

بررسی قدرت و مکانیسم فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات پلی‌فنولی تاکسی‌فولین، مورین و کورکومین

افسانه روشن‌فکر، مانده محلوجی و عارفه سید عربی*

ایران، تهران، دانشگاه تهران، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، گروه بیوشیمی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۲۲

چکیده

استرس اکسیداتیو پدیده‌ای است که در نتیجه‌ی افزایش بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن ایجاد شده و روی فعالیت طبیعی آنزیم‌ها، پروتئین‌ها، سلول‌ها و حتی اندام‌های موجود زنده، اثر تخریبی می‌گذارد. مطالعات گذشته‌ی بسیاری از محققان، بیان‌گر اهمیت استفاده از ترکیبات طبیعی و عمدتاً گیاهی مانند پلی‌فنول‌ها، به عنوان راه‌کاری ایمن در توقف بروز اثرات مخرب استرس اکسیداتیو است. مکانیسم نحوه‌ی فعالیت غیر آنزیمی این ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، در اغلب موارد به گروه‌های هیدروکسیل متصل به حلقه بنزن یا آروماتیک، با اهدای اتم هیدروژن به رادیکال‌های آزاد نسبت داده می‌شود که در نهایت باعث مهار و خنثی‌سازی گونه‌های فعال اکسیژن می‌شوند. در این مقاله، قدرت آنتی‌اکسیدانی سه ترکیب پلی‌فنولی شامل تاکسی‌فولین، مورین و کورکومین، در تقابل با ترکیب شیمیایی DPPH به عنوان رادیکال آزاد و بررسی تغییر میزان جذب آن طی واکنش با این ترکیبات گیاهی در یک غلظت پایین و مشخص، با استفاده از دستگاه ایزا ریدر فلورسانس H4، نرم‌افزارهای OriginLab، Excel و Graph Pad Prism مورد بررسی قرار گرفت و درصد مهار DPPH سنجیده شد. طبق نتایج به‌دست‌آمده، تاکسی‌فولین به دلیل دارا بودن گروه‌های متعدد هیدروکسیل متصل به حلقه‌های فنولی و اتم‌های اکسیژن متصل به حلقه هتروسیکلیک (حلقه C) وجود آرایش فضایی اتم‌های هیدروژن در این حلقه، بالاترین قدرت آنتی‌اکسیدانی را نشان داد و به دنبال آن کورکومین و مورین در مراتب بعدی قرار گرفتند. داده‌های این پژوهش، بر اهمیت مصرف محصولات گیاهی مغذی، مانند مرکبات و مغزهای خوراکی و همچنین ادویه‌های توصیه شده در طب سنتی، مانند زردچوبه، بیش از پیش تاکید می‌کند.

واژه‌های کلیدی: ترکیبات پلی‌فنولی؛ فعالیت آنتی‌اکسیدانی؛ تاکسی‌فولین؛ مورین؛ کورکومین

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۶۶۹۵۶۹۷۴، پست الکترونیکی: a.seyedarabi@ut.ac.ir

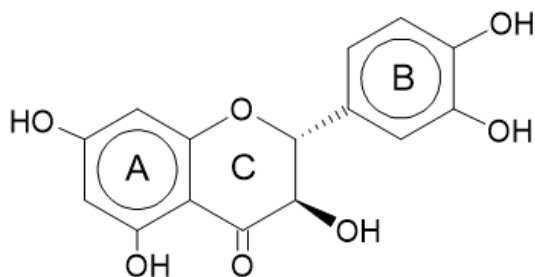
مقدمه

ماکرومولکول‌های زیستی؛ یعنی پروتئین‌ها، لیپیدها، کربوهیدرات‌ها و DNA را دارند. به ترکیباتیکه اکسیدان‌ها را از بین می‌برند، آن‌ها را مهار می‌کنند، تشکیل آن‌ها را سرکوب کرده و یا مخالف عملکرد آن‌ها کار می‌کنند، آنتی‌اکسیدان می‌گویند. در یک سلول نرمال، تعادل مناسبی بین پرو-اکسیدان‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها وجود دارد. اگر این تعادل به سمت اکسیدان‌ها برود، چه از طریق افزایش گونه‌های فعال اکسیژن و چه از طریق کاهش سطح

اکسایش زیستی، ترکیبی از تغییرات اکسایش-کاهش مواد در موجودات زنده است. واکنش‌های اکسایش-کاهش، واکنش‌هایی هستند که با تغییر در حالت اکسیداسیون اتم‌ها از طریق جا به جایی الکترون‌ها بین آن‌ها اتفاق می‌افتد. ترکیبات شیمیایی و واکنش‌هایی که پتانسیل تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و یا رادیکال‌های آزاد را دارند، به عنوان «پرو-اکسیدان» شناخته می‌شوند (18). اکسیدان‌ها و رادیکال‌های آزاد، نیمه‌عمر بسیار کوتاهی دارند، بسیار واکنش‌پذیر هستند و توانایی ایجاد آسیب‌های جدی به

در این مقاله، سه آنتی‌اکسیدان فنولی؛ یعنی، تاکسی‌فولین (Taxifolin) و مورین (Morin)، به عنوان نماینده‌های گروه فلاونوئیدها و کورکومین (Curcumin)، به عنوان نماینده‌ی گروه غیرفلاونوئیدها از نظر قدرت مهار یک ترکیب رادیکال، به نام 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH)، مورد بررسی قرار گرفته‌اند.

تاکسی‌فولین: تاکسی‌فولین یا دی‌هیدروکوئرستین (شکل ۱)، یک فلاونونول، زیرگروه فلاونوئیدها است. این ترکیب برای اولین بار از صنوبر داگلاس (*Pseudotsuga taxifolia*) استخراج شد و در مرکبات و پیاز، به فراوانی یافت می‌شود (24,25). تاکسی‌فولین به عنوان یک بازدارنده اثرات مخرب اکسیدان‌ها از بسیاری بیماری‌ها از جمله دیابت، چاقی، بیماری‌های متابولیک زمینه‌ساز بیماری‌های عصبی جلوگیری می‌کند و کاهش‌دهنده‌ی قند، اوریک اسید، فشار و کراتینین خون می‌باشد (21,23). آنالیز شیمیایی تاکسی‌فولین تایید می‌کند که این ترکیب در دو فرم سیس و ترانس وجود دارد (24). ساختار پایه‌ای تاکسی‌فولین از دو گروه فنیل (حلقه A و B) که به وسیله‌ی حلقه‌ی هتروسیکلیک (حلقه C) به یکدیگر متصل شده‌اند، تشکیل شده است (6). حضور گروه‌های هیدروکسیل ۵ و ۷ با عملکرد 4-oxo در حلقه‌های A و C مسئول اثر رادیکال هستند و پایداری توسط ساختار O-دی‌هیدروکسی در حلقه B ایجاد می‌شود (22).



