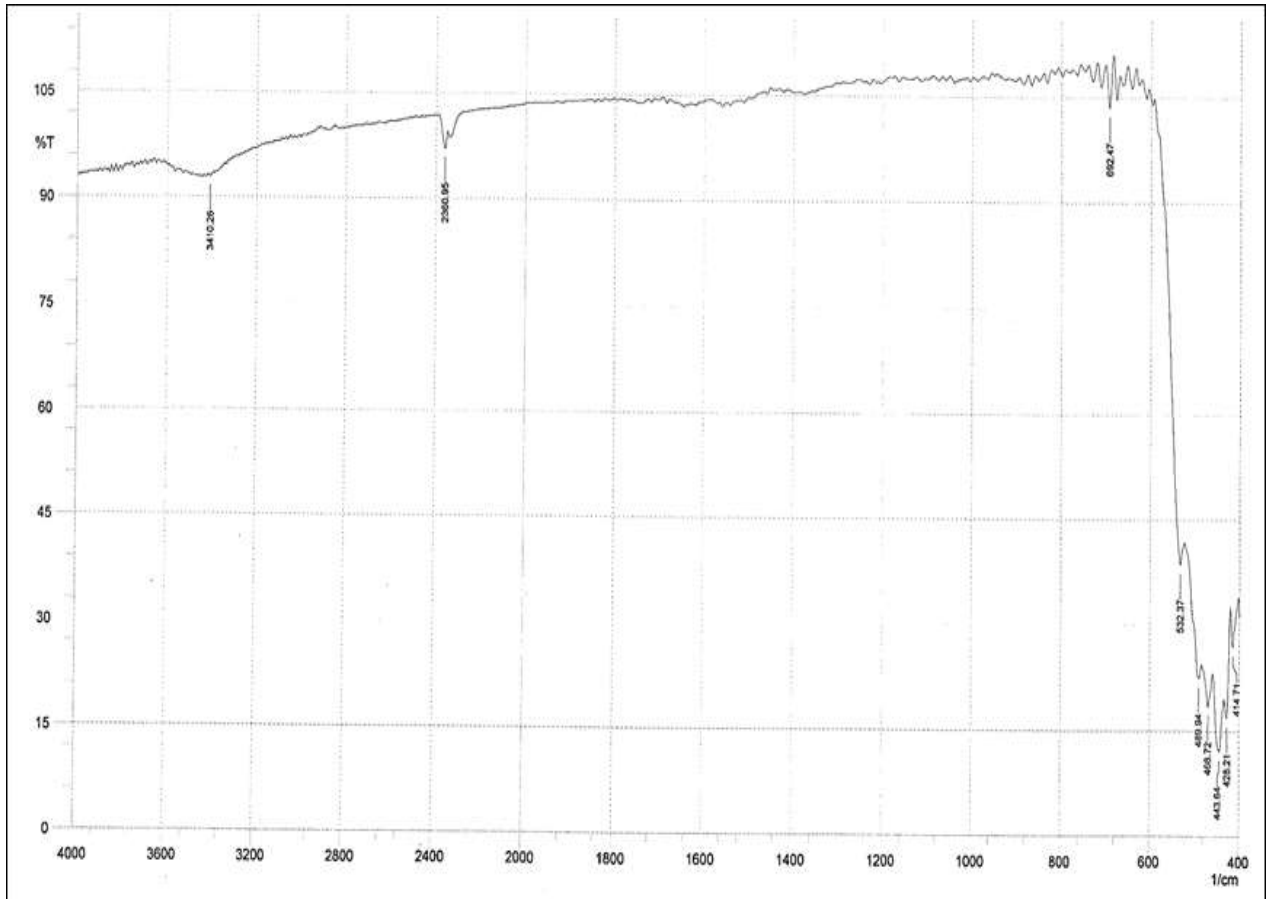
و من ملاحظة الشكل 11 يتضح أن النسبة المئوية للتأثير المخيلي للمركب القياسي BHA كانت 30.43 % و هي أعلى منها في حالتي المركب النانوي PG-ZnO و المركب PG الحر.

