اصطناع مشتقات ليبوفيلية جديدة لحمض كافئيك ودراسة فعاليتها المضادة للأكسدة

زيد الحاج قنبر*، كمال خضري، محمد نوري شيخ اسماعيل زاده**، إبراهيم دعبول****

*طالب دراسات عليا (دكتوراه)، قسم الكيمياء، كلية العلوم، جامعة حلب

** قسم الكيمياء، كلية العلوم، جامعة حلب

الملخص

أصبح اصطناع مضادات أكسدة طبيعية جديدة محط اهتمام كبير لكثيرٍ من الباحثين. وبما أن حمض الكافئيك أحد أهم حموض هيدروكسي سينامك الموجودة في الطبيعة لتميزه بالعديد من الخصائص الحيوية الهامة إضافة لفعاليته كمضاد للأكسدة. لذلك، قمنا في هذا البحث باصطناع مشتقات ليبيدية جديدة لحمض الكافئيك، وذلك بحماية الزمر الفينولية له بزمر أسيتوكسي، ومن ثم تحويله لمشتق كلوريد الحمض الموافق، ومفاعلة هذا الأخير مع α– أحادي غليسريد أولات للحصول على - 2,1ثنائي(4,3- ثنائي أسيتوكسي سينامويل)-3-أولويل غليسرول متبوعاً بفك حماية الزمر الفينولية للحصول على 2,1- ثنائي كافويل-3-أولويل غليسرول. درست الفعالية المضادة للجذور الحرة لـ 2,1- ثنائي كافويل-3-أولويل غليسرول، وقد بينت النتائج ازدياداً طفيفاً في الفعالية مقارنة مع حمض كافئيك، كما درست الفعالية المضادة للأكسدة والقدرة الإرجاعية للمشتق الجديد وأظهرت النتائج ازدياد في قيمها مقارنة مع حمض الكافئيك.

الكلمات المفتاحية: حمض كافئيك، α– أحادي غليسريد أولات، ليبيدات فينولية جديدة، فعالية مضادة للأكسدة.

ورد البحث للمجلة بتاريخ ١ 2017/9/6

قبل للنشر بتاريخ ١ 2017/10/3

Synthesis of Novel Lipophilic Derivatives of Caffeic Acid and Studying Their Antioxidant Activity

Zaid Alhaj Qanbar*, Kamal Khoudari, Mohammad Nouri Sheikh Ismail Zada**, Ibrahim Da'aboul****

* Postgraduate Student (Ph.D.), Dept. of Chemistry, Faculty of Science, University of Aleppo

****** Dept. of Chemistry, Faculty of Science, University of Aleppo

Abstract

The synthesis of new antioxidants has become a major concern for many researchers. On the other hand, caffeic acid is one of the most important hydroxycinnamic acids found in nature because it has many important biological properties in addition to its antioxidant activity. In this study, we synthesized new lipophilic derivatives of caffeic acid by protecting the phenolic groups with an acetoxy group, then converting it to the corresponding acid chloride. After that it was reacted with α-Monoglyceride Oleate to obtain 1,2-di(3,4-diacetoxycinnamoyl)-3-oleoyl glycerol, followed by deprotection of phenolic group to obtain 1,2-dicaffeoyl-3-oleoyl glycerol. The antiradical activity was studied for 1,2-dicaffeoyl-3-oleoyl glycerol. The results showed a slight increase in activity compared to caffeic acid. The antioxidant activity and reducing power of the new derivative were studied. The results showed an increase in their values compared to caffeic acid.

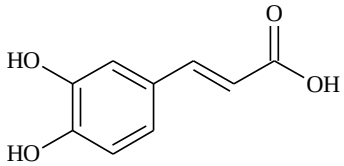
Keywords: Caffeic Acid, α-Monoglyceride Oleate, Novel Phenolipids, Antioxidant Activity.

Received 6/9/2017
Accepted 3/10/2017

1- المقدمة:

تعد حموض هيدروكسي سينامیك من أهم الحموض الفينولية الموجودة بشكلٍ واسع في المملكة النباتية، وتتميز بالعديد من الخصائص الحيوية الهامة كمضادات للأكسدة وكمضادات للالتهاب والتحسس والميكروبات والفيروسات ومضادات تسرطن، وكواقيات للأشعة فوق البنفسجية، إضافة لامتلاكها تطبيقاتٍ عديدة في الصناعات الغذائية والصيدلانية ومواد التجميل [2,1].

و لعل من أهم حموض هيدروكسي سينامیك هو حمض الكافئيك (حمض 4,3- ثنائي هيدروكسي سينامیك) الذي يوجد بشكلٍ واسعٍ في المملكة النباتية، كما يوجد في العديد من أنواع الخضار والفواكه وفي زيت الزيتون وحبيبات البن [4,3].

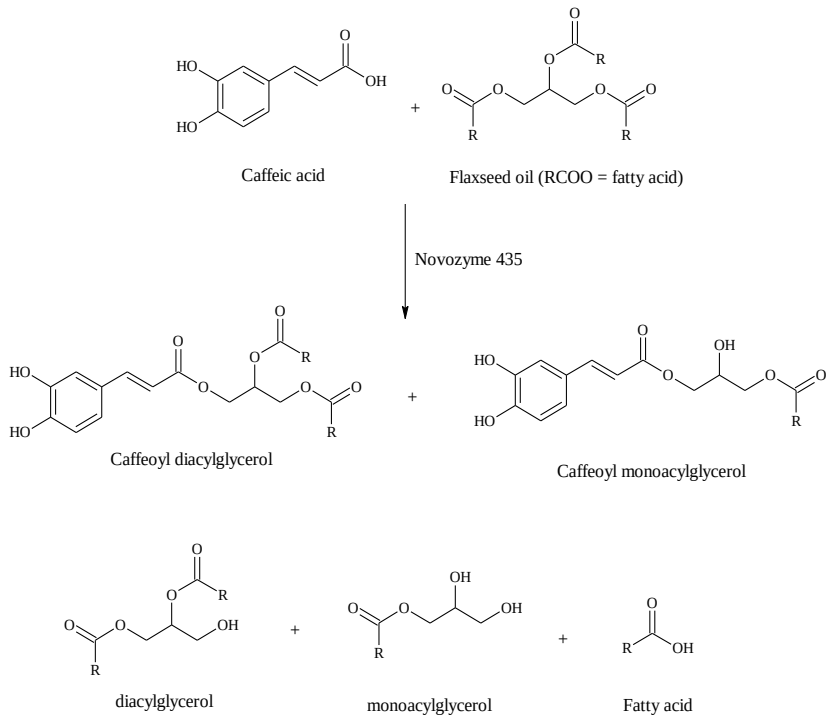


Caffeic acid

يمتلك حمض الكافئيك العديد من الخصائص الحيوية الهامة المعروفة لحموض هيدروكسي سينامیك إضافة لفعاليته كمضاد أكسدة، كما أن تعديل بنية حمض الكافئيك بتحويله إلى الإسترات أوالأميدات الموافقة يمكن أن يزيد من فعاليته الحيوية [5].