شکل ۱- ساختار شیمیایی تاکسی‌فولین

مورین: مورین یا ۳،۵،۷،۲'،۴'-پنتاهیدروکسی‌فلاون (شکل ۲) یک ماده‌ی کریستالی زرد رنگ است که از چوب درخت شاه‌توت (*Chlorophora tinctoria*) استخراج

آنتی‌اکسیدان‌ها، استرس اکسیداتیو ایجاد می‌شود (13). استرس اکسیداتیو، عامل و یا تشدیدکننده‌ی علائم بسیاری از اختلالات و بیماری‌ها، مانند بیماری‌های قلبی-عروقی، دیابت شیرین، بیماری‌های مخرب سیستم عصبی، مانند آلزایمر و پارکینسون و حتی سرطان، شناخته شده است (16).

مواد آنتی‌اکسیدان موجود در بدن انسان از نظر خاستگاه، به دو دسته‌ی کلی منشا درونی (تولید در بدن و توسط سلول‌ها) و منشا بیرونی (از طریق تغذیه) تقسیم می‌شوند. آنزیم‌هایی مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و ترکیبات غیر آنزیمی مانند ویتامین E، گلوتاتیون، پروتئین آلبومین و رنگ‌دانه‌های کاروتنوئید در شبکه‌ی چشم، توسط سلول‌های بدن انسان برای مبارزه با افزایش بیش از حد اکسیدان‌ها ساخته می‌شوند. آنتی‌اکسیدان‌های با منشاء خوراکی، به طور عمده ترکیبات گیاهی هستند و شامل ویتامین‌ها (مانند ویتامین C و ویتامین E)، مواد معدنی (مانند منیزیم، مس و روی) و متابولیت‌های ثانویه (مانند آلکالوئیدها، ترپنوئیدها، کاروتنوئیدها و مهم‌تر از همه، ترکیبات فنولی) هستند (10,14,16).

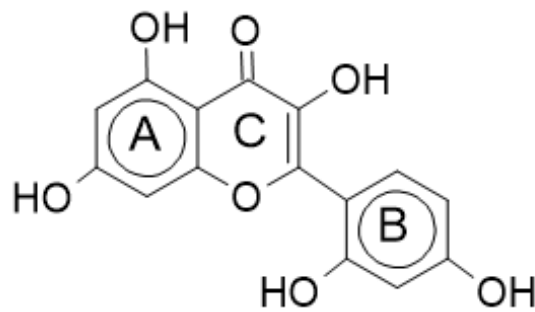
ترکیبات فنولی (پلی‌فنول‌ها)، به دو دسته‌ی کلی فلاونوئیدها و غیرفلاونوئیدها تقسیم می‌شوند. از نظر شیمیایی، ساختار کلی فلاونوئیدها دارای یک اسکلت ۱۵کربنی است که شامل دو حلقه فنیل (A و B) و یک حلقه هتروسیکلیک (C، حلقه حاوی اکسیژن متصل) است (15).

غیرفلاونوئیدها از ساختارهای پیچیده‌تر و متنوع‌تری تشکیل شده‌اند و به طور کلی، حداقل یک حلقه‌ی بنزن دارند که یک اتم اکسیژن و یا گروه هیدروکسیل به این حلقه، متصل شده است. از مهمترین زیرگروه‌های این دسته از پلی‌فنول‌ها، می‌توان به فنولیک‌اسیدها، استیلبن‌ها، لیگنان‌ها و کورکومینوئیدها اشاره کرد.

مکانیسم ترمودینامیکی مطلوب، به محیط واکنش بستگی دارد و به نظر می‌رسد که مورین در آب، DMSO و همچنین در اتانول از طریق مکانیسم SPLET (انتقال الکترون از دست دادن پروتون متوالی) فعالیت آنتی‌اکسیدانی خود را نشان می‌دهد (5,17).

کورکومین: کورکومین یا Diferuloylmethane (شکل ۳)، ماده‌ی موثره‌ی ادویه زردچوبه (*Curcuma longa* Linn) است. این ادویه‌ی زرد رنگ که از ریزوم گیاه گرفته می‌شود، سابقه‌ی طولانی استفاده در داروهای سنتی چین و هند را دارد. ریزوم زردچوبه به صورت پودر خرد شده بیش از ۲۰۰۰ سال در آشپزی آسیایی، دارو، لوازم آرایشی و رنگ‌آمیزی پارچه استفاده می‌شود. تحقیقات نشان داده است که کورکومین ماده‌ای فعال در درمان‌های گیاهی بوده و دارای طیف وسیعی از خواص مفید از جمله خواص ضد التهابی، آنتی‌اکسیدانی و شیمی‌درمانی است. این فعالیت‌ها هم در سلول‌های کشت شده و هم در مدل‌های حیوانی نشان داده شده است و راه را برای آزمایشات بالینی در حال انجام روی انسان هموار کرده است (11). توانایی کورکومین در تحت تأثیر قرار دادن طیف وسیعی از اهداف مولکولی در سلول یا نفوذ به ساختار دو لایه چربی، آن را به کاندید احتمالی مناسبی برای درمان بیماری‌های ویروسی یا مهار مکانیسم‌های پاتولوژیک شایع بسیاری از بیماری‌های مزمن که همراه با استرس اکسیداتیو و التهاب شناخته می‌شوند، تبدیل می‌کند. کورکومین با افزایش تاثیرات زیستی Nrf2 می‌تواند التهاب و شدت طوفان سایتوکاینی ناشی از بیماری پاندمی COVID-19 ایجاد شده از عفونت ویروس SARS-CoV-2 را کاهش دهد و همچنین با کاهش بیان گیرنده‌ی آنزیم تبدیل‌کننده‌ی آنژیوتانسین ۲ در سلول‌های تنفسی، نقش حیاتی در جلوگیری ورود SARS-CoV-2 به سلول‌های میزبان را ایفا کند (19).

می‌شود. این ماده، یک فلاونول (یکی از زیرگروه‌های فلاونوئیدها از ترکیبات فنولی) دارای فعالیت‌های بیولوژیکی و آنتی‌اکسیدانی است که در خانواده‌ی *Moraceae* در توت سفید (*Morus alba*) و انجیر (*Ficus carica*)، در بادام (*Prunus dulcis*) از خانواده *Rosaceae*، در شاه بلوط شیرین (*Castanea sativa*) از خانواده *Fagaceae* و بسیاری گیاهان و میوه‌های دیگر وجود دارد. مورین یک مولکول آمفی‌پاتیک است؛ زیرا حلقه‌های فنیل، نمایان‌گر قسمت آب‌گریز مولکول و گروه‌های هیدروکسیل، تشکیل‌دهنده‌ی بخش آب‌دوست هستند. گروه‌های هیدروکسیل قطبی می‌توانند به عنوان اهداکننده و/یا پذیرنده‌ی پیوند هیدروژنی عمل کنند در حالی که اتم‌های اکسیژن بخش بنزو-گاما-پیرون می‌توانند به عنوان گیرنده‌ی پیوند هیدروژنی عمل کنند. به دلیل قطبیت پایین، مورین در محیط آبی حلالیت کمی دارد (در محدوده‌ی میکرومولار). طیف بسیار گسترده‌ای از عملکردهای بیولوژیکی/ دارویی مورین از جمله خواص آنتی‌اکسیدانی، فعالیت بازدارندگی زانتین اکسیداز، خواص ضد التهابی، فعالیت ضد سرطانی، اثر محافظتی بر آسیب DNA ناشی از رادیکال‌های آزاد و جلوگیری از اکسیداسیون لیپوپروتئین کم-چگالی گزارش شده است (12,17). علی‌رغم فقدان ساختار کاتکول (o-dihydroxy) حلقه B، که به عنوان پیش‌شرط اصلی برای مهار رادیکال آزاد شناخته می‌شود، فعالیت مورین با فلاونوئیدهای دارای ۲، ۴-دی‌هیدروکسی در حلقه B قابل مقایسه است.