تتفق نتائج دراستنا الحالية مع نتائج الدراسة التي قام به (10) إذ وجد أن عملية إقحام جزيئات الفلافونويد مثل Catechin و Quercetin الى الدقائق النانوية لبوليمر PLGA تزيد من قابليتها المخيلية تجاه أيون الحديدوز مقارنة مع جزيئات الفلافونويد الحرة و يعود السبب في ذلك الى أن الدقائق النانوية لبوليمر PLGA توفر الحماية لجزيئات الفلافونويد مما يجعلها ثابتة و مستقرة أثناء التفاعل مما يزيد من قابليتها المخيلية.

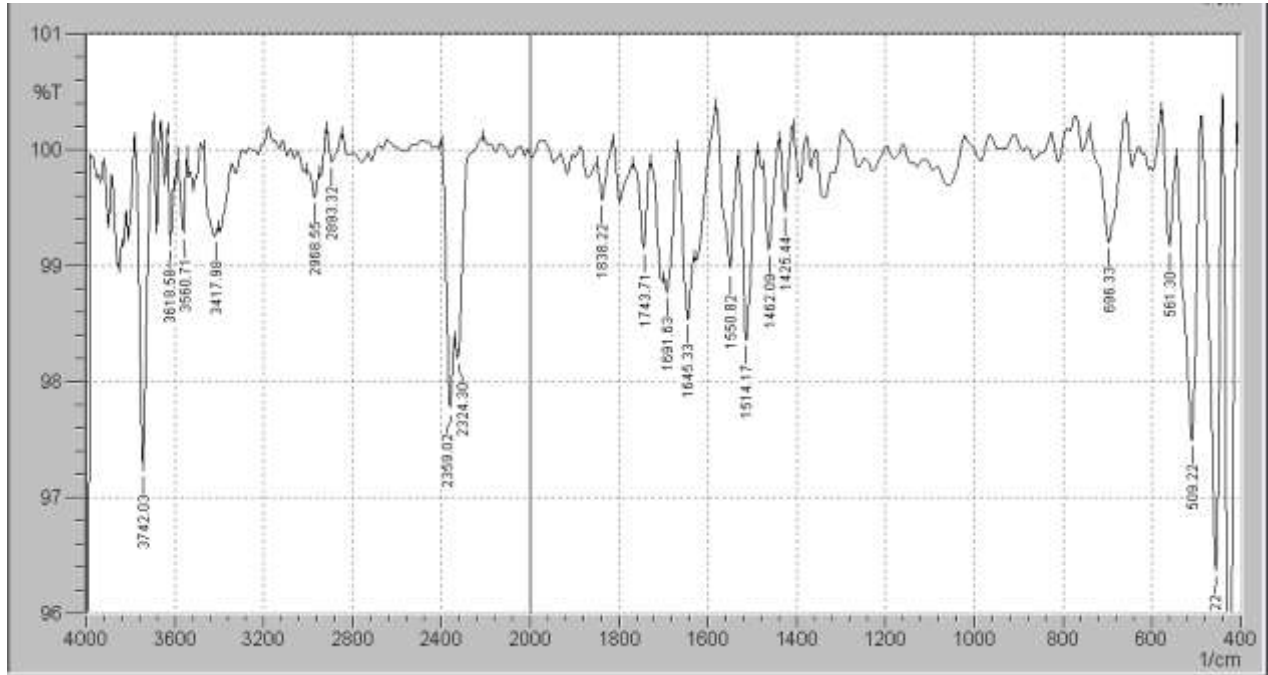
تعد طريقة الفعالية المخيلية لأيون الحديدوز من الطرائق الشائعة التي تستخدم لتحديد فعالية مضادات الأكسدة الثانوية من خلال مراقبة اختزال اللون الأرجواني لمحلول التفاعل ، إذ تستند آلية الفحص على الانخفاض في امتصاص المعقد Fe(II)-Ferozine عند الطول الموجي 562 نانوميتر إذ ان الانخفاض الكبير يشير الى القوة الخيلية العالية التي تمتلكها مضادات الأكسدة . و من خلال تكوين المعقد المستقر Fe(II)- chelate فإن تركيز أيونات الحديدوز سوف يختزل مما يقود الى خفض درجة تفاعل فنتون (Fenton reaction) الذي يساهم في حدوث العديد من الأمراض (9) .