تصنف الحموض الفينولية عموماً كمركبات حساسة تجاه شروط التفاعل المختلفة كالحرارة والضوء، وقد تتأكسد في شروط pH معينة [6]، لذلك فإن الأسترة الكيميائية المباشرة لاتعد مناسبة لإصطناع الإسترات الليبوفيلية لحمض كافئيك وإنما يتم اللجوء في كثير من الأحيان لاصطناع الغليسريدات المشتركة لحمض دسم مع حمض الكافئيك بالأسترة الأنزيمية.

فقد درست كربون وزملائها (Karboune *et al* 2008) اصطناع مشتقات ليبيدية لحمض الكافئيك مع زيت بذرة الكتان (غليسريد ثلاثي) باستخدام الليباز Novozym 435 كحفاز، ولم يتجاوز المردود 11% بعد 8 أيام من التفاعل بدرجة حرارة 55°م [7].

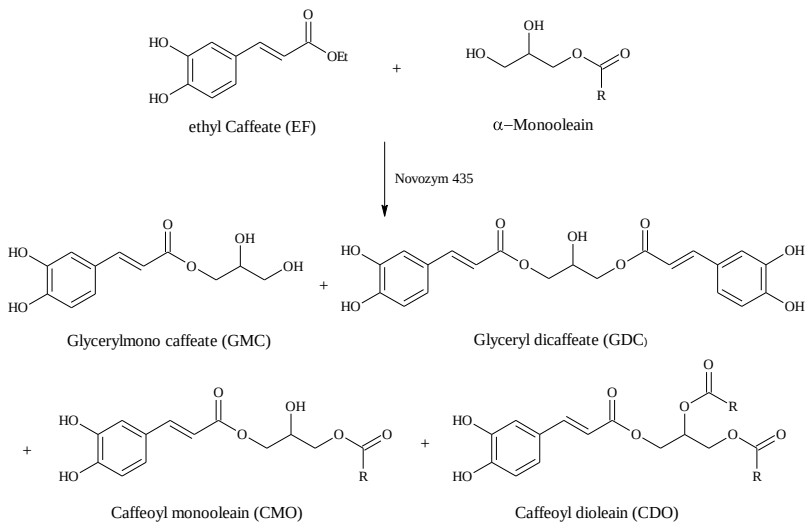


المعادلة (1): صيغ الليبيدات الفينولية الناتجة بالأسترة التبادلية للغليسريدات الثلاثية مع حمض كافئيك.

حضر سون ورفاقه (Sun *et al* 2017) مشتقات ليبيدية لكافئات الإتيل مع زيت الخروع castor oil باستخدام نفس الأنزيم السابق فحصل على مردود 78% بعد 46 ساعة من التفاعل عند درجة حرارة 90ºم [8]. إلا أنه ومن مساوئ هذه الطريقة الحصول على العديد من مشتقات حمض الكافئيك لاحتواء الغليسريد الثلاثي المستخدم (الزيت) على مزيج منَ الحموض الدسمة (المعادلة1)، كما أنها تحتاج لأزمنة تفاعل طويلة جداً.

يمكن أن تحضر المشتقات الليبيدية لحمض الكافئيك بالأسترة التبادلية للغليسريدات الأحادية مع كافئات الإتيل، وقد أظهرت دراسة حديثة لسون ورفاقه (Sun *et al* 2017) على الأسترة التبادلية لكافئات الإتيل مع أحادي أولين باستخدام الليباز Novozym 435 كحفاز أن استخدام الغليسريدات الأحادية يزيد من الإنتقائية لتشكيل المشتقات الهيدوفيلية لحمض الكافئيك كأحادي غليسريد كافيئات وثنائي

غليسريد كافيئات (المعادلة14)، ولم يتجاوز مردود المشتقات الليبوفيلية 15% بعد 60 ساعة من التفاعل عند درجة الحرارة 80ºم [9].



المعادلة (2): صيغ الليبيدات الفينولية والفينولات الهيدروفيلية الناتجة بالأسترة التبادلية للغليسريدات الأحادية مع كافيئات الإتيل.

أما الدراسات حول تحضير أولينات الكافويل بتفاعل حمض الكافئيك مع α– أحادي أولين (α– أحادي غليسريد أولات) فتكاد تكون معدومة، حيث لم نعثر على أية دراسة تناولت تحضير هذه المركبات بالطرائق الكيميائية.

2- أهمية البحث وأهدافه:

تستخدم مضادات الأكسدة الصنعية على نحوٍ واسعٍ كإضافات في مجال الصناعات الغذائية، وعلى الرغم من كفاءتها العالية وكلفتها المنخفضة فإن هناك قلقٌ متزايدٌ حول التأثيرات الجانبية المحتملة لهذه الإضافات على الصحة، حيث تشير بعض الدراسات الى أن هذه المركبات قد تكون مسرطنة، مما أدى إلى انخفاض الطلب العام عليها. وكنتيجة لذلك أصبح تطوير مضادات أكسدة طبيعية جديدة محط اهتمام كبير لكثيرٍ من الباحثين.

وحيث أن حمض كافئيك يتميز بالكثير من الخصاص الحيوية الهامة إضافة لفعاليته كمضاد للأكسدة، ولكن نتيجة لانحلاليته الضعيفة في الأوساط الليبوفيلية

السبب الذي يحد من استخداماته في الزيوت والمواد الدسمة الأخرى، لذلك فقد توجهنا في دراستنا هذه لتعديل بنية حمض الكافئيك عن طريق ربطه مع α- أحادي غليسريد أولات للحصول على مشتقات ليبيدية جديدة له يمكن استخدامها كمضادات أكسدة في الزيوت والمستحلبات الغذائية والمواد الصيدلانية متعددة الأطوار.

3- الأجهزة والمواد المستخدمة:

3-1- الأجهزة المستخدمة:

1- جهاز الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء من شركة Shimadzu نوع LC-20AD مزود بكاشف مطياف الكتلة MS من نوع LCMS-2010EV.