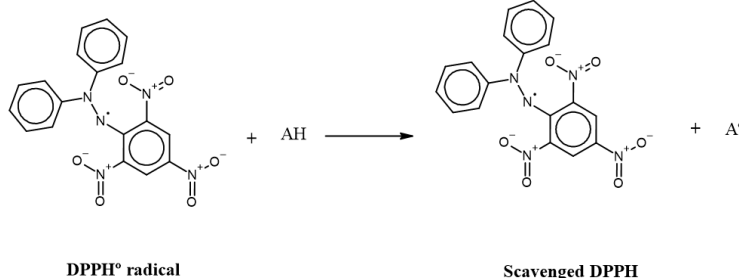
شکل ۲- ساختار شیمیایی مورین.

گرفته شد. در نتیجه، غلظت انتخاب شده می‌تواند به دوز مصرفی مناسب ترکیبات تاکسی‌فولین، مورین و کورکومین نزدیک باشد.

مواد و روشها

واکنش‌گرها و مواد شیمیایی: کیت DPPH ساخت شرکت Zantox، کورکومین ساخت شرکت Merck، مورین و تاکسی‌فولین ساخت شرکت Sigma هستند.

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌رادیکالی به روش DPPH: با استفاده از روش ارزیابی فعالیت مهار رادیکال DPPH (شکل ۴) بصورت سه بار تکرار فعالیت آنتی‌اکسیدانی تاکسی‌فولین، مورین و کورکومین ارزیابی شد.



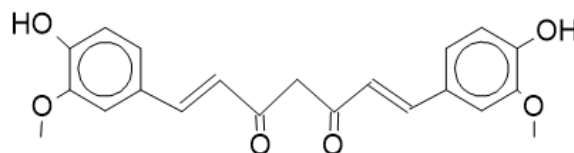
شکل ۱- مهار رادیکال DPPH توسط آنتی‌اکسیدان.

آنتی‌اکسیدان در عدم حضور حلال، با استفاده از معادله ۱ محاسبه شد:

$$\text{درصد مهار DPPH} = 100 * (A_{\text{DPPH}} - A_{\text{Sample}}) / A_{\text{Sample}}$$

معادله ۱. نحوه‌ی محاسبه‌ی قدرت مهار رادیکال DPPH توسط ترکیبات مورد مطالعه. A_{DPPH} : جذب DPPH بدون نمونه در زمان صفر، A_{Sample} : جذب DPPH در حضور آنتی‌اکسیدان بعد از ۴۰ دقیقه.

مکانیسم عمل آنتی‌اکسیدانی ترکیبات تاکسی‌فولین، مورین، کورکومین و ترلوکس (به عنوان استاندارد) با استفاده از نرم‌افزار ACD/ChemSketch ترسیم و نمایش داده شده است.



شکل ۳- ساختار شیمیایی کورکومین.

قدرت آنتی‌اکسیدانی پلی فنول‌ها به عوامل مختلفی از جمله تعداد و موقعیت قرارگیری گروه‌های هیدروکسیل متصل به حلقه بنزن، میزان حل‌شوندگی در حلال مناسب خود و محیط پیرامون آن‌ها بستگی دارد که در اینجا با در نظر گرفتن همه این موارد، قدرت آنتی‌اکسیدانی هر یک از این ترکیبات به تنهایی و نسبت به هم ارزیابی شده است. پس از رقیق سازی این ترکیبات در غلظت‌های مختلف، کمترین غلظت و نزدیک‌ترین غلظتی که این ترکیبات رفتار آنتی‌اکسیدانی معنی داری نسبت به هم نشان دادند در نظر

در ابتدا ۱۰ میکرولیتر از هر یک از ترکیبات حل شده در اتانول به غلظت ۶۲/۵ میکرومولار در ۲۵۰ میکرولیتر از محلول DPPH حل شد و به مدت ۴۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی قرار داده شد. سپس به منظور ارزیابی قدرت واکنش و فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات، جذب واکنش‌ها با استفاده از دستگاه الیزا ریدر فلورسانس (Synergy H4 (Bio Tek, USA) در طول موج ۵۱۷ نانومتر گرفته شد. ترلوکس موجود در کیت (رقیق سازی شده با آب دیونیزه در غلظت‌های ۰، ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰) به عنوان محلول استاندارد در نظر گرفته شد.

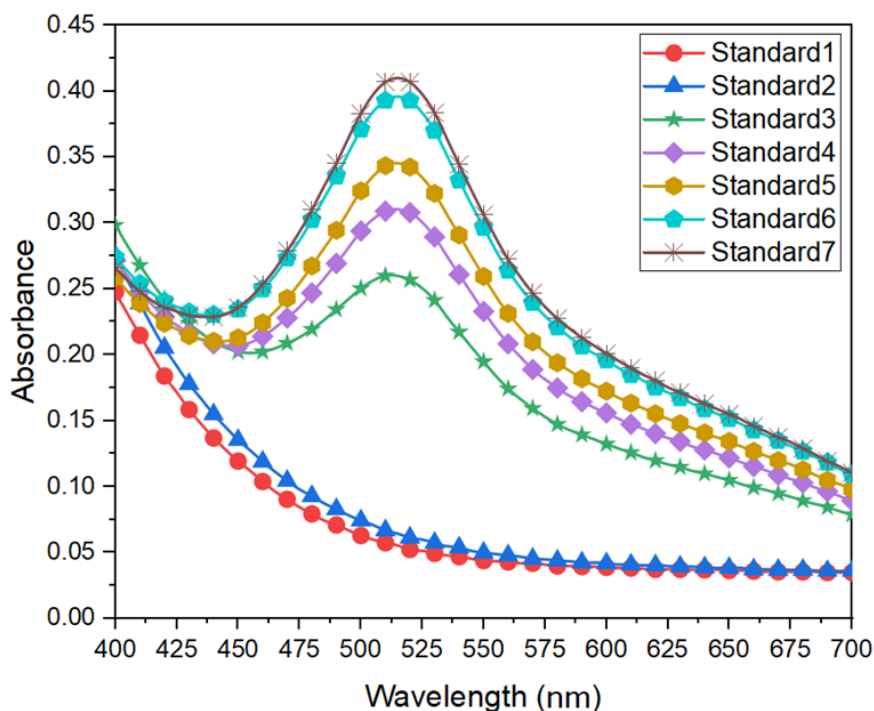
درصد مهار رادیکال DPPH با کسر جذب حلال از جذب آنتی‌اکسیدان حل شده در اتانول به منظور بررسی فعالیت

