Archive of SID



# مطالعه فعالیت مهارکنندگی آنتی‌اکسیدان ریبوفلاوین در حضور نور خورشید

**الهه وهابی نژاد[a]، محمد مومن هروی[b]***

[a] دانشجوی کارشناسی ارشد گروه شیمی، دانشکده علوم، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران
[b] دانشیار گروه شیمی، دانشکده علوم، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۰۹/۰۹ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۰۳/۲۰



## چکیده

**مقدمه:** رادیکال‌های آزاد، محصولات جانبی طبیعی سوخت و ساز بدن به شمار می‌روند که در حضور آنتی‌اکسیدان‌ها اثر این رادیکال‌های آزاد خنثی شده و آسیب‌های ناشی از آنها کمتر می‌شود. یکی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی ریبوفلاوین می‌باشد که در بیشتر مواد گیاهی و حیوانی وجود دارد. مولکول ریبوفلاوین یک ماده حساس به نور نیز هست که از طریق واکنش فوتوشیمیایی باعث ایجاد تغییر شیمیایی در مولکول‌های مجاور می‌شود. خاصیت آنتی‌اکسیدانی ریبوفلاوین متاثر از تابش نور بوده و حساسیت آن به نور باعث بازده بیشتر خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن می‌شود.

**مواد و روش‌ها:** در این پژوهش چهار پارامتر مهم شامل دما، غلظت ریبوفلاوین، زمان و تابش‌دهی نور بر خاصیت آنتی‌اکسیدانی ریبوفلاوین مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور، فعالیت آنتی‌اکسیدانی ریبوفلاوین بر اساس فعالیت مهار رادیکال آزاد پایدار دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH) به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر UV-Vis تعیین شد.

**یافته‌ها:** فعالیت آنتی‌اکسیدان ریبوفلاوین با افزایش غلظت در گستره غلظتی ۰/۷-۰/۴ میلی‌مولار بیشتر شد. در حضور نور خورشید فعالیت آنتی‌اکسیدانی ریبوفلاوین به گونه‌ای است که رادیکال آزاد DPPH را به طور کامل مهار می‌کند. همچنین در گستره دمایی به کار رفته، با افزایش دما فعالیت آنتی‌اکسیدان در مهار رادیکال آزاد شدیدتر شده است. از نظر سینتیکی، واکنش مهار رادیکال آزاد DPPH با استفاده از معادله سینتیک مرتبه یک توصیف شد.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به مطالعه انجام شده ریبوفلاوین به عنوان یک ماده حساس نوری دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی قابل ملاحظه‌ای در مهار رادیکال آزاد DPPH در حضور نور خورشید می‌باشد.

***واژه‌های کلیدی:*** *ریبوفلاوین، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، نور خورشید، مطالعه سینتیکی*

* نویسنده مسئول مکاتبات email: drmh45@yahoo.com



www.SID.ir

Archive of SID





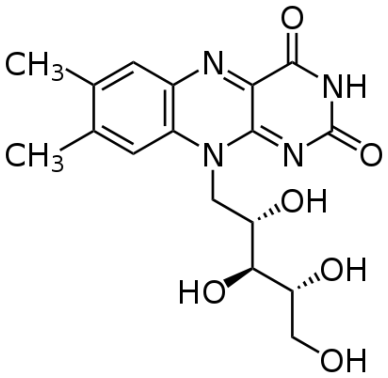
## مقدمه

رادیکال‌های آزاد ترکیباتی بسیار فعال با الکترون منفرد یا جفت نشده هستند. این ترکیبات در حین واکنش اکسیژن با بعضی مولکول‌ها توسط اعمال متابولیکی در بدن ساخته می‌شوند. رادیکال‌های آزاد تمایل زیادی برای به دست آوردن یا از دست دادن یک الکترون داشته تا تعداد الکترون آنها زوج شود. آسیب ناشی از وجود رادیکال آزاد زمانی رخ می‌دهد که رادیکال‌ها برای پیدا کردن الکترون به دیگر مولکول‌ها برخورد کنند (Ardalan *et al*., 2014). رادیکال آزاد اغلب یک الکترون از مولکول مجاور گرفته و تبدیل به یک رادیکال آزاد جدید شده و سپس رادیکال آزاد جدید، زنجیره واکنش را به صورت متوالی تکرار می‌کند و باعث آسیب سلولی و صدمه به DNA می‌شود. آسیب به DNA منجر به اثرات مختلف از جمله پیری زودرس و سرطان خواهد شد (Dizdaroglu and Jaruga, 2012).

رادیکال آزاد در بدن به واسطه پاسخ طبیعی بدن به عوامل بیماری‌زا (Marković *et al*., 2012)، سوخت‌وساز بدن به‌ویژه اکسایش لیپیدی (Sen and Chakraborty, 2011)، استرس (Sen *et al*., 2010)، آلاینده‌های هوا و آب (Nakchat *et al*., 2014)، امواج الکترومغناطیس با انرژی زیاد مثل اشعه ایکس (Sen and Chakraborty, 2011)، مواد غذایی مثل روغن‌های گیاهی هیدروژنه (Sen and Chakraborty, 2011) و برخی داروها مثل آدریاماسین[1] (Kumar *et al*., 2011) تولید می‌شود.

به منظور مقابله با رادیکال‌های آزاد تولید شده، سلول‌های موجود در بدن دارای دفاع داخل سلولی به‌واسطه وجود آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز[2]، کاتالاز[3] و گلوتامین پراکسیداز[4] می‌باشند. علاوه بر این ترکیباتی مانند ویتامین‌ها (C، A، E و گروه ویتامین‌های B) و مواد معدنی (سلنیوم و روی) با رفتار آنتی‌اکسیدانی خود باعث از بین رفتن رادیکال‌های آزاد و در نتیجه کاهش اثرات مضر آن‌ها در بدن می‌شوند (Gutteridge and Halliwell, 1994).

یکی از آنتی اکسیدان‌های طبیعی ریبوفلاوین (ویتامین $B_2$) می‌باشد که در بیشتر مواد گیاهی و حیوانی وجود دارد. ریبوفلاوین، یک ترکیب آلی است که در بیشتر سیستم‌های زنده وجود دارد (شکل ۱). اصطلاح ریبوفلاوین از الکل قندی به نام ریبیتول[5] در ساختارش و از رنگ زرد آن (فلاووس[6] در لاتین) گرفته شده است (Knak *et al*., 2014; Adamolekun *et al*., 2012). از نظر شیمیایی ریبوفلاوین به عنوان یک ترکیب آلی سه حلقه‌ای، سیستم حلقوی ایزوآلوکسازین[7] با یک زنجیر جانبی ریبیتول