2- جهاز مطافية الأشعة تحت الحمراء (IR) من شركة Jasco نموذج 4100.

3- ميزان حساس من شركة Sartorius، نموذج BL 210S.

4- مبخر دوار من شركة HAHNVAPOR نموذج HS-2005V.

5- جهاز الأشعة فوق البنفسجية والمرئية UV/VIS – Spectrophotometer، من شركة هاش HACH موديل DR/4000 U.

6- جهاز قياس درجة الإنصهار من شركة Electrothermal.

7- جهاز الأمواج فوق الصوتية Ultrasonic من انتاج شركة QH Kerry Limited.

8- مثقلة 1000 دورة / دقيقة من شركة Janetzki ، موديل T5.

9- جهاز قياس pH شركة Eutech Cyberneetics موديل500 Cyberscan pH.

3-2- المواد المستخدمة: حمض كافئيك، كلوريد الثيونيل، بلا ماء حمض الخل، بيريدين، ثنائي متيل فورم أميد DMF، β-كاروتِن، صفائح كروماتوغرافيا الطبقات الرقيقة من الألمنيوم مطلية بالسيليكاجل GF_{254} من شركة Merck. 2,2- ثنائي فنيل-1- بيكريل هيدرازيل (DPPH), بوتيلات هيدروكسي انيسول (BHA)، بوتيلات هيدروكسي تولوين (BHT)، فيتامين E، حمض لينوليك من إنتاج شركة (Sigma-Aldrich)، حمض أسكوربيك من إنتاج شركة (BDH). محلات وحموض وأملاح مختلفة عالية النقاوة. α-أحادي غليسريد أولات تم اصطناعه وتنقيته انطلاقاً

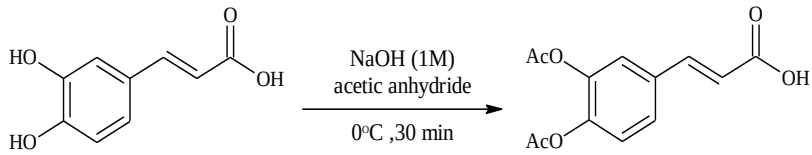
من حموض دسمة مستخلصة من زيت البيرين وفق طريقة تم نشرها في مقالة سابقة [10].

4- القسم العملي:

4-1- اصطناع المشتق الليبيدي لحمض الكافئيك:

4-1-1- حماية الزمر الفينولية لحمض الكافئيك باستخدام زمرة الأسيتوكسي:

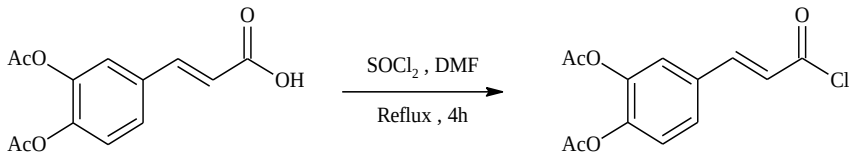
يُوضع 0.9غ (5 ميلي مول) من حمض الكافئيك في حوجلة أحادية الفتحة سعة 50 مل ويضاف إليه 15 مل من محلول هيدروكسيد الصوديوم (1M)، يحرك المزيج حتى تمام الانحلال ثم يضاف إليه 5 مل من بلا ماء حمض الخل المقطر حديثاً ويحرك المزيج لمدة 30 دقيقة في حمام ثلجي فيتشكل راسب، يرشح الراسب على قمع بوخنر تحت الضغط المخفف ويغسل بالماء البارد ثم يجفف وتعاد بلورته من الايتانول، لنحصل على صفائح بلورية رقيقة بلون أصفر بني من حمض,4,3- ثنائي أسيتوكسي سينناميك (حمض ثنائي أسيتوكسي كافئيك) بمردود 68%.



3,4-Dihydroxycinnamic acid (Caffeic acid) 3,4-Diacetoxycinnamic acid

4-1-2- تحضير مشتق كلوريد الأسيل لحمض الكافئيك المحمي:

يُوضع في حوجلة أحادية سعة 25 مل مقدار 0.53 غ (2 ميلي مول) من حمض ثنائي أسيتوكسي كافئيك ويضاف إليها 5 مل من كلوريد الثيونيل $SOCl_2$ المقطر حديثاً ونقطتان من ثنائي متيل فورم أميد DMF، يسخن المزيج في شروط التقطير المرتد لمدة 4 ساعات، يبرد المزيج ويبخر كلوريد الثيونيل الفائض على المبخر الدوار تحت الضغط المخفف فنحصل على سائل لزج مائل للزهري من كلوريد 4,3- ثنائي أسيتوكسي السيناميل يتم استخدامه في الخطوات اللاحقة دون عمليات تنقية إضافية.



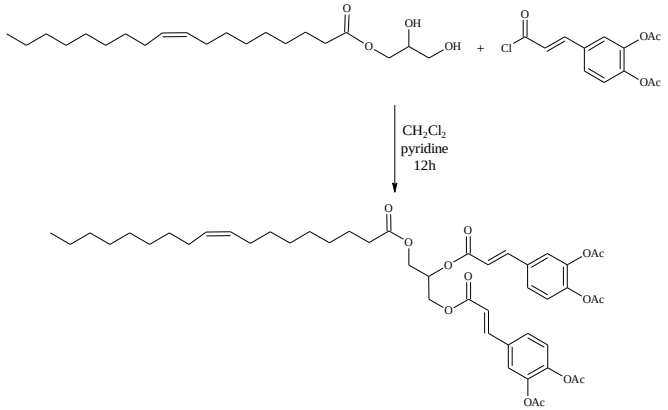
3,4-Diacetoxycinnamic acid

3,4-Diacetoxycinnamoyl chloride

4-1-3- تفاعل كلوريد 4,3- ثنائي أسيتوكسي السيناميل مع α- أحادي غليسريد أولات (تحضير الليبيد الفينولي المحمي):