نتایج

ابتدا ترولوکس به عنوان استاندارد در غلظت‌های ۱۰۰۰-۰ میکرومولار (رقت استاندارد ۱، حاوی ۱۰۰۰ میکرومولار از ترولوکس (بیشترین غلظت) و رقت استاندارد ۷، بدون ترولوکس (فقط حاوی آب دیونیزه)، آماده شد و محلول DPPH به هر یک از رقت‌ها افزوده شد. پس از ۴۰ دقیقه، طیف جذب DPPH، اندازه‌گیری و نمودار آن رسم شد (شکل ۵).

آنالیز آماری: میانگین و انحراف معیار با استفاده از نرم افزار Excel 2016 محاسبه شد، نمودار خطی با استفاده از نرم‌افزار Origin(Pro),version 2021 رسم شد و نمودارستونی آنها، درصد مهار رادیکال DPPH و همچنین p-value از طریق نرم افزار Graph Pad Prism (version 9.0.0) بدست آمد.

رسم ساختارهای شیمیایی: ساختارها و واکنش‌های شیمیایی با استفاده از نرم‌افزار ACD/ChemSketch (version 2021.1.2) رسم شدند.



شکل ۲- نمودار تغییر جذب DPPH در حضور محلول استاندارد در رقت‌های ۱۰۰۰ (استاندارد ۱) تا صفر میکرومولار (استاندارد ۷). هر چه رقت استاندارد (ترولوکس) بیشتر باشد، مهار رادیکال DPPH بیشتر شده و شدت جذب آن کمتر می‌شود.

در ادامه، یکی از غلظت‌های سری رقیق‌سازی استاندارد را انتخاب کردیم (استاندارد ۵ با غلظت $62/5 \mu\text{M}$) و پلی‌فنول‌های تاکسی‌فولین، مورین و کورکومین را در این غلظت تهیه کرده و قدرت مهار رادیکال DPPH (و در نتیجه، قدرت آنتی‌اکسیدانی این سه ترکیب) نسبت به هم سنجیده شد. علت انتخاب این غلظت، توجه به دوز مجاز مصرفی این ترکیبات است. مقدار مصرف روزانه‌ی مجاز کورکومین، 3 mg/kg (میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن) بوده (3) که این مقدار را با مقدار حجم خون یک فرد 70 کیلوگرمی (4900 ml) و جرم مولی کورکومین، تناسب بسته و به غلظت $116 \mu\text{M}$ از این ماده می‌رسیم. مقدار مصرف روزانه‌ی مجاز برای تاکسی‌فولین، $0/025 \text{ mg/kg}$ اعلام شده (26) که با استفاده از روش محاسبه‌ی ذکر شده، مقدار $117 \mu\text{M}$ به دست می‌آید. در مقالات، این مقدار برای مورین هنوز به دست نیامده است. بنابراین، به طور کلی به مصرف روزانه‌ی مجاز ترکیبات فنولی توجه شد که

در ادامه، یکی از غلظت‌های سری رقیق‌سازی استاندارد را انتخاب کردیم (استاندارد ۵ با غلظت $62/5 \mu\text{M}$) و پلی‌فنول‌های تاکسی‌فولین، مورین و کورکومین را در این غلظت تهیه کرده و قدرت مهار رادیکال DPPH (و در نتیجه، قدرت آنتی‌اکسیدانی این سه ترکیب) نسبت به هم سنجیده شد. علت انتخاب این غلظت، توجه به دوز مجاز مصرفی این ترکیبات است. مقدار مصرف روزانه‌ی مجاز کورکومین، 3 mg/kg (میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن

اندازه‌گیری شد. میانگین، انحراف معیار، p-value و درصد مهار رادیکال DPPH با استناد به تغییر جذب این رادیکال در طول موج ۵۱۷ نانومتر و با استفاده از معادله ۱ (ذکر شده در قسمت ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌رادیکالی به روش DPPH)، محاسبه شد.

از حدود ۰/۵ mg/kg تا بالاتر از ۱/۵ mg/kg اعلام شده است (۸). محدوده‌ی غلظت بر اساس این دو مقدار برای این سه ترکیب، از ۲۰ تا ۷۰ μM به دست آمد. در نتیجه، غلظت ۶۲/۵ μM مورد استفاده قرار گرفت.

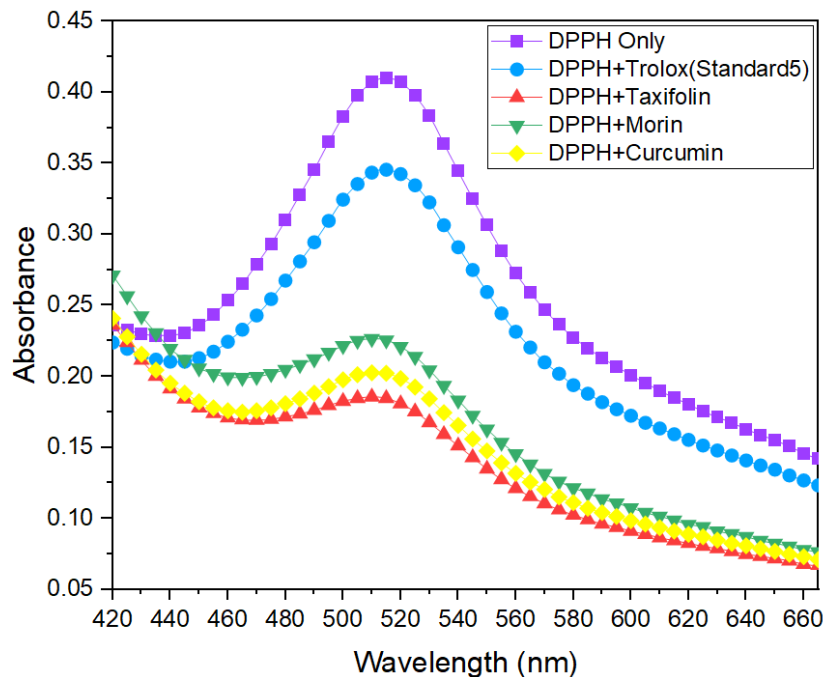
نتایج این بررسی، در جدول ۱ نشان داده شده است. این سه آنتی‌اکسیدان ابتدا در اتانول حل شدند و pH آن‌ها