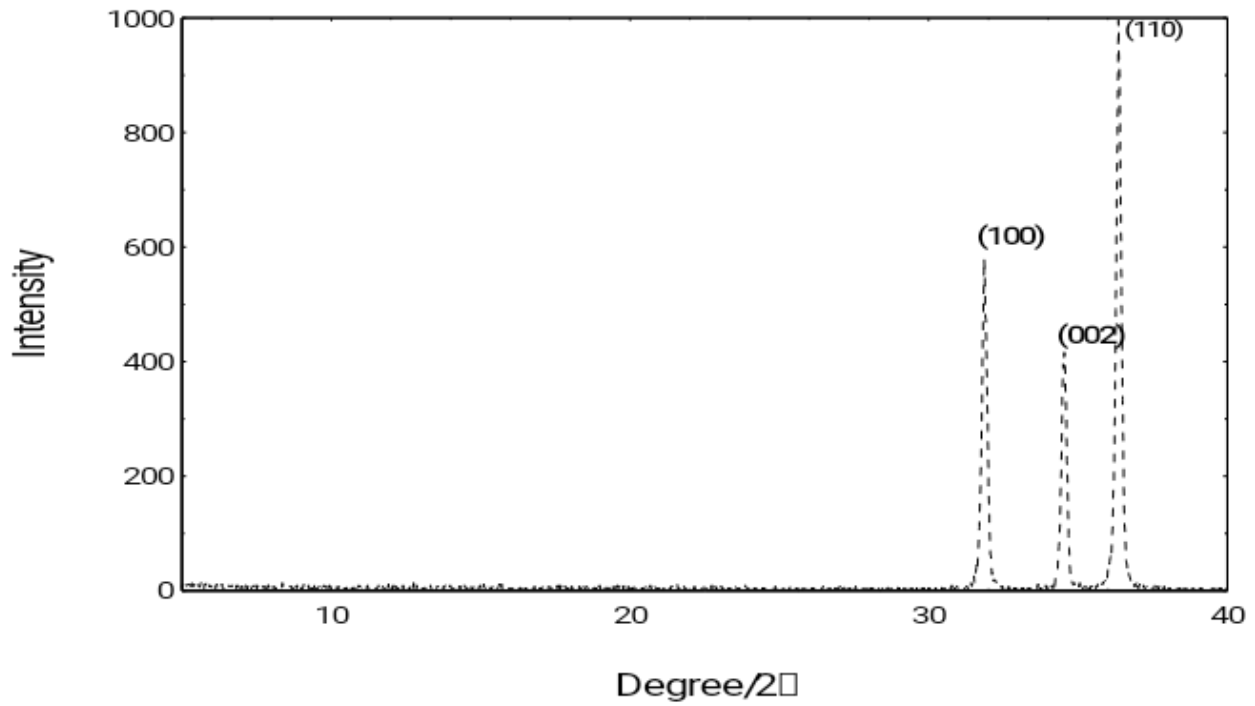
الشكل 1: طيف الأشعة تحت الحمراء لمضاد الأكسدة PG.



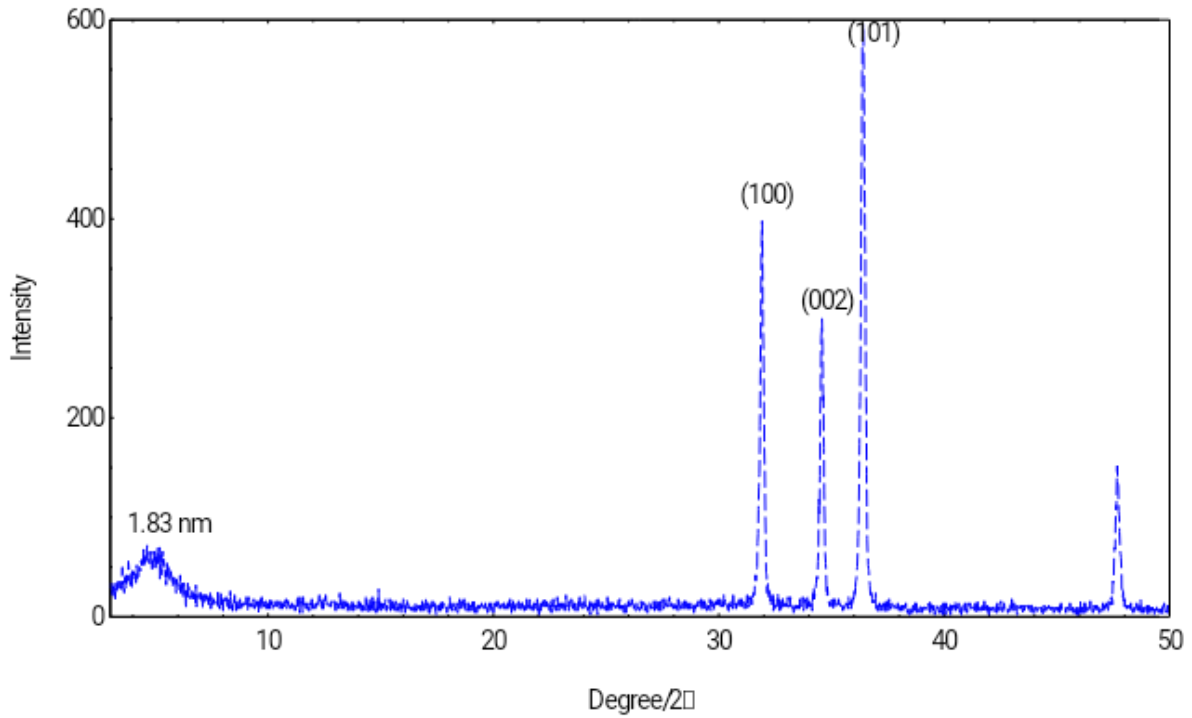
الشكل 2: طيف الأشعة تحت الحمراء لطبقات أكسيد الزنك.