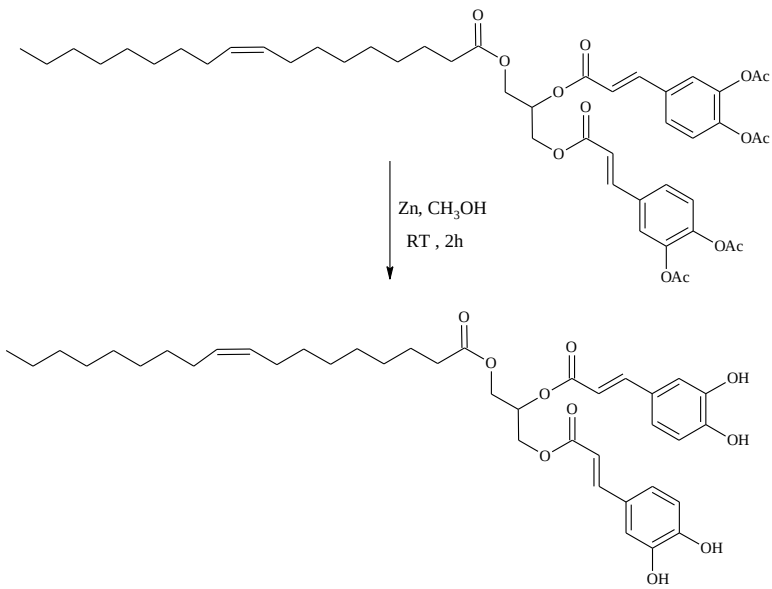
تُوخذ حوجلة التفاعل السابقة الحاوية على كلوريد 4,3- ثنائي أسيتوكسي السيناميل ويضاف إليها 5 مل ثنائي كلورو ميتان مع التحريك حتى تمام الانحلال ثم يضاف إليه ببطيء 2 مل بيريدين و71.2 ملغ (0.2 ميلي مول) من α- أحادي غليسريد أولات، يحرك المزيج بخلاط مغناطيسي لمدة 12 ساعة عند درجة حرارة الغرفة. عند نهاية التفاعل تبخر المحلات ويحل المزيج المتبقي بـ 25 مل من خلات الاتيل وينقل الى قمع فصل 100 مل ويغسل بمحلول بارد لحمض كلور الماء 10% (20×2) مل ثم بمحلول مشبع من كلوريد الصوديوم (20×2) مل، وأخيراً يغسل بـ 20 مل ماء مقطر ويجفف بكبريتات الصوديوم اللامائية ويبخر المحل على المبخر الدوار (ويتم استخدامه في الخطوة اللاحقة دون عمليات تنقية إضافية).

كما يُؤخذ جزء من الناتج وينقى بكروماتوغرافيا الطبقات الرقيقة TLC باستخدام الطور المتحرك (خلات إتيل: ايتر بترول) بنسب حجمية (2:1) ليتم الحصول على سائل زيتي مائل للصفرة بمردود 49%.



4-1-4- فك حماية الزمرة الفينولية:

يوضع في حوجلة سعة 25 مل مقدار 100 ملغ من المزيج السابق الذي يحتوي على المشتق الليبيدي لحمض كافئيك المحمي ثم يضاف 15 مل ميتانول و25 ملغ مسحوق الزنك المنشط حديثاً. يحرك المزيج بخلاط مغناطيسي عند درجة حرارة الغرفة لمدة ساعتين مع مراقبة سير تفاعل بكروماتوغرافيا الطبقات الرقيقة TLC وباستخدام الطور المتحرك (خلات إتيل: ايتر بترول) بنسب حجمية (1:1) ويتم الكشف عن البقع باستخدام مصباح UV عند الطول الموجي 254 نانومتر، لنحصل على سائل زيتي عديم اللون بمردود 87%.



2-4- التحاليل:

1-2-4- تحليل المركبات المصطنعة بمطيافية IR:

تم بتحضير قرص (1%) للمركبات المصطنعة في KBr، ومن ثم تسجيل الطيف باستخدام جهاز مطيافية الأشعة تحت الحمراء.

2-2-4- تحديد هوية المركبات المصطنعة باستخدام HPLC-MS:

تم تسجيل طيوف الكتلة للمركبات المصطنعة باستخدام جهاز الكروماتوغرافيا

السائلة عالية الأداء المزود بكاشف مطياف الكتلة MS وفق الشروط التالية: الطور المتحرك: ميتانول، التدفق: 0.2 مل/ دقيقة، حرارة العمود: 35°م، نمط التأين: موجب وسالب.

4-3- دراسة الفعالية المضادة للأكسدة للمركبات المصنعة:

4-3-1- تحديد فعالية تثبيط الجذور الحرة لليبيدات الفينولية المصنعة (إختبار DPPH):

4-3-1-1- تحضير المحاليل العيارية :

تحضر سلاسل عيارية لكل من حمض الكافئيك ومشتقه الليبيدي المصطنع وحمض أسكوربيك وبوتيلات هيدروكسي أنيسول BHA وبوتيلات هيدروكسي تولوئين BHT و فيتامين E في الإيتانول بالتراكيز الموضحة في الجدول (1):

الجدول (1): السلاسل العيارية لمضادات الأكسدة المدروسة ومشتق حمض الكافئيك المصطنع.

المادة المضادة للأكسدة	التركيز (ملغ/ ل)
حمض كافئيك	(10,8,6,4,2)
2,1-ثنائي كافيويل-3-أولويل غليسرول (DCMO)	(50,40,30,20,10)
فيتامين E	
حمض أسكوربيك	(25,20,15,10,5)
BHT ، BHA	(100,80,60,40,20)

4-3-1-2- طريقة العمل :

العينة: يُؤخذ 1 مل من المحلول العياري للمادة المضادة للأكسدة ويضاف إليه 3 مل من محلول DPPH المحضر حديثاً بتركيز 10^{-4}مول/ ل، يحرك المزيج ويترك لمدة 30 دقيقة في الظلام بدرجة حرارة الغرفة، ثم تقاس الامتصاصية عند الطول الموجي 517 نانومتر باستخدام جهاز مطيافية الأشعة فوق البنفسجية والمرئية وباستخدام الإيتانول كمحلول شاهد Blank.

المحلول القياسي Control solution: يُؤخذ 1 مل من الإيتانول بدلاً من العياري ويتم العمل بنفس الطريقة السابقة.

4-3-1-3- الحسابات: حسبت فعالية تثبيط الجذور الحرة اعتماداً على قيمة التركيز الفعال (EC_{50}) Efficient Concentration وهي قيمة تركيز المحلول بواحدة

ميكرومول/ل الذي تم عنده تثبيط 50% من الكمية الإبتدائية لجذور DPPH. حيث تشير قيمة EC_{50} الأدنى إلى الفعالية الأعلى. ولسهولة المقارنة مابين النتائج حسبت القدرة المضادة للجذور الحرة (ARP) Antiradical Power بتطبيق العلاقة المرجعية التالية:

$$ARP = 1/ EC_{50}$$

4-3-2- تحديد الفعالية المضادة للأكسدة (اختبار تبييض β–كاروتِن):

4-3-2-1- تحضير المحاليل :

المحلول A: يحل 2 ملغ من β–كاروتِن مع 20 ملغ من حمض لينوليك و 200 ملغ من توين 80 في 10 مل كلوروفورم، يبخر الكلوروفورم تحت الضغط المخفف على المبخر الدوار عند درجة حرارة لاتتجاوز 40°م حتى الجفاف، ثم يضاف مباشرة 50 مل ماء مقطر مشبع بالأوكسجين، ويستحلب المزيج تحت الأمواج فوق الصوتية لمدة دقيقة واحدة.