جدول ۱- اطلاعات مربوط به آنتی‌اکسیدان‌های پلی‌فنولی و عملکرد آن‌ها در برابر رادیکال DPPH

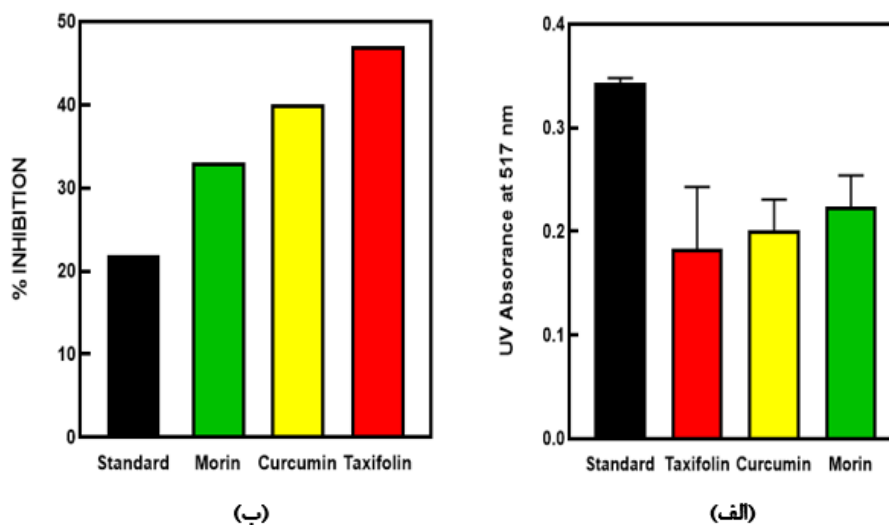
بررسی نتایج جذب در ۵۱۷ نانومتر						
P value	درصد مهار DPPH	انحراف معیار	میانگین	pH	نمونه	پلی‌فنول‌ها
<۰/۰۰۰۱	۲۲	۰/۰۰۵	۰/۳۴۳	۵/۸۴	ترولوکس	استاندارد
۰/۰۰۲۴	۴۷	۰/۰۰۶	۰/۱۸۳	۵/۴۶	تاکسی‌فولین	فلاونوئیدها
۰/۰۰۰۴	۳۳	۰/۰۰۲	۰/۲۲۴	۵/۷۶	مورین	
۰/۰۰۰۲	۴۰	۰/۰۰۳	۰/۲۰۱	۵/۶۶	کورکومین	غیرفلاونوئید

داشته است؛ زیرا جذب DPPH را به میزان بیشتری کاهش داده است.

شکل‌های ۶ و ۷، مقایسه‌ی قدرت آنتی‌اکسیدانی تاکسی‌فولین، مورین و کورکومین نسبت به یکدیگر را نشان می‌دهند که تاکسی‌فولین قدرت آنتی‌اکسیدانی بالاتری



شکل ۳- نمودار مقایسه میانگین کاهش جذب DPPH (که بیانگر قدرت مهار این رادیکال است)، توسط آنتی‌اکسیدان‌های پلی‌فنولی و نمونه‌ی استاندارد ترولوکس.



شکل ۴- نمودار ستونی مقایسه‌ی میانگین جذب DPPH در ۵۱۷ نانومتر و درصد مهار آن توسط تاکسی‌فولین، کورکومین و مورین. (الف) نمودار ستونی مقایسه‌ی میانگین جذب DPPH در حضور تاکسی‌فولین، کورکومین، مورین و استاندارد (ترولوکس) و انحراف معیار آن‌ها؛ میزان جذب با قدرت آنتی‌اکسیدانی نسبت عکس دارد. (ب) نمودار ستونی درصد مهار رادیکال آزاد DPPH توسط ترکیبات پلی‌فنولی.

بحث

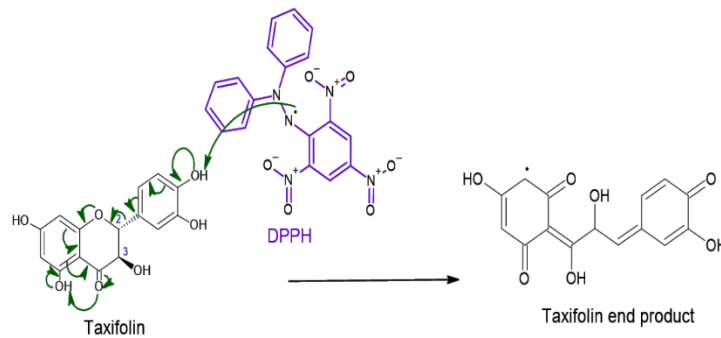
استفاده از ترکیبات گیاهی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی و با هدف دارویی کم‌خطر، ایمن، ارزان و جلوگیری از عوارض جانبی داروهای شیمیایی روز به روز در حال افزایش است و در جوامع بشری مورد توجه قرار گرفته است، بطوریکه مواد اولیه‌ی موجود در آن‌ها در صنعت داروسازی مورد استفاده قرار گرفته‌اند (1,2). عوامل مختلفی در بروز ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی یک ترکیب دخیل است؛ مهمترین عامل، ساختار شیمیایی ماده و نحوه‌ی توزیع بار الکترونی است. عوامل محیطی از قبیل دمای محیط، pH و نوع حلال نیز در بروز این خاصیت، تاثیرگذارند. بنابراین، یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی جهت داشتن عملکردی مؤثر در بدن موجود زنده باید مقدم بر دارا بودن ساختار شیمیایی مناسب جهت مهار اکسیدان‌ها، قابلیت حل شدن در محیط فیزیولوژیک، نفوذ و جذب از طریق دیواره روده و ورود به جریان خون و داخل سلول‌ها را داشته باشد (19).

از میان سه آنتی‌اکسیدان مورد بررسی در این مطالعه، یعنی تاکسی‌فولین، مورین و کورکومین، در غلظت‌های برابر،