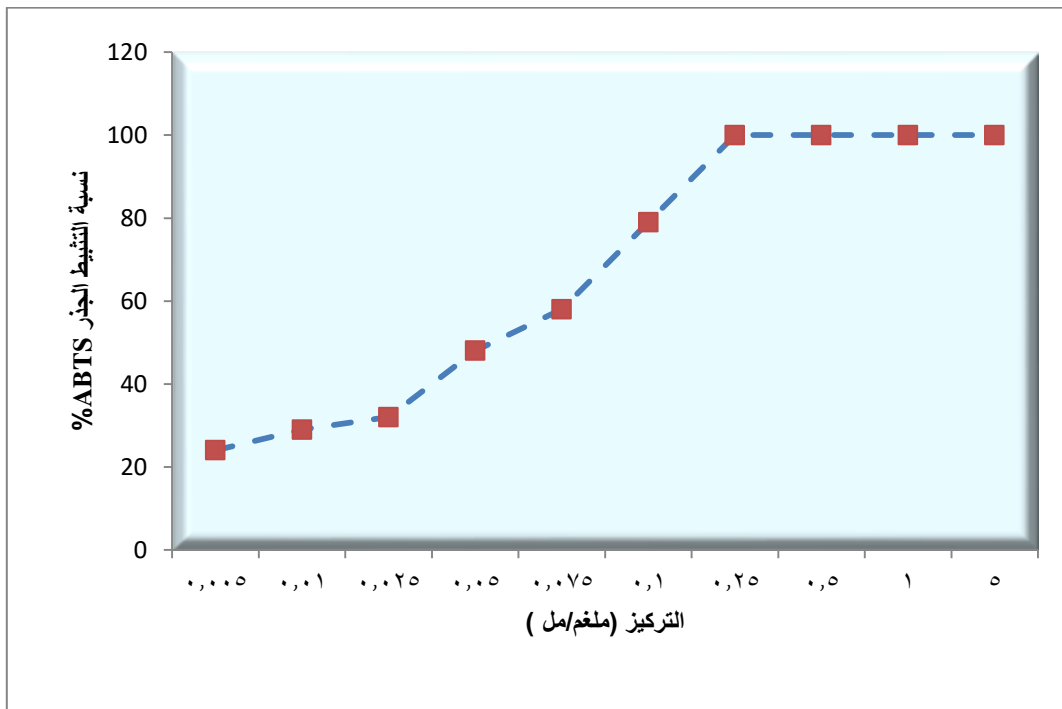
الشكل 3: طيف الأشعة تحت الحمراء لمضاد الأكسدة الهجين PG-ZnO.