المحلول B: يحضر بنفس طريقة تحضير المحلول A بدون إضافة β–كاروتِن.

4-3-2-2- طريقة العمل :

العينة: يؤخذ 0.5 مل من محلول المادة المضادة للأكسدة بتركيز 1 ميلي مول/ ل في الميتانول لكل عينة ويضاف إليه 5 مل من المحلول A، توضع محاليل العينات في حمام مائي عند الدرجة 50°م وتقاس الامتصاصية عند الطول الموجي 470 نانومتر وذلك خلال ساعتين باستخدام جهاز مطيافية الأشعة فوق البنفسجية والمرئية.

المحلول القياسي Control: يؤخذ 0.5 مل من الميتانول ويتم العمل بنفس الطريقة السابقة.

المحلول الشاهد Blank: يؤخذ 0.5 مل من الميتانول ويضاف إليه 5 مل من المحلول B، توضع في حمام مائي عند الدرجة 50°م وتستخدم من أجل ضبط جهاز مطيافية الأشعة فوق البنفسجية والمرئية.

4-3-2-3- الحسابات: تحسب فعالية مضادات الأكسدة (AA%) من العلاقة :

$$AA\% = [1- (As_0 – As_{120}/Ac_0 – Ac_{120})] \times 100$$

حيث : AA% = النسبة المئوية للفعالية المضادة للأكسدة .

As_0 , As_{120}= امتصاصية محلول العينة عند الزمن 0 و120 دقيقة على الترتيب.
Ac_0 , Ac_{120}= امتصاصية المحلول القياسي عند الزمن 0 و120 دقيقة على الترتيب.

4-3-3- تحديد القدرة الإرجاعية Reducing power:

4-3-3-1- العينة: يؤخذ 1 مل من محلول المادة المضادة للأكسدة بتركيز 500 ميكرومول/ل في الميتانول ويضاف إليه 2.5 مل من محلول الفوسفات الموقي (pH=6.6) و 2.5 مل فري سيانيد البوتاسيوم (1% *v/w*) ويترك المزيج عند الدرجة 50°م لمدة 20 دقيقة ثم يضاف 2.5 مل ثلاثي كلورو حمض الخل (10% *v/w*) ويوضع المزيج في المثفلة لمدة 10 دقائق، ثم يؤخذ2.5 مل من الطبقة العلوية وتمزج مع 2.5 مل من الماء المقطر و0.5 مل كلوريد الحديد (0.1% *v/w*)، وتقاس الامتصاصية لجميع العينات عند الطول الموجي 700 نانومتر باستخدام جهاز مطيافية الأشعة فوق البنفسجية والمرئية.

4-3-3-2-المحلول الشاهد Blank: يُستخدم 1 مل من الميتانول بدلاً من المادة المضادة للأكسدة ويتم العمل بنفس الطريقة السابقة.

4-3-3-3-الحسابات: يتم مقارنة قيم الامتصاصية الناتجة مباشرة لمعرفة القدرة الإرجاعية للمركبات المدروسة.

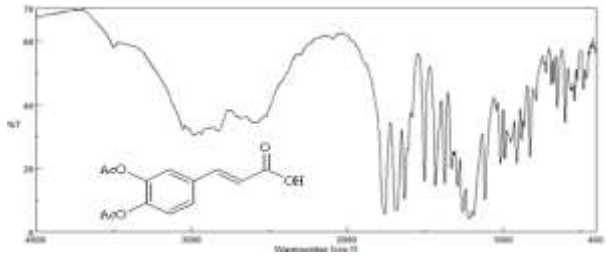
5- النتائج والمناقشة:

5-1- تحديد هوية المركبات المصطنعة:

5-1-1- 4,3− ثنائي أسيتوكسي سينامايك (I):

يبين الشكل (1) طيف الأشعة تحت الحمراء للمركبI. حيث نلاحظ وجود حزمة امتصاص عند العدد الموجي $1758cm^{-1}$ لإمتطاط الرابطة C=O في زمرة الأستيل، وتظهر حزمة امتصاص عند $1688cm^{-1}$ لإمتطاط الرابطة C=O في زمرة الكربوكسيل المجاورة لحلقة عطرية. وتظهر حزمة امتصاص عريضة في المجال $2300\text{-}3400cm^{-1}$ لإمتطاط الرابطة O-H الكربوكسيلية، وتظهر عدة حزم امتصاص ضمن المجال $1000\text{-}1300\ cm^{-1}$ لإمتطاط الروابط C-O، ويُرى في الطيف عدة حزم امتصاص عند $1504cm^{-1}$,1582, 1631 للرابطة المضاعفة في الحلقة العطرية

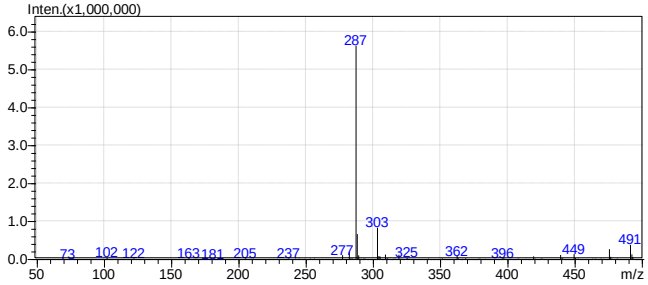
C=C بالإضافة للحزم الواقعة على يمين cm^{-1} 3000 لامتطاط C-H= للحلقة العطرية .