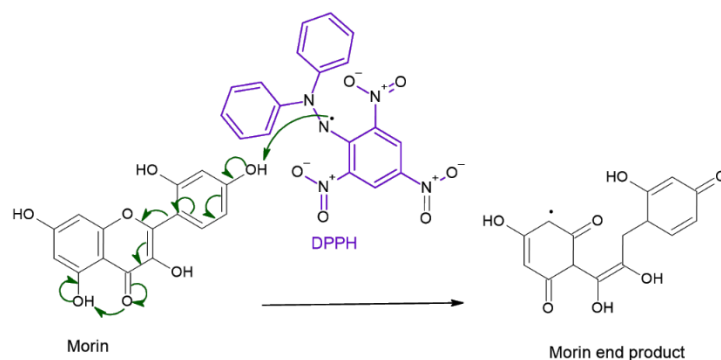
با توجه به نتایج به‌دست آمده و بررسی نمودارهای مربوط به میزان جذب و مهار رادیکال آزاد DPPH، نشان داده شد که تاکسی‌فولین بالاترین قدرت آنتی‌اکسیدانی را نسبت به سایر ترکیبات در یک غلظت برابر دارد، متعاقباً کورکومین و به دنبال آن، مورین در مراتب بعدی از نظر قدرت آنتی‌اکسیدانی قرار می‌گیرند. pH نمونه‌ها قبل از واکنش با رادیکال آزاد DPPH اندازه‌گیری شد که با توجه به یکسان بودن حلال و غلظت نمونه‌ها، اختلاف pH مشاهده شد. همچنین با استفاده از آزمون فرض آماری یا p-value و بررسی آن در سطح معناداری یا Significance Level، تفاوت معنی‌دار بین آنتی‌اکسیدان‌ها محاسبه شد و مقدار p هر آنتی‌اکسیدان در مقایسه با DPPH قبل از واکنش با روش t-test سنجیده شد. با توجه به مقادیر به دست آمده در جدول ۱ و مرز معنی‌دار بودن (۰/۰۵)، نتیجه‌ی $p < 0.05$ با درصد اطمینان ۹۵ حاصل شد که نشان‌دهنده‌ی رد فرض صفر (عدم وجود تفاوت معنادار) بوده و در نتیجه نتایج حاصل از آزمایش تفاوت معناداری را نسبت به هم نشان می‌دهند که می‌تواند ناشی از تفاوت مکانیسم عملکرد آنتی‌اکسیدان‌ها در واکنش با رادیکال‌های آزاد باشد.

متفاوت‌تر است؛ با این حال، مشاهده می‌کنیم که همچنان گروه هیدروکسیل در موقعیت *para* نقش اصلی را در دریافت الکترون آزاد ایفا می‌کند. با دقت به شکل ۱۰، درمی‌یابیم که کورکومین، ساختاری قرینه دارد و این ساختار منحصر به فرد، به این ترکیب فنولی کمک می‌کند تا پس از دریافت الکترون رادیکالی، با جا به جایی این الکترون در ساختار خود به صورت واکنشی رفت و برگشت، آنرا مهار و پایدار کند. البته برخی از محققین بر این باورند که احتمالاً وجود گروه دی‌کتونی در مرکز، عامل اصلی هیدروژن‌دهندگی و دریافت الکترون آزاد است (3,7).

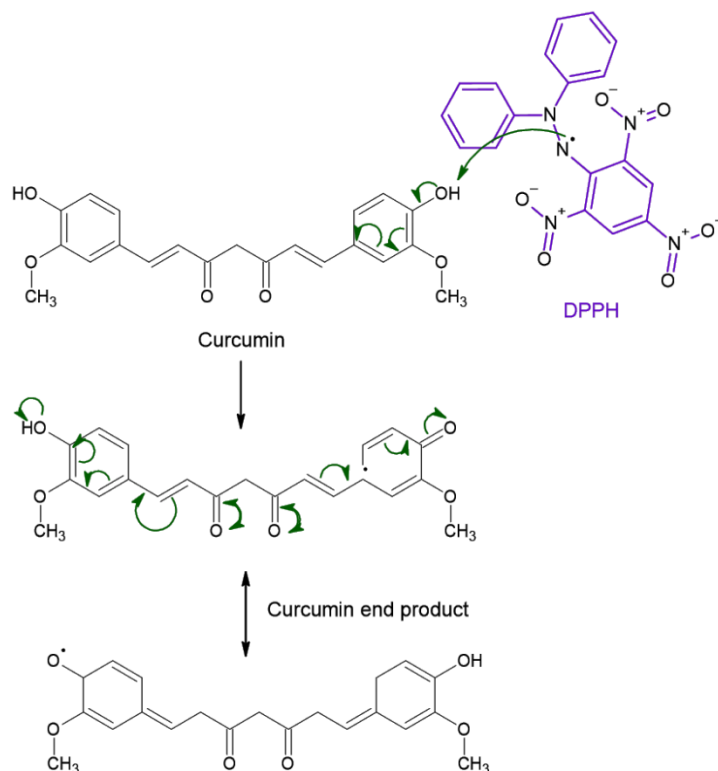
تاکسی‌فولین بالاترین قدرت آنتی‌اکسیدانی را از خود نشان داد. کورکومین و به دنبال آن مورین متعاقباً بعد از تاکسی‌فولین از نظر قدرت آنتی‌اکسیدانی قرار گرفتند. با توجه به ساختار تاکسی‌فولین، به نظر می‌رسد که وجود گروه هیدروکسیل متصل به حلقه‌ی بنزنی B (گروه فنولی) در موقعیت *para*، نقش اصلی را در دریافت الکترون آزاد از رادیکال DPPH دارد (شکل ۸) (25). ساختار مورین نیز بسیار مشابه تاکسی‌فولین است؛ بنابراین مکانیسم پیشنهادی حضور گروه‌های هیدروکسیل و اتم‌های اکسیژن متصل به حلقه‌های بنزنی، دریافت الکترون رادیکال، جا به جایی الکترون‌ها و پایداری ساختار را تسهیل کرده است (شکل ۹). ساختار کورکومین، نسبت به تاکسی‌فولین و مورین،



شکل ۵- مکانیسم پیشنهادی نحوه‌ی مهار رادیکال DPPH توسط تاکسی‌فولین. وجود گروه‌های هیدروژن متصل به کربن شماره ۲ و ۳ به صورت فضایی (*stereo*) قدرت الکترون‌کشندگی اتم اکسیژن مجاور را بیشتر کرده و به شکست حلقه‌ی فنولی و در نتیجه، جا به جایی و پایداری رادیکال آزاد کمک می‌کنند (شکل رسم شده بر پایه‌ی مکانیسم پیشنهادی مقاله‌ی Topal و همکاران (25)).



شکل ۶- مکانیسم پیشنهادی نحوه‌ی مهار رادیکال DPPH توسط مورین. دریافت الکترون آزاد، توسط گروه هیدروکسیل حلقه‌ی فنولی صورت می‌گیرد و اتم هیدروژن این گروه هیدروکسیل، به DPPH داده می‌شود و آنرا مهار می‌کند. این مکانیسم پیشنهادی نسبت به شباهت ساختاری مورین به تاکسی‌فولین طرح شده است (شکل رسم شده بر پایه‌ی مکانیسم پیشنهادی مقاله‌ی Topal و همکاران (25)).