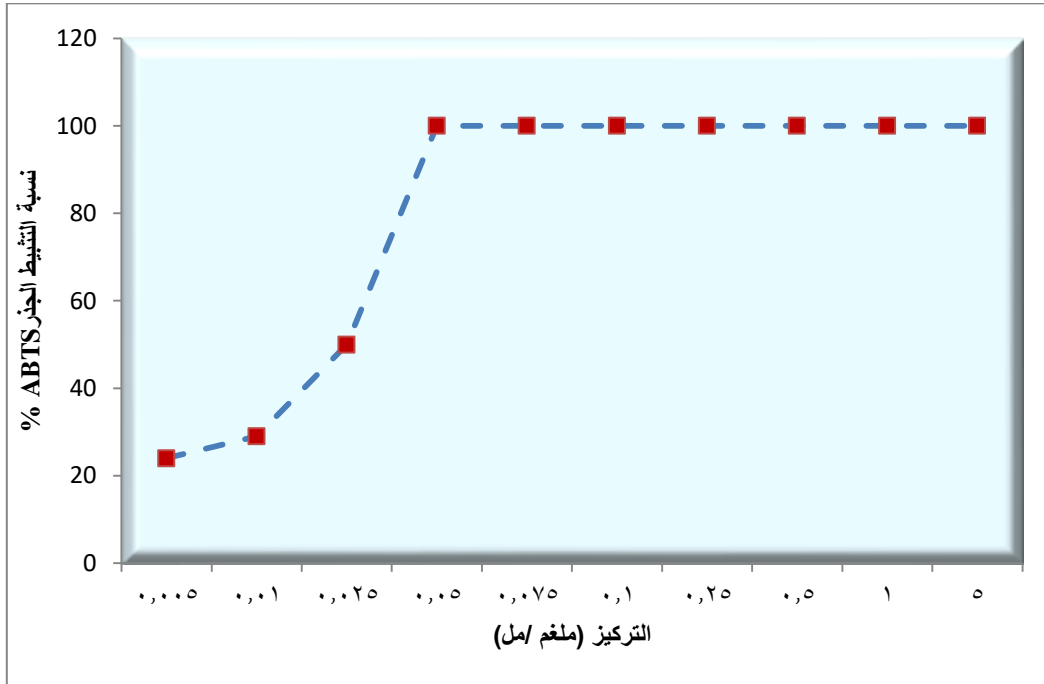
الشكل 4: طيف حيود الأشعة السينية (XRD) لطبقات أكسيد الزنك.



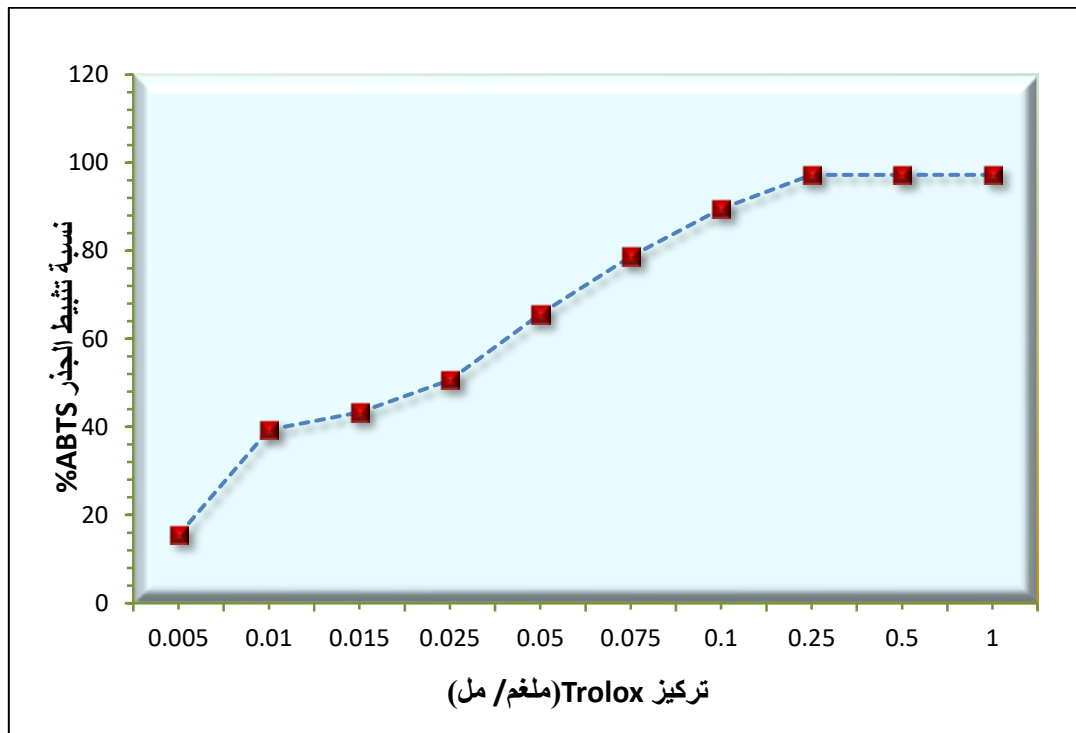
الشكل 5: طيف حيود الأشعة السينية (XRD) لـ PG-ZnO.