الشكل (1): طيف الأشعة تحت الحمراء للمركب I ، والذي تظهر فيه القمم التالية:

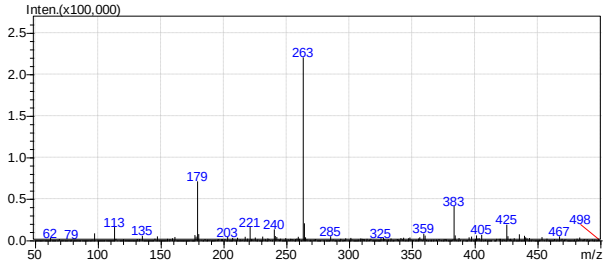
IR(KBr,cm^{-1}): 2300-3400 (O-H Stretch), 3054 (=C-H), 2985, 2838 (C-H), 1758 (C=O,CH_3CO), 1688 (C=O,COOH), 1631, 1582, 1504 (C=C) 1373 (CH_3), 1000-1300 (C-O).

كما يظهر الشكل (2) طيف الكتلة للتأين الموجب للمركب I، حيث نلاحظ ظهور شظية الأيون الجزيئي مضافاً إليها صوديوم $[M+Na]^+$ عند m/z=287.



الشكل (2): طيف الكتلة للتأين الموجب للمركب I.

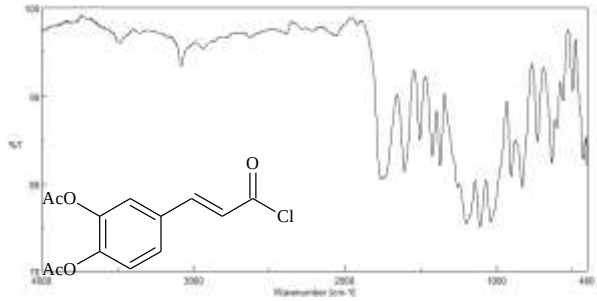
و يبين الشكل (3) طيف الكتلة للتأين السالب للمركب I، حيث نلاحظ ظهور شظية الأيون الجزيئي منقوصاً منها هيدروجين $[M-H]^-$ عند m/z=263.



الشكل (3): طيف الكتلة للتأين السالب للمركب I.

5-1-2- كلوريد 4,3- ثنائي أسيتوكسي السينامويل (II):

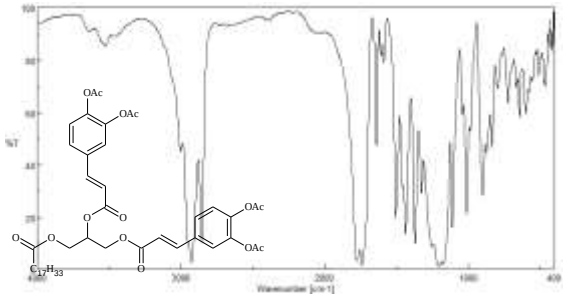
يبين الشكل (4) طيف الأشعة تحت الحمراء للمركب II. حيث نلاحظ ظهور حزمة امتصاص عند $1762cm^{-1}$ لإمتطاط C=O، وحزمة امتصاص عند $633cm^{-1}$ لإمتطاط الرابطة C-Cl. وعدة حزم امتصاص ضمن المجال cm^{-1} 1000-1300 لإمتطاط الروابط C-O، ويُرى في الطيف حزم امتصاص عند $1505cm^{-1}$,1606 للرابطة المضاعفة في الحلقة العطرية C=C بالإضافة للحزم على يمين $3000\ cm^{-1}$ لامتطاط C-H= للحلقة العطرية .



الشكل (4): طيف الأشعة تحت الحمراء للمركب II، والذي تظهر فيه القمم التالية:
IR(KBr,cm^{-1}): 3079 (=C-H), 2936(C-H), 1762 (C=O), 1606, 1505 (C=C) 1371 (CH_3), 1000-1300 (C-O) 633 (C-Cl).

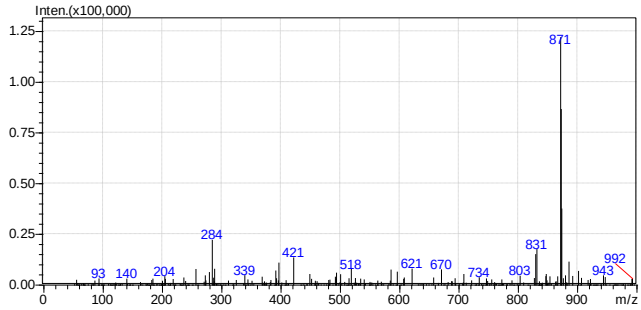
5-1-3- 2,1 -ثنائي(4,3-ثنائي أسيتوكسي سينامويل)-3-أولويل غليسرول (III):

يبين الشكل (5) طيف الأشعة تحت الحمراء للمركب III. حيث نلاحظ ظهور حزمة امتصاص عند $1776cm^{-1}$ لإمتطاط الرابطة C=O في زمرة الأستيل، وحزمة امتصاص عند $1742cm^{-1}$ لإمتطاط الروابط C=O الاسترية. وتظهر حزمة امتصاص عند $722cm^{-1}$ تدل على وجود سلسلة هيدروكربونية طويلة (LCP)، ويُرى في الطيف عدة حزم امتصاص عند$1609,1588,1495cm^{-1}$ للرابطة المضاعفة في الحلقة العطرية C=C بالإضافة للحزم على يمين $3000\ cm^{-1}$ لامتطاط C-H= للحلقة العطرية .



الشكل (5): طيف الأشعة تحت الحمراء للمركب III، والذي تظهر فيه القمم التالية:
IR(KBr,cm^{-1}): 3065, 3003 (=C-H), 2926, 2854 (C-H), 1776 (C=O,CH_3CO), 1742 (C=O,ester), 1609, 1588, 1505 (C=C) 1457 (CH_2), 1371 (CH_3), 1000-1300 (C-O)722 (LCP).

كما يظهر الشكل (6) طيف الكتلة للتأين الموجب للمركب III، حيث نلاحظ ظهور شظية الأيون الجزيئي مضافاً إليها صوديوم $[M+Na]^+$ عند m/z=871.

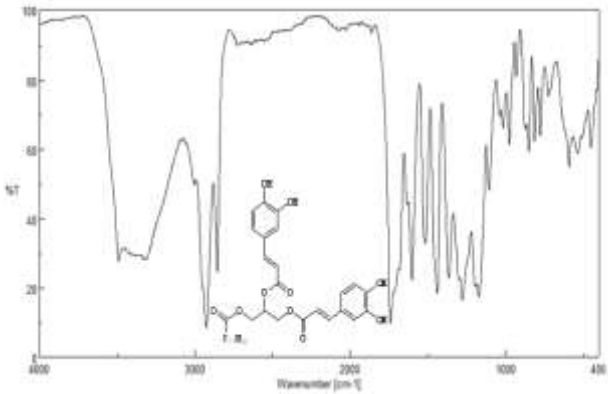


الشكل (6): طيف الكتلة للتأين الموجب للمركب III.