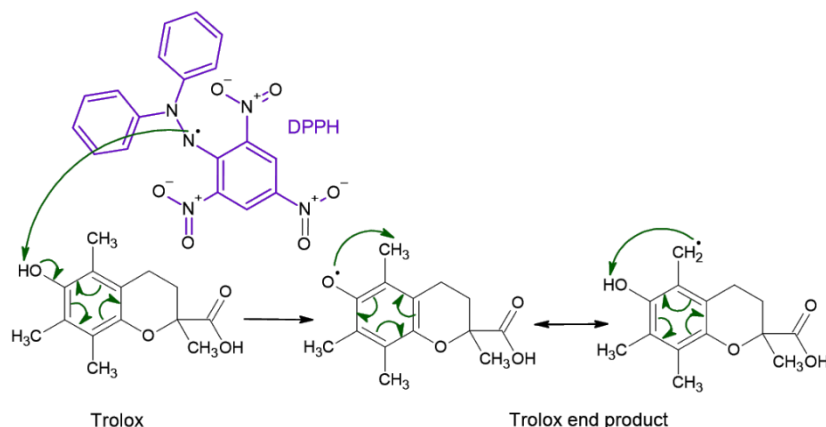


شکل ۷- مکانیسم پیشنهادی نحوه‌ی مهار رادیکال DPPH توسط کورکومین. گروه هیدروکسیل حلقه‌ی فنولی، الکترون رادیکالی را دریافت کرده و این الکترون، به صورت واکنش رفت و برگشت، بین دو حلقه‌ی فنولی جا به جا می‌شود. وجود گروه‌های کنونی در مرکز و قرینه‌بودن ساختار به این جا به جایی و کشیده‌شدن رادیکال آزاد به سمت مرکز و در نتیجه، مهار آن، کمک می‌کند (شکل رسم شده بر پایه‌ی مکانیسم پیشنهادی مقاله‌ی Del Prado-Audelo و همکاران (7)).

به واکنش رفت و برگشت ذکر شده در کورکومین، کارآمد نیست، زیرا اتم کربن (در گروه متیل ساختار ترولوکس) به اندازه‌ی اتم اکسیژن (در گروه هیدروکسیل ساختار کورکومین) قدرت الکترون‌کشندگی ندارد.

با نگاهی کلی به ساختار چهار ترکیب ذکر شده، به این نتیجه می‌رسیم که هرچه گروه‌های هیدروکسیل (خصوصاً در موقعیت *para*) و تعداد اتم‌های اکسیژن در ساختار ترکیب بیشتر باشد، در دریافت و مهار رادیکال آزاد، بهتر عمل می‌کند. در آخر، توجه به این نکته جالب توجه است که فرمول شیمیایی تاکسی‌فولین و مورین، بسیار مشابه یکدیگر است (به ترتیب، $C_{15}H_{12}O_7$ و $C_{15}H_{10}O_7$) و تنها تفاوت، وجود دو اتم هیدروژن متصل به کربن ۲ و ۳ حلقه‌ی C در تاکسی‌فولین است که به صورت فضایی و خارج از صفحه‌ی حلقه‌ی بنزنی، آرایش یافته‌اند.

همان‌طور که در منحنی شکل ۶ مشاهده کردیم، ترولوکس، که آنالوگی از آلفا-توکوفرول (ویتامین E) است، به عنوان محلول استاندارد مورد استفاده قرار گرفت و در مقایسه با سه ترکیب دیگر، قابلیت کمتری در مهار رادیکال DPPH از خود نشان داده است. به احتمال قوی، علت اصلی این موضوع، به ساختار این ترکیب برمی‌گردد. با اینکه ترولوکس نیز در ساختار خود، گروه هیدروکسیل متصل به بنزن (فنول) دارد، اتصال چندین گروه متیل به این حلقه، تمرکز ابر الکترونی در اطراف گروه هیدروکسیل را کم می‌کند و در نتیجه، قدرت هیدروژن‌دهندگی به رادیکال DPPH کمتر شده و در مهار آن، نسبتاً ناکارآمدتر عمل کرده است. با توجه به شکل ۱۱، می‌بینیم که الکترون آزاد دریافت‌شده بین گروه هیدروکسیل و متیلن، به صورت واکنش رفت و برگشت، جا به جا می‌شود (9)؛ اما این جا به جایی (و در نتیجه مهار و پایدار کردن رادیکال)، نسبت



شکل ۱۱- مکانیسم پیشنهادی نحوه‌ی مهار رادیکال DPPH توسط ترولوکس. الکترون رادیکالی پس از جذب توسط گروه هیدروکسیل حلقه‌ی فنولی، در این حلقه به صورت واکنش رفت و برگشت، میان اتم اکسیژن و کربن گروه متیل، جا به جا می‌شود (شکل رسم شده بر پایه‌ی مکانیسم پیشنهادی مقاله‌ی Friaa و همکاران (9)).

بیماری‌های مرتبط با آن، مانند بیماری‌های قلبی-عروقی، دیابت شیرین، بیماری‌های مخرب سیستم عصبی و حتی مبارزه با پیری سلول‌های بدن، توجه به تغذیه‌ی سالم و مصرف محصولات گیاهی غنی از آنتی‌اکسیدان، مانند مرکبات (دارای تاکسی‌فولین)، مغزهای خوراکی مانند بادام و میوه‌هایی مانند توت سفید و انجیر (دارای مورین) و همچنین ادویه‌هایی که مصرف آن‌ها در طب سنتی توصیه‌شده، مانند زردچوبه (سرشار از کورکومین) بسیار حائز اهمیت است.

تشکر و قدردانی

با تشکر از آقای دکتر علی اکبر مرآتان، استاد گرامی دانشگاه تحصیلات تکمیلی علوم پایه زنجان، برای اهدا دو ماده پلی فنولی مورین و تاکسی‌فولین به این آزمایشگاه. همچنین با تشکر از گرنت پژوهشی دانشگاه تهران.

احتمالاً این اتم‌ها به جابه‌جایی الکترون و شکست حلقه‌ی C در تاکسی‌فولین کمک می‌کنند و باعث می‌شوند که این ترکیب، موثرتر از مورین، کورکومین و ترولوکس، رادیکال DPPH را مهار کند. همچنین مقایسه‌ی نتیجه به‌دست آمده از فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها در کاهش جذب و درصد مهار رادیکال آزاد DPPH و اختلاف pH بین نمونه‌ها نشان می‌دهد که میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی با تغییرات pH نسبت عکس دارد. در نتیجه همان‌طور که در مقدمه ذکر شد، عوامل مختلفی از جمله محیط واکنش، غلظت، ساختار و محل قرارگیری عوامل واکنش‌دهنده در ساختار آنتی‌اکسیدان و pH بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی اثر می‌گذارد که در این مطالعه با یکسان در نظر گرفتن غلظت نمونه‌ها و محیط واکنش تغییرات آنتی‌اکسیدانی از نظر ساختار و تغییرات pH ارزیابی شد. به طور کلی، طبق مطالب گفته‌شده و نتایج بدست آمده از این بررسی، نتیجه می‌گیریم که برای تعدیل واکنش‌های اکسایش-کاهش بدن، جلوگیری از ایجاد استرس اکسیداتیو و مهار تشدید علائم

منابع

مجله پژوهش‌های جانوری (مجله زیست‌شناسی ایران)، دوره ۳۱، شماره ۴، دی ۱۳۹۷، صفحه ۴۹۹-۴۸۴.

