روش‌های شناسایی گالیک اسید در گیاهان

۱- رضا اخباری ۲- امیرسالار غلامرضایی ۳- طوبی عطاری

۱- دانشجوی دکترا فیزیولوژی گیاهی دانشگاه شاهد تهران

۲-کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری دانشگاه پیام نور اصفهان

۲- کارشناسی علوم تجربی دانشگاه فرهنگیان

Email:(Reza.akhbari@shahed.ac.ir)

Email:(نویسنده دوم)

چکیده

با توجه به اهمیت زیستی گسترده و کاربرد بالقوه، علاقه فراوانی برای تعیین ترکیبات فنلی در گیاهان و مواد غذایی وجود دارد. در بین ترکیبات فنلی، گالیک اسید به عنوان یک شاخص به منظور بررسی سلامت و کیفیت آب میوه‌ها و نوشیدنی‌های مختلف الکلی بکار برده می‌شود. متأسفانه در سال‌های اخیر، گالیک اسید به طور غیرقانونی توسط سودجویان به مایعات گیاهی اضافه می‌شودکه می‌توان با اندازه‌گیری غلظت گالیک اسید در این مایعات، کیفیت آنها را مورد ارزیابی قرار داد.در نتیجه، تعیین غلظت گالیک اسید در مواد غذایی، عصاره، اسانس و فرمولاسیون‌های دارویی گیاهی و مایعات بدنی انسان نه تنها به دلیل ویژگی‌های ضد جهش‌زایی قوی، ضد سرطانی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن، بلکه برای توسعه و بهبود تغذیه و بهداشت انسانی، تحقیقات زیست شناسی و دارویی مناسب است. تاکنون روش‌های مختلفی برای تعیین گالیک اسید ارائه شده است که می توان به مواردی هچون: پراکندگی رزونانس نور ، کروماتوگرافی لایه نازک ، کروماتوگرافی مایع فاز معکوس با فشار بالا و روش الکتروشیمیایی اشاره نمود. از میان موارد ذکرشده، اکسیداسیون الکتروشیمیایی مستقیم گالیک اسید می‌تواند روشی مناسب و سریع برای آنالیز و سنجش این ترکیب در نمونه‌های واقعی باشد.

واژگان کلیدی:

ترکیبات فنولی، گالیک اسید ،حسگر، شناسایی، الکتروشیمیایی.

مقدمه

یکی از جنبه‌های قابل بررسی اهمیت آنتی‌اکسیدان‌ها[۱] توانایی آن‌هادر تامین سلامتی بشر می‌باشد. آنتی‌اکسیدان‌ها، ویتامین‌ها، املاح معدنی و آنزیم‌هایی هستند که سلول‌ها و بافت‌های بدن را در برابر اثرات زیان‌بار مولکول‌های سمی به‌نام رادیکال‌های آزاد[۲] محافظت می‌کنند. مشخص شده است که رادیکال‌های آزاد اکسیژن سبب تخریب اکسایشی چربی‌ها و پروتئین‌ها و نوکلئیک اسیدها می‌گردد. بنابراین در بسیاری از بیماری‌ها مانند بیماری‌های قلبی، شریان قلبی ریوی و برخی از انواع سرطان‌ها، آب مروارید، آماس، آرتریت‌ها و عملکرد غیر عادی مغز دخالت می‌کنند. در واقع آنتی‌اکسیدان‌ها جارو برقی‌های طبیعی هستند که در برخورد با رادیکال‌های آزاد به‌روش خنثی‌سازی، پاکسازی بدن را انجام می‌دهند [۱].

پلی‌فنول‌ها[۳] گروهی از مواد شیمیایی هستند که در بعضی از انواع میوه‌ها، سبزیجات و گیاهانی مانند ذرت، گردو، زیتون، برگ چای و انگور موجود هستند و به‌عنوان آنتی‌اکسیدان شناخته شده‌اند و رادیکال‌های آزاد بدن را می‌زدایند. پلی فنول‌ها در محافظت بدن در برابر بیماری‌هانقش مهمی را ایفا می‌کنند. به‌عنوان مثال در محافظت بافت بدن در برابر استرس‌های اکسیداتیو، سرطان‌هایی مانند پروستات، سینه، پوست و روده بسیار موثر می‌باشند و به‌عنوان یک عامل ضد پیری با توجه به توانایی‌شان در به‌تاخیر انداختن مرگ سلولی در ارگانیسم‌های زنده می‌باشند [۲و۳]. با توجه به فوایدی که پلی‌فنول‌ها در سلامتی انسان دارد، بررسی اثر ترکیبات غنی از پلی فنول‌ها در افزایش سلامت بشر تاثیرگذار می‌باشد.