5-1-4-المركب(IV): 2,1- ثنائي (4,3-ثنائي هيدروكسي سينامويل)-3- أولويل غليسرول (DCMO):

يبين الشكل (7) طيف الأشعة تحت الحمراء للمركب IV، حيث نلاحظ ظهور ثلاث حزم امتصاص عند 3489, 3315 cm^{-1} لإمتطاط الروابط O-H الفينولية وحزمة امتصاص عند 1741cm^{-1} لإمتطاط الرابطة C=O لزمرة الأستر الأليفاتية وحزمة امتصاص عند 1684cm-1 لإمتطاط الرابطة C=O لزمرة الأستر العطرية، وتظهر حزمة امتصاص عند 722cm^{-1} تدل على وجود سلسلة هيدروكربونية طويلة (LCP)، ويُرى في الطيف عدة حزم امتصاص عند 1603, 1517 cm^{-1} للرابطة

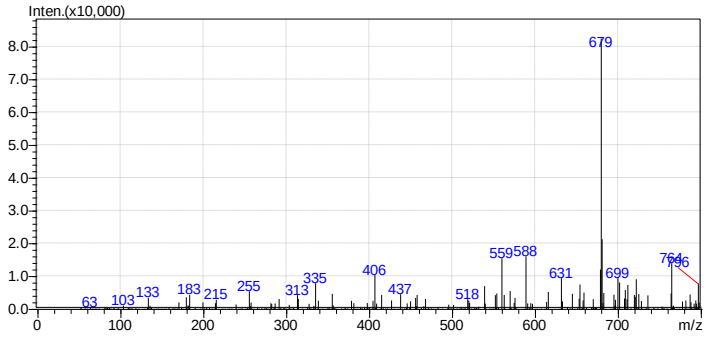
المضاعفة في الحلقة العطرية C=C بالإضافة للحزم على يمين $3000\ cm^{-1}$ لامتطاط C-H= للحلقة العطرية.



الشكل (7): طيف الأشعة تحت الحمراء للمركب IV، والذي تظهر فيه القمم التالية:

IR(KBr,cm^{-1}): 3489, 3315 (O-H Stretch), 3061, 3004 (=C-H), 2926, 2855 (C-H), 1741 (C=O, aliphatic ester), 1684 (C=O, aromatic ester), 1603, 1517 (C=C) 1440 (CH_2), 1366 (CH_3), 1000-1300 (C-O) 725 (LCP).

كما يظهر الشكل (8) طيف الكتلة للتأين السالب للمركب IV، حيث نلاحظ ظهور شظية الأيون الجزيئي منقوصاً منها هيدروجين $[M-H]^-$ عند m/z=679.



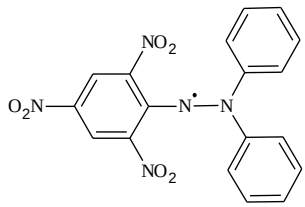
الشكل (8): طيف الكتلة للتأين السالب للمركب IV.

5-2- دراسة الفعالية المضادة للأكسدة لـ 2,1-ثنائي كافويل-3-أولويل غليسرول:

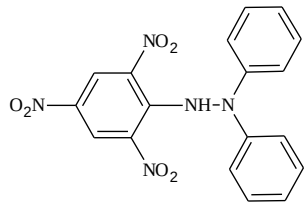
5-2-1- فعالية تثبيط الجذور الحرة (إختبار DPPH):

عند مزج الجذر الحر لثنائي فنيل بكريل هيدرازيل ($DPPH^{\bullet}$) ذو اللون البنفسجي مع ركيزة قادرة على منح هيدروجين (مركب مضاد للأكسدة) سوف يكتسب هيدروجين ويتحول إلى ثنائي فنيل بكريل هيدرازين (الشكل المُرجَع) ذو اللون الأصفر.

$$DPPH^{\bullet}\ (Violet) + ArOH \rightarrow DPPH\text{-}H\ (yellow) + ArO^{\bullet}$$



ثنائي فنيل بكريل هيدرازين



رح رذج) ليزاردية ليركب ليزف يانث)

يبين الجدول (2) قيم EC_{50} و القدرة المضادة للجذور الحرة ARP لحمض الكافئيك ومشتقه الليبيدي (DCMO) ومضادات الأكسدة العيارية.

الجدول (2): قيم EC50 و ARP لمضادات الأكسدة المدروسة ومشتق حمض الكافئيك المصطنع.

المادة المضادة للأكسدة	EC_{50} (mg/l)	EC_{50} (µM)	ARP
حمض الكافئيك	7.3	40.5	24.6
DCMO	26.8	39.4	25.4
حمض الأسكوربيك	12	68	14.6
BHA	26	144	6.9
BHT	30	136	7.3
فيتامين E	36.18	84.1	11.9

بالمقارنة بين قيم EC_{50} (µM/l) الواردة في الجدول (2) نلاحظ أن ازدياداً طفيفاً في الفعالية المضادة للجذور الحرة للمشتق الليبيدي لحمض كافئيك مقارنة مع الحمض الأصلي، كما أنها أكبر من فعالية مضادات الأكسدة العيارية المدروسة (حمض الأسكوربيك، فيتامين E، BHA، BHT).

5-2-2- الفعالية المضادة للأكسدة (اختبار تبييض β-كاروتِن):

تتولد جذوراً حرة لحمض اللينوليك ($ROO^{\bullet}$) وبدورها تهاجم جزيئة β-كاروتِن (carot-H) فتتأكسد وتتحطم جزئياً مما يؤدي إلى زوال اللون البرتقالي للمزيج، ويمكن مراقبة زوال اللون البرتقالي (تبييض β-كاروتِن) طيفياً، ويؤدي وجود مضادات الأكسدة (ArOH) في المزيج إلى تأخير تبييض β-كاروتِن. ويبين الجدول (3) قيم الفعالية المضادة للأكسدة لمضادات الأكسدة المدروسة ومشتق حمض الكافئيك.

الجدول (3): قيم الفعالية المضادة للأكسدة لمضادات الأكسدة المدروسة ومشتق حمض الكافئيك.

المادة المضادة للأكسدة	الفعالية المضادة للأكسدة (%)
حمض الكافئيك	25.8

DCMO	42.4
حمض الأسكوربيك	14.6
BHA	68.5
BHT	69.8
فيتامين E	71.8

نلاحظ من الجدول (3) ازدياد الفعالية المضادة للأكسدة للمشتق الليبيدي لحمض الكافئيك مقارنةً مع الحمض الأصلي بمقدار 65%، ولكنها أقل من فعالية فيتامين E ومضادات الأكسدة الصنعية BHA وBHT .