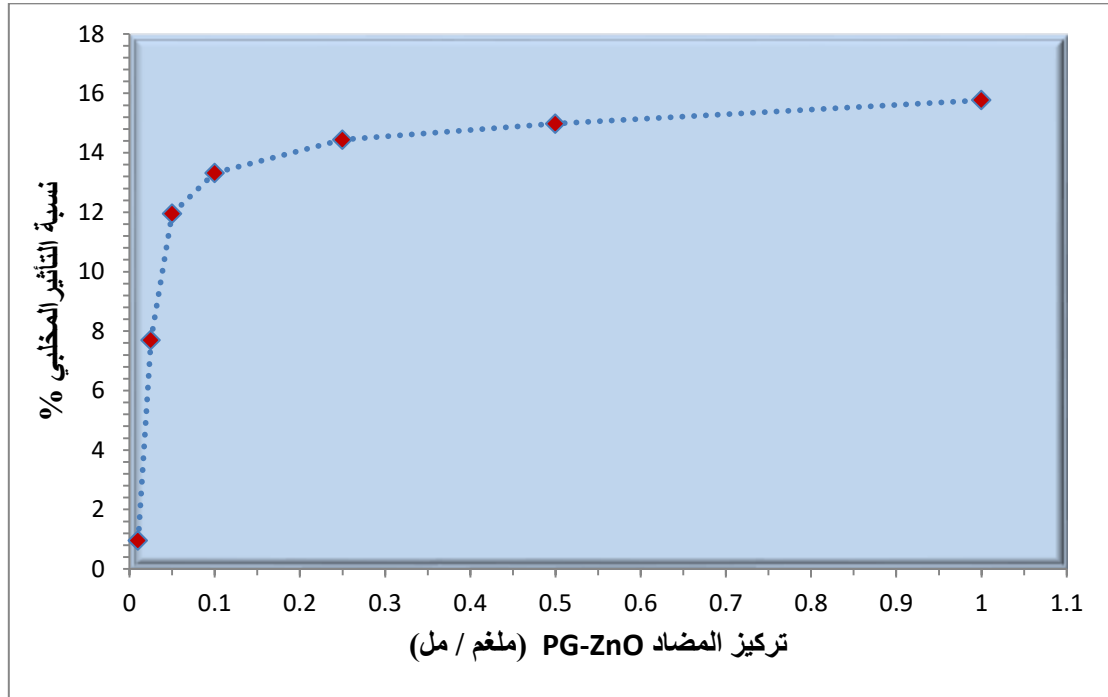
الشكل 6: الفعالية المضادة للأكسدة للمركب PG-ZnO بطريقة كسح الجذور الحرة.