الکتروشیمی شاخه‌ای از علم شیمی است که به مطالعه‌ی تغییرات شیمیایی به‌وجود آمده در اثر عبور جریان الکتریکی و نیز ایجاد انرژی الکتریکی به‌وسیله واکنش‌های شیمیایی می پردازد [۴].

---

۱ Antioxidants

۲ Free radicals

۳ Polyphenols

در چند دهه اخیر استفاده از الکترودهای اصلاح‌شده شیمیایی گسترش زیادی پیدا کرده است. در این الکترودها یک سطح تغییر داده شده‌ی شیمیایی، به‌کار گرفته می‌شود که این سطح، خواص جدیدی را که موجب بهره‌برداری از آن‌ها برای اهداف الکتروشیمیایی می‌شود به وجود می‌آورد. بسیاری از ترکیبات شیمیایی بر سطح الکترود اصلاح نشده پاسخ ضعیفی در برابر عمل اکسایش- کاهش از خود نشان می‌دهند و این مساله منجربه کاهش حساسیت و گزینش‌پذیری روش‌های تجزیه الکتروشیمیایی می‌گردد. یک روش معقول برای کاهش اضافه‌ولتاژ واکنش‌های الکتروشیمیایی، استفاده از گونه‌ی اصلاحگر می‌باشد. استفاده از الکترودهای اصلاح‌شده، انتقال الکترون بین گونه موردانداز‌ه‌گیری و سطح الکترود را سرعت می‌بخشد و باعث بهبود قابل توجه حساسیت، گزینش پذیری و کاهش حد تشخیص روش‌های الکتروشیمیایی می‌گردد [۵]. در این پژوهش تعدادی از این روش‌ها بررسی می گردد.

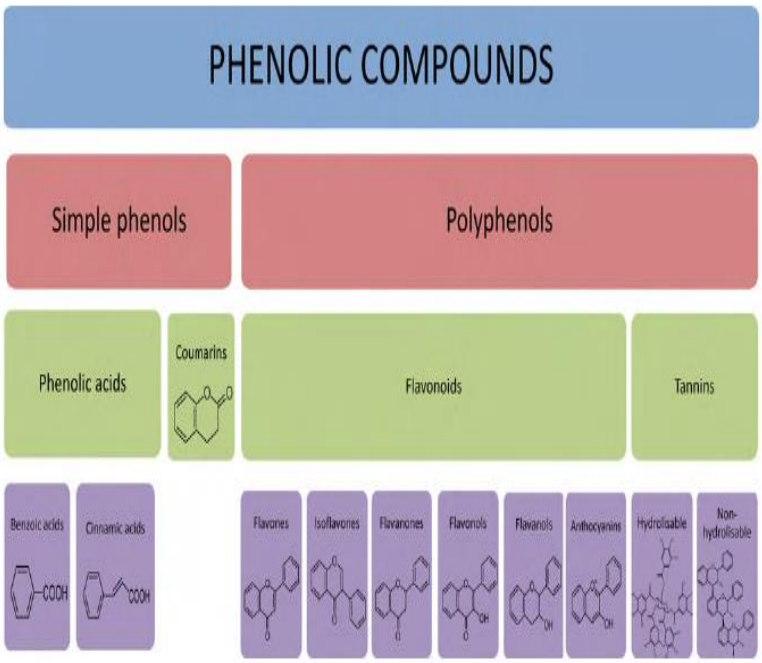
پلی فنول ها

ترکیبات فنولی گروه گسترده‌ای از متابولیت‌های ثانویه هستند که بسیاری از ترکیبات حلقوی مانند ترکیبات فنلی، فلاوون‌ها، فلاونوئیدها، تانن‌ها، لیگنین‌ها و حتی اسیدهای آمینه حلقوی مانند تریپتوفان، تیروزین و پرولین را شامل می‌شوند. این ترکیبات نقش مهمی در محافظت از گیاهان در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی دارند [۶]. ترکیبات فنولی معمـولا در میوه‌ها، سبزیجات، دانه، برگ، ریشه و در سایر قسمت‌های گیاه یافت می‌شوند. این مواد نقش مهمی در حوزه مواد غذایی، شیمیایی، داروسازی و پزشکی، بـا توجه به طیف گسترده‌ای از اثرات مطلوب زیسـتی از جملـه خواص آنتی‌اکسیدانی دارند.