۲- راضیه عارفیار؛ مهرا میراولیانی؛ ادرشیر طالبی؛ اکرم امین جعفری؛ محسن زحمتکش. بررسی هیستوپاتولوژی ترمیم زخم‌های عمیق

۱- ابوالفضل دادخواه؛ فائزه فاطمی؛ محمدرضا محمدی ملابری؛ آزاده رسولی؛ محمدحسن کاروین آشتیانی. تاثیر اسانس نعنا بر روی استرس اکسیداتیو و بیان ژن COX-2 در پیشگیری از سپسیس.

زیست‌شناسی ایران)، دوره ۳۱، شماره ۱، فروردین ۱۳۹۷،
صفحه ۶۶-۵۸.

- 3- Aggarwal, B. B., Surh, Y.-J. & Shishodia, S. 2007. The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease.
- 4- Authority, E. F. S. 2014. Refined exposure assessment for curcumin (E 100). *EFSA J.* **12**, 1–43.
- 5- Bhattarai, A. & Wilczura-Wachnik, H. 2015. Size and diffusion phenomena o AOT/alcohol/water system in the presence of morin by dynamic light scattering. *Int. J. Pharm.* **478**, 610–616.
- 6- Das, A., Baidya, R., Chakraborty, T., Samanta, A. K. & Roy, S. 2021. Pharmacological basis and new insights of taxifolin: A comprehensive review. *Biomed. Pharmacother.* **142**, 112004.
- 7- Del Prado-Audelo, M. L. *et al.* 2019. Formulations of curcumin nanoparticles for brain diseases. *Biomolecules* **9**, 1–28.
- 8- EFSA CEF Panel (EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes, F. and P. A. 2013. Scientific Opinion on the toxicological evaluation of phenol. *EFSA J.* **11**.
- 9- Friaa, O. & Brault, D. 2006. Kinetics of the reaction between the antioxidant Trolox® and the free radical DPPH• in semi-aqueous solution. *Org. Biomol. Chem.* **4**, 2417–2423.
- 10- Graßmann, J. 2005. Terpenoids as Plant Antioxidants. *Vitam. Horm.* **72**, 505–535.
- 11- Hatcher, H., Planalp, R., Cho, J., Torti, F. M. & Torti, S. V. 2008. Curcumin: From ancient medicine to current clinical trials. *Cellular and Molecular Life Sciences.* **65**, 1631–1652.
- 12- Hu, Y. J. *et al.* 2012. Molecular spectroscopic studies on the interaction of morin with bovine serum albumin. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **112**, 16–22.
- 13- Irshad, M. & Chaudhuri, P. S. 2002. Oxidant-antioxidant system: Role and significance in human body. *Indian J. Exp. Biol.* **40**, 1233–1239.
- 14- KAUR, RAJBIR , SARORA, A. 2015. Alkaloids-important therapeutic secondary metabolites of plant origin. *J. Crit. Rev.* **2**, 1–8.
- 15- Li, S. Y. & Duan, C. Q. 2019. Astringency, bitterness and color changes in dry red wines before and during oak barrel aging: An updated phenolic perspective review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **59**, 1840–1867.
- 16- Liguori, I. *et al.* 2018. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin. Interv. Aging* **13**, 757–772.
- 17- Marković, Z. *et al.* 2012. PM6 and DFT study of free radical scavenging activity of morin. *Food Chem.* **134**, 1754–1760.
- 18- Mehraban, F. *et al.* 2018. Molecular insights into the effect of ozone on human hemoglobin in autohemotherapy: Highlighting the importance of the presence of blood antioxidants during ozonation. *Int. J. Biol. Ma* **119**, 1276- 1285.
- 19- Porat, D. & Dahan, A. 2018. Active intestinal drug absorption and the solubility-permeability interplay. *Int. J. Pharm.* **537**, 84–93.
- 20- Rahban, M., Habibi-rezaei, M., Mazaheri, M. & Saso, L. 2019. Anti-Viral Potential and Modulation of Nrf2 by Curcumin : Pharmacological Implications. **9**, 1–24.
- 21- Stenger Moura, F. C. *et al.* 2021. Taxifolin stability: In silico prediction and in vitro degradation with HPLC-UV/UPLC-ESI-MS monitoring. *J. Pharm. Anal.* **11**, 232–240.
- 22- Sunil, C. & Xu, B. 2019. An insight into the health-promoting effects of taxifolin (dihydroquercetin). *Phytochemistry* **166**, 112066.
- 23- Tanaka, M., Saito, S., Inoue, T., Satoh-Asahara, N. & Ihara, M. 2019. Novel therapeutic potentials of taxifolin for amyloid-β-associated neurodegenerative diseases and other diseases: Recent advances and future perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 1–13.
- 24- Thuan, N. H. *et al.* 2021. Advances in biochemistry and the biotechnological production of taxifolin and its derivatives. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, doi:10.1002/bab.2156.
- 25- Topal, F. *et al.* 2016. Antioxidant activity of taxifolin: An activity-structure relationship. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **31**, 674–683.
- 26- Truck, D. *et al.* 2017. Scientific Opinion on taxifolin-rich extract from Dahurian Larch (*Larix gmelinii*). *EFSA J.* **15**.

Investigating the Antioxidant Strength and Mechanism of action of Polyphenolic Compounds Taxifolin, Morin and Curcumin

Roshanfekar A., Mahlouji M. and Seyedarabi A.

Dept. of Biochemistry, Institute of Biochemistry-Biophysics, University of Tehran, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Oxidative stress is a phenomenon that results from the overproduction of reactive oxygen species, which has a destructive effect on the natural function of enzymes, body proteins, cells and even organs in an organism. Previous studies by many researchers have shown the use of natural and predominantly herbal compounds such as polyphenols, as a safe way to inhibit the destructive effects of oxidative stress. The non-enzymatic mechanism of action of these antioxidant compounds is mainly attributed to the hydroxyl groups attached to the benzene or aromatic rings through which hydrogen atoms are donated to free radicals, leading to the scavenging and neutralization of the negative effects of the reactive oxygen species. In this paper, the antioxidant strength of three polyphenolic compounds, including taxifolin, morin and curcumin has been studied at a relatively low concentration, using DPPH, a chemical compound as a free radical. The H4 ELISA fluorescence reader, Excel, OriginLab and Graph Pad Prism softwares were used in this study. The results revealed that taxifolin had the highest antioxidant strength followed by curcumin and morin. Taxifolin's greatest antioxidant strength can be related to the presence of a number of hydroxyl groups attached to the phenolic rings, the oxygen atoms attached to the heterocyclic ring (C ring), and the spatial decoration of hydrogen atoms. In conclusion, the results from this study, emphasizes more than ever, on the consumption of nutritious plant products, such as citrus fruits and nuts, as well as the spices recommended in traditional medicine, such as turmeric.

Key words: Polyphenolic compounds; Antioxidant activity; Taxifolin; Morin; Curcumin