5-2-3- القدرة الإرجاعية:

يعتمد مبدأ قياس القدرة الارجاعية على قدرة مضاد الأكسدة على إرجاع أيونات الحديد الثلاثي Fe^{3+} إلى الحديد الثنائي Fe^{2+} وتشكل معقد أزرق بروسيا الذي يمتلك امتصاصية قوية عند الطول الموجي 700 نانومتر، وتعتبر القدرة الارجاعية مؤشراً هاماً للنشاط المحتمل لمضادات الأكسدة، وتشير الامتصاصية الأعلى إلى القدرة الارجاعية الأعلى. ويبين الجدول (4) قيم القدرة الإرجاعية لحمض الكافئيك ومشتقه الليبيدي المحضر ومضادات الأكسدة العيارية.

الجدول (4) القدرة الإرجاعية لمضادات الأكسدة المدروسة ومشتق حمض الكافئيك المصطنع.

المادة المضادة للأكسدة	القدرة الإرجاعية
حمض الكافئيك	1.08
DCMO	1.28
حمض الأسكوربيك	1.24
BHA	0.71
BHT	0.68
فيتامين E	0.53

نلاحظ ازدياد القدرة الارجاعية للمشتق الليبيدي لحمض الكافئيك مقارنةً مع الحمض الأصلي بمقدار 19%، كما أنها كانت أعلى من القدرة الإرجاعية لمضادات الأكسدة العيارية المدروسة (حمض الأسكوربيك، فيتامين E، BHA، BHT).

6- الاستنتاجات:

1. تعد عملية حماية الزمر الفينولية لحمض كافئيك ومن ثم تحويله لمشتق كلوريد الأسيل طريقة فعالة لأسترته مع α− أحادي غليسريد أولات.

2. تم اصطناع مشتق ليبيدي جديد لحمض ثنائي أسيتوكسي كافئيك هو 2,1- ثنائي (4,3- ثنائي أسيتوكسي سيناميل)-3-أولويل غليسرول وتم تحديد هويته باستخدام IR و HPLC-MS.
3. تم اصطناع مشتق ليبيدي جديد لحمض الكافئيك وهو 2,1- ثنائي كافيويل -3- أولويل غليسرول وتم تحديد هويته بإستخدام IR و HPLC-MS.
4. بينت نتائج الفعالية المضادة للجذور الحرة للمركب الجديد 2,1-ثنائي كافيويل -3- أولويل غليسرول ازدياد طفيف في الفعالية مقارنة مع حمض الكافئيك.
5. أظهر المركب الجديد 2,1-ثنائي كافيويل-3-أولويل غليسرول فعالية مضادة للأكسدة أعلى بمقدار 65% مقارنة مع الحمض الأصلي.
6. كانت القدرة الإرجاعية لـ 2,1-ثنائي كافيويل -3-أولويل غليسرول أعلى بمقدار 19% بالمقارنة مع الحمض الأصلي.

المراجع

1- Hyeju Jo, Minho Choi, Jaeuk Sim, Mayavan Viji, Siyuan Li, Young Hee Lee, Youngsoo Kim, Seung-Yong Seo, Yuanyuan Zhou, Kiho Lee, Wun-Jae Kim, Jin Tae Hong, Heesoon Lee;(2017)- **Synthesis and biological evaluation of caffeic acid derivatives as potent inhibitors of a-MSH-stimulated melanogenesis.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 27,* 3374–3377.

2- Jose C.J.M.D.S. Menezes , Shrivallabh . Kamat , Jose A.S. Cavaleiro , Alexandra Gaspar, Jorge Garrido, Fernanda Borges ;2011-**Synthesis and antioxidant activity of long chain alkyl hydroxycinnamates**. *European Journal of Medicinal Chemistry,* 46 , 773-777.

3- Fatima de Campos Buzzi, Caroline Liandra Franzoi, Graziele Antonini, Mauricio Fracasso,Valdir Cechinel Filho, Rosendo Augusto Yunes, Rivaldo Niero;(2009)-**Antinociceptive properties of caffeic acid derivatives in mice.** *European Journal of Medicinal Chemistry 44*, 4596–4602.

4- Un Ju Jung, Mi-Kyung Lee, Yong Bok Park, Seon-Min Jeon, and Myung-Sook Choi;(2006)- **Antihyperglycemic and Antioxidant Properties of Caffeic Acid in db/db Mice**. *Journal Of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *Vol. 318*, 483–476

5- Janaína de Cássia Orlandi Sardi,Fernanda Patrícia Gull,Irlan Almeida Freires,Nayla de Souza Pitangui1 Maicon Petrônio Segalla,Marisa Fusco-Almeida, PedroLuiz Rosalen, Luís Octávio Regasini, Maria José Soares Mendes-Giannini;(2016)- **Synthesis, antifungal activity of caffeic acid derivative esters, and their synergism with fluconazole and nystatin against *Candida* spp**. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.*

6- B. Guyot, B. Bosquette, M. Pina, J. Graille;(1997)-**Esterification of phenolic acids from green coffee with an immobilized lipase from Candida antarctica in solvent-free medium**. *Biotechnology Letters*, Vol 19, No 6, 529–532.

7- Salwa Karboune, Richard St-Louis, Selim Kermasha;(2008)-**Enzymatic synthesis of structured phenolic lipids by acidolysis of flaxseed oil with selected phenolic acids**. *Journal of Molecular Catalysis B*: *Enzymatic* ,vol 52, no 53, 96–105.

8- Shangde Sun, Ping Wang, Sha Zhu;(2017)-**Enzymatic incorporation of caffeoyl into castor oil to prepare the novel castor oil-based caffeoyl structured lipids**. *Journal of Biotechnology*.

9- Shangde Sun, Bingxue Hu;(2017)-**Enzymatic preparation of novel caffeoyl structured lipids using monoacylglycerols as caffeoyl acceptor and transesterification mechanism**. *Biochemical Engineering Journal*, 124, 78–87.

10- الحاج قنبر، زيد، خضري، كمال، شيخ اسماعيل زاده، محمد نوري، دعبول، إبراهيم. 2017- **استخدام زيت البيرين الخام كمصدر طبيعي وقابل للتجدد لاصطناع α-أحادي غليسريد أولات**. مجلة بحوث جامعة حلب، العدد 119.