آنتی اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که از طریق ایجاد مشکل در تولید رادیکال‌های آزاد و یا قطع تکثیر آن‌ها اکسایش را به‌تاخیر می‌اندازند. آنتی اکسیدان‌ها از سلول‌ها در برابر اثرات آسیب اجزای اکسیژن فعال مثل اکسیژن یکتایی، سوپر اکسید، رادیکال‌های پرکسیل، رادیکال های هیدروکسیل و پروکسی نیتریل محافظت می‌کنند[۷]. یک عدم تطابق بین آنتی اکسیدان و جز اکسیژن فعال می‌تواند به‌فشار اکسیداتیو و متعاقبا آسیب سلولی منجر شود. فشار اکسیداتیو با بیماری‌های سرطان، تصلب شرائین، پیری، التهاب و

بیماری‌های دستگاه عصبی مثل پارکینسون و آلزایمر ارتباط دارد. پلی فنول‌ها به‌همراه ویتامین‌ها و آنزیم‌های آنتی اکسیدان می‌توانند به‌محافظت در مقابل این بیماری‌ها کمک کنند.

پلی فنول‌ها در محافظت بدن در برابر بیماری‌ها نقش مهمی را ایفا می‌کنند. به‌عنوان مثال در محافظت بافت بدن در برابر استرس‌های اکسیداتیو، سرطان‌هایی مانند پروستات، سینه، پوست و روده بسیار موثر می‌باشند و به‌عنوان یک عامل ضد پیری با توجه به توانایی‌شان در به‌تاخیر انداختن مرگ سلولی در ارگانیسم‌های زنده می‌باشند. در پلی فنول‌ها پتانسیل تمیزکنندگی رادیکال آزاد به‌تعداد و موقعیت گروه‌های هیدروکسیل موجود در ساختمان آن‌ها بستگی دارد. شکل۱-۱یک طبقه‌بندی ساده از ترکیبات فنولیک را نشان می‌دهد.

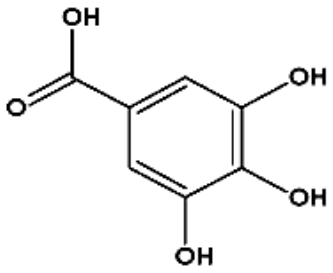


شکل۱: طبقه‌بندی ترکیبات فنولیک

گالیک اسید

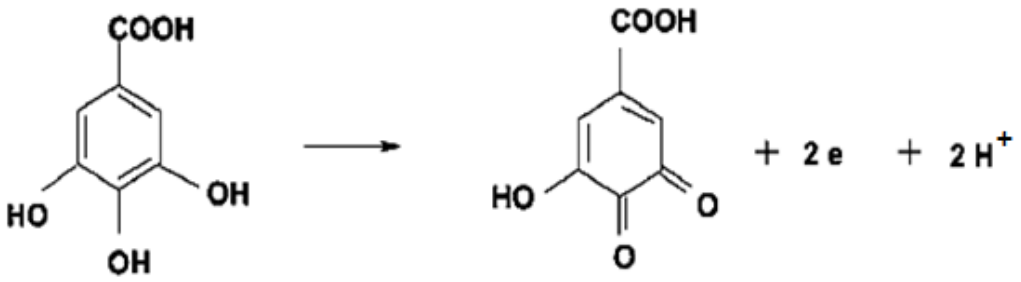
گالیک اسید[۴] نوعی اسید آلی فنولی می‌باشد که با نام ۳،۴،۵- تری هیدروکسیل بنزوییک اسید شناخته شده است. این ترکیب دارای کاربردهای زیادی در تحقیقات و صنایع شیمیایی دارد، مثلا[۶] به عنوان یک استاندارد برای تعیین محتوای فنولی آنالیت‌های مختلف استفاده می‌گردد و همچنین در صنایع دارویی به‌علت داشتن خواص ضد قارچی و ضد ویروسی به‌کار می‌رود. گالیک اسید به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان به حفظ سلول‌های زنده در مقابل تخریب‌های اکسایشی کمک می‌کند. مشخص شده که گالیک اسید سمیتی را در مقابل سلول‌های سرطانی بدون آسیب‌رسانی به سلول‌های سالم نشان می‌دهد[۹ و ۸].