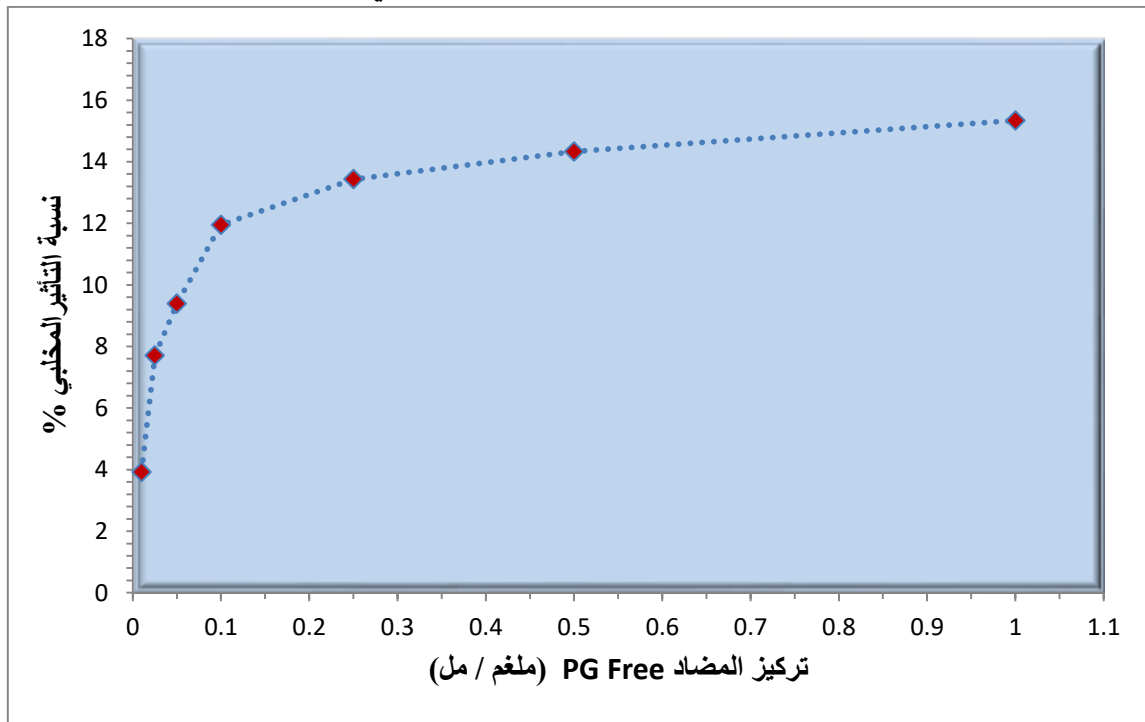
الشكل 7: الفعالية المضادة للأكسدة للمركب PG الحر بطريقة كسح الجذور الحرة



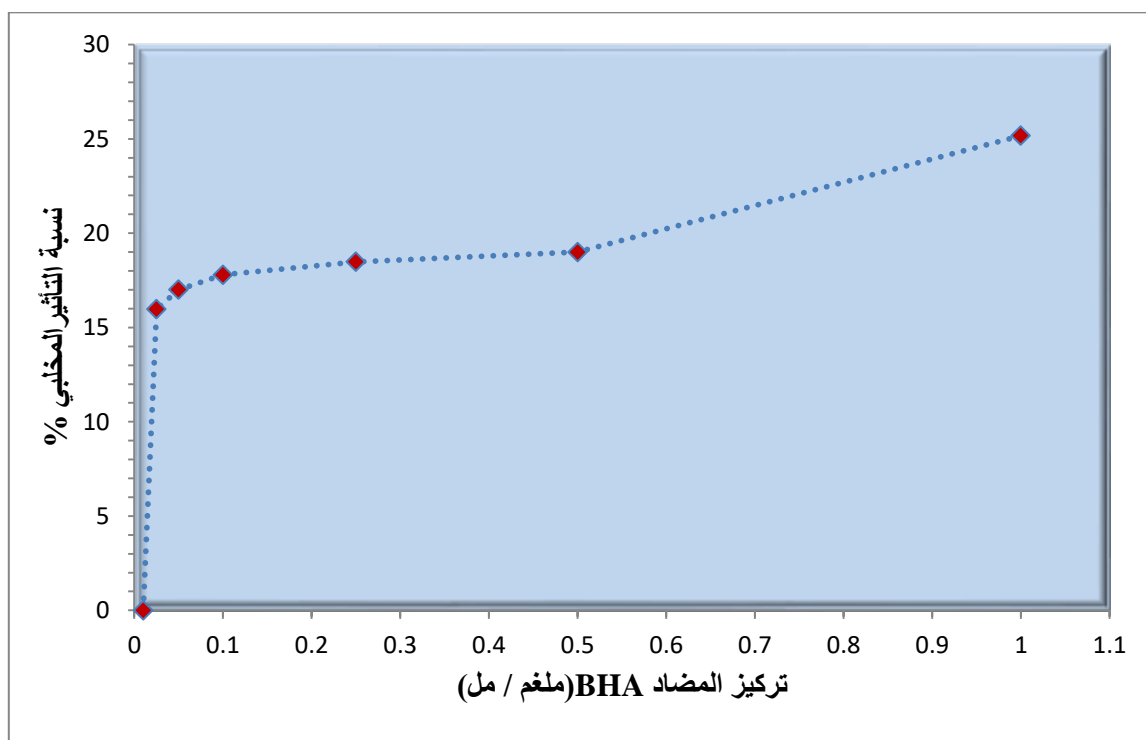
الشكل 8: الفعالية المضادة للأكسدة لمركب Trolox بطريقة كسح الجذور الحرة