شکل ۱-۲ ساختار گالیک اسید را نشان می‌دهد. این ترکیب دارای دو پیک آندی می‌باشد که اولین پیک مربوط به اکسایش گروه هیدروکسیل روی حلقه بنزنی درمجاورت دو گروه متا دی فنل و دومین پیک مربوط به اکسایش سومین گروه فنلی روی حلقه در مجاورت با گروه ارتو دی فنل است که در این مطالعه اولین پیک اکسایش موردبررسی قرار گرفته است. اکسایش این ترکیب مستلزم انتقال دو الکترون می‌باشد که مکانیسم آن در شکل ۱-۳ نشان داده شده است[۱۰].



شکل ۲: ساختار گالیک اسید

[۴] Gallic acid



شکل ۳: مکانیسم اکسایش گالیک اسید

روش های شناسایی پلی فنول ها

روش‌های شناسایی سریع و دقیق پلی‌فنل‌ها درمحصولات طبیعی، زمینه پژوهش‌های گسترده‌ایدر حوزه‌های شیمی تجزیه، فیتوشیمی، بیوشیمی و داروسازی بوجود آورده است. دلیل این امر،گوناگونی ساختاری ترکیبات فنلی، اثرات بهداشتی و تأثیر آن‌ها بر سلامت انسان و نیز خواص ارگانولپتیکی میوه، سبزیجات و دیگر فرآورده‌های گیاهی می‌باشد. تاکنون روش‌های بسیاری برای تجزیه و تحلیل پلی‌فنل‌ها معرفی شده است. در بین روش‌های مختلف در دسترس،کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا[۵](HPLC) روش غالب برای جداسازی، شناسایی ویژگی‌ها و کمیت پلی‌فنل‌ها در طی دو دهه گذشته بوده است. از این روش برایتجزیه و تحلیل پلی‌فنل‌های مختلف ازجمله آنتوسیانین‌ها، پروآنتوسیانیدین، تانن قابل هیدرولیز، فلاونول، فلاوانون‌ها، فلاون و فنولیک اسید در نمونه‌های مختلف گزارش شده است[۱۱].

[۵] High-performance liquid chromatography (HPLC)

برای تجزیه و تحلیل و شناسایی پلی‌فنل‌ها از روش‌های جدیدتری مانند کروماتوگرافی مایع به همراه طیف‌سنجی جرمی[۶][۱۲]، یونیزاسیون دفع لیزری در ماتریکس[۷]، طیف سنجی رزونانس مغناطیسی هسته‌ای[۸][۱۳] وکروماتوگرافی مایع به همراه طیف‌سنجی رزونانس مغناطیسی هسته‌ای[۹][۱۴] استفاده می‌کنند. در مورد سایر روش‌ها می‌توان به روش‌های مهاجرت الکتریکی مانند الکتروفورز[۱۰]، الکتروفورز ناحیه مویرگی[۱۱]وکروماتوگرافی الکتروسینتیک میسلی[۱۲] اشاره کرد که در آن‌ها برای بررسی و شناسایی نتیجه حاصل بر روی ژل، معمولا از لامپ فرابنفش استفاده می‌شود[۱۶و۱۵].طیف‌سنجی فروسرخ[۱۳]یکی دیگراز ابزارهای قدرتمند، سریع، دقیق و غیرمخرب است که می‌تواند به عنوان یک روش جایگزین برای روش‌های قدیمی در نظر گرفته شود[۱۷]. کروماتوگرافی گازی[۱۴]نیز روشی است که به طور گسترده برای جداسازی و تعیین مقدار اسیدهای فنلی و فلاونوئیدها استفاده می‌شود. مشکلات اساسی در این روش،سیگنال ضعیف‌تر مربوط به ترکیبات فنلی است.

اگرچه روش‌های یاد شده از حساسیت بالایی برخوردارهستند، اما دارای محدودیت هایی از جمله: ایجاد تداخل و مزاحمت به دلیل استفاده از استاندارد داخلی در برخی ازروش‌ها، آماده‌سازی و استخراج نمونه‌ها و نیاز به تجهیزات پیچیده وگران قیمت هستند. با این شرایط می‌توان از روش‌های دیگری مانند روش‌های الکتروشیمیایی استفاده نمود.

حسگر[۱۵]دستگاهی است که در آن یک عنصر شناساگر[۱۶] با یک مبدل[۱۷]ترکیب می شود و برای شناسایی آنالیت[۱۸] به کار می رود. در دو دهه اخیر استفادهاز حسگرها برای تشخیص مواد زیستی در علوم پزشکی و صنعت، به‌دلیل حساسیت و اختصاصیت بالا،

---

۶ Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry (LC-MS)

۷ Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI)

۸ Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR)

۹ Liquid Chromatography-Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (LC-NMR)

۱۰ Capillary Electrophoresis (CE)

۱۱ Capillary Zone Electrophoresis (CZE)

۱۲ Micellar Electro Kinetic Chromatography (MEKC)

۱۳ Near-Infrared Spectroscopy (NIRS)

۱۴ Gas Chromatography (GC)

۱۵Sensor

۱۶Receptor

۱۷Transducer

۱۸Analyte

عملکرد سریع، استفاده آسان، تفسیر به نسبت ساده و هزینه پایین، در مقایسه با دیگر روش‌های مرسوم در سنجش آنالیت‌ها رواج یافته است[۱۸].

در جدول زیر برخی از الکترودهای سنتز شده و روش الکتروشیمیایی که به وسیله‌ی آنها به شناسایی گالیک اسید پرداخته‌اند، گرد آوری شده است.

الکترود کار	روش الکتروشیمیایی	نمونه گیاه	منبع
الکترود کربن شیشه‌ای اصلاح‌شده نانوکامپوزیت اکسید گرافن/پلی (p-آمینو هیپوریک اسید)-دودسیل سولفات سدیم (APTS@GO/PPAH-SDS/GCE)	ولتامتری چرخه ای ولتامتری ضربان تفاضلی آمپرومتری		۱۹
الکترود خمیر کربن (CPE) اصلاح شده توسط نانوکامپوزیت حاوی نانوذرات زیرکونیا (ZrO(2)NPs)، کلرید کولین (ChCD) و نانوذرات طلا (AuNPs) برای ساخت ZrO2-ChCI-AuNPs/CPE	ولتامتری ضربان تفاضلی		۲۰
الکترود کربن چاپی صفحه فعال (ASPCE)	آمپرومتری	چای سبز آب سیب	۲۱
الکترودهای GC اصلاح شده (نیترید تیتانیوم) یا اکسید گرافن احیا شده با کاربید ولفرام که به ترتیب با عنوان TNrGO و WCrGO مشخص شده اند	ولتامتری چرخه ای	شراب	۲۲
الکترود کربن شیشه ای اصلاح شده با نانولوله های کربنی چند جداره و پلی کورستین (پلی کورستین/MWNT/GCE)	ولتامتری ضربان تفاضلی	چای	۲۳

نتیجه‌گیری

شناسایی ترکیبات گیاهی از جمله ترکیبات فنولی محصولات کشاورزی، صنعتی، دارویی از اهمیت بالایی برخوردار است. استفاده از حسگرهای زیستی با توجه به مزایایی که دارند از جمله: حساسیت و پایداری بالا، سهولت استفاده، سریع، آسان نسبت به سایر روش‌های مورد استفاده بیشتر مورد توجه بوده اند.

بکار گرفتن فناوری شناسایی الکتروشیمیایی برای کشاورزی دقیق، حسگرهای الکتروشیمیایی با تمرکز بر قابلیت حمل و نقل در حال توسعه هستند.

مراجع

۱. *Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. Int. J. Biomed. Sci., 2008; 4(2): 89-96.*

۲. *Ames B. Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. Science. (1983);221(4617):1256-64.*

۳. *Rice-Evans C, Miller N, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends in Plant Science.(۱۹۹۷);2(4):152-9.*

۴. *Collins PB, Thompson MA. Handbook on gallic acid: Natural occurrences, antioxidant properties and health implications. Nova Science Publisher's, Incorporated; 2013.*

۵. *Marques V, Farah A. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. Food Chemistry. 2009;113(4):1370-6.*

۶. *Erdogan Orhan I, Senol FS, Aslan Erdem S, Tatli II, Kartal M, Alp S. Tyrosinase and Cholinesterase Inhibitory Potential and Flavonoid Characterization ofViola odorataL. (Sweet Violet). Phytotherapy Research. 2015;29(9):1304-10.*