الشكل 9: الفعالية المضادة للأكسدة للمضاد النانوي الهجين PG-ZnO بطريقة الفعالية المخلبية لأيون الحديدوز



الشكل 10: الفعالية المضادة للأكسدة للمضاد PG الحر بطريقة الفعالية المخلبية لأيون الحديدوز



الشكل 11: الفعالية المضادة للأوكسدة للمضاد القياسي BHA بطريقة الفعالية المخلبية لأيون الحديدوز

Reference:

- 1- Alnokkari, A.A., Mounir; R.M. and Alassaf ,Z. (2014) Determination of Propyl Gallate in some vegetable oil samples by Thin Layer Chromatography-Image Analysis Method .Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.,26 (2),May-June 2014; Article No.46, Pages: 268-272.
- 2- Bashi, A.M.; Haddawi, S.M. and Mezaal, M.A. (2013) Layered Double Hydroxide Nanohybrid Intercalation with Folic Acid Used as Delivery System their Controlled Release Properties. Arab J Sci Eng . 38:1663-1680.
- 3- Budrat,P.and Shotipruk,A.(2008) Extraction of phenolic compounds from fruits of Bitter Melon(Momordica charantia) with subcritical water extaction and antioxidant activities of these extracts.*Chiang Mai J.Sci.* ;35(1):123-130.
- 4- Court, A. (2008) The Relevance for Food Safety of Applications of Nanotechnology in the Food and Feed Industries. Food Safety Authority of Ireland.
- 5- Gutiérrez-Larraínzar, M.; Rúa, J.; Arriaga, D.D.; Valle, P.D. and García-Armesto, M.R. (2012) In vitro assessment of synthetic phenolic antioxidants for inhibition of foodborne Staphylococcus aureus, Ba-

cillus cereus and Pseudomonas fluorescens . Food Control,30: 393-399.

- 6- **Kolekar ,T.V.;Yadav,H.M.; Bandgar, S.S. and Deshmukh, P.Y.(2011)** Synthesis By Sol-gel Method And Charactrization of ZnO Nanoparticals. Indian Stream Research Journal, Vol.I, Issue.I, DOI : 10.9780/22307850.
- 7- **Lim, Y.Y.; Lim, T.T. and Tee, J.J. (2007)** Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study. Food Chemistry. 103 : 1003-1008
- 8- **Marc, F.; Davin, A.; Deglène-Benbrahim, L.; Ferrand, C. and Baccaunaud M. (2004)** Studies of several analytical methods for antioxidant potential evaluation in food. Med Sci. 20: 458-463.
- 9- **Othman, S.F.C.; Idid, S.Z.; Koya, M.S.; Rehan, A.M. and Kamarudin, K.R. (2011)** Antioxidant Study of Garlic and Red Onion: A Comparative Study. Pertanika J. Trop. Agric. Sci, 34 (2): 253 - 261
- 10- **Pool, H.; Quintanar, D.; Figueroa, J.D.; Mano, C.M.; Etelvino, J.; Bechara, H.; Godinez, L.A. and Mendoza, S.(2012)** Antioxidant Effects of Quercetin and Catechin Encapsulated into PLGA Nanoparticles. Journal of Nanomaterials, p 1-12.
- 11- **Race, S. (2009)** The truth about BHA, BHT, TBHQ and other antioxidants used as food additives.Tigmor books,ISBN:9781907119002.
- 12- **Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J. and Paganga, G. (1996)** Structureeantioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Biology and Medicine. 20:933-956.
- 13- **Silverstein, R.M.;Webster, F.X. and Kiemle, D.J.(2005)** “Spectrometric Identification of organic compounds “ 7th Ed. John Wiley & Sons . INC. Printed in the United States of America .
- 14- **Yanishlieva, N.; Marinova, E. M.; Gordon, M. H. and Raneva, V. G. (1999)** Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. Food Chemistry. 64:59-66.
- 15- **Yilmaz , Y. (2002)** Antioxidant activities of grape skin and grape seed polyphenolics and potential use of antioxidants in food as a functional food ingredient Ph. D. dissertation. Athens , Georgia.