۷. *Rajani M, Bagul MS, Srinivasa H, Kanaki NS. Antiinflammatory activity of two Ayurvedic formulations containing guggul. Indian Journal of Pharmacology. 2005;37(6):399.*

۸. *Maltaş E, Uysal A, Yildiz S, Durak Y. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of Vitex agnus-castus L. Fresen. Environ. Bull., 2010; 19: 3094-3099.*

۹. *Kilmartin PA, Zou H, Waterhouse AL. A Cyclic Voltammetry Method Suitable for Characterizing Antioxidant Properties of Wine and Wine Phenolics. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2001;49(4):1957-65.*

۱۰. *Fujiki H, Watanabe T, Sueoka E, Rawangkan A, Suganuma M. Cancer prevention with green tea and its principal constituent, EGCG: From early investigations to current focus on human cancer stem cells. Mol. Cells, 2018; 41(2):73-82.*

۱۱. *Bertipaglia de Santana M, Mandarino MG, Cardoso JR, Dichi I, Dichi JB, Camargo AEI, et al. Association between soy and green tea (Camellia sinensis) diminishes hypercholesterolemia and increases total plasma antioxidant potential in dyslipidemic subjects. Nutrition. (2008);24(6):562-8.*

۱۲. *Wang Q, Zhang J, Li Y, Shi H, Wang H, Chen B, et al. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate increases atherosclerotic plaque stability in apolipoprotein E-deficient mice fed a high-fat diet. Kardiologia Polska. (2018);76(8):1263-70.*

۱۳. *Barroso H, Ramalhete R, Domingues A, Maci S. Inhibitory activity of a green and black tea blend on Streptococcus mutans. Journal of Oral Microbiology. 2018;10(1):1481322.*

۱۴. *Fechtner S, Singh A, Chourasia M, Ahmed S. Molecular insights into the differences in anti-inflammatory activities of green tea catechins on IL-1β signaling in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. Toxicology and Applied Pharmacology. 2017;329:112-20.*

۱۵. *Fassina G, Buffa A, Benelli R, Varnier OE, Noonan DM, Albini A. Polyphenolic antioxidant (–)-epigallocatechin-3- gallate from green tea as a candidate anti-HIV agent. AIDS. (2002);16(6):939-41.*

۱۶. *Hara Y, Yang CS, Isemura M, Tomita I. Health benefits of green tea: An evidence-based approach. CABI, 2017.*

۱۷. *Su Y-L, Cheng S-H. Sensitive and selective determination of gallic acid in green tea samples based on an electrochemical platform of poly(melamine) film. Analytica Chimica Acta. (2015);901:41-50.*

۱۸. *Yao L, Jiang Y, Datta N, Singanusong R, Liu X, Duan J, et al. HPLC analyses of flavanols and phenolic acids in the fresh young shoots of tea (Camellia sinensis) grown in Australia. Food Chemistry. 2004;84(2):253-63.*

19. Baghayeri M, Amiri A, Hasheminejad E, Mahdavi B. Poly (aminohippuric acid)–sodium dodecyl sulfate/functionalized graphene oxide nanocomposite for amplified electrochemical sensing of gallic acid. Journal of the Iranian Chemical Society. 2018 Sep;15(9):1931-8.

20. Shahamirifard SA, Ghaedi M, Razmi Z, Hajati S. A simple ultrasensitive electrochemical sensor for simultaneous determination of gallic acid and uric acid in human urine and fruit juices based on zirconia-choline chloride-gold nanoparticles-modified carbon paste electrode. Biosensors and Bioelectronics. 2018 Aug 30;114:30-6.

21. Raja N, Kokulnathan T, Chen SM, Liao WC, Priya TS. Amperometric detection of gallic acid based on electrochemically activated screen printed carbon electrode. Int. J. Electrochem. Sci. 2017 Jun 1;12:4620-9.

22. Stanković DM, Ognjanović M, Martin F, Švorc L, Mariano JF, Antić B. Design of titanium nitride-and wolfram carbide-doped RGO/GC electrodes for determination of gallic acid. Analytical biochemistry. 2017 Dec 15;539:104-12.

23. Ziyatdinova G, Kozlova E, Budnikov H. Polyquercetin/MWNT-modified Electrode for the Determination of Natural Phenolic Antioxidants. Electroanalysis. 2017 Nov;29(11):2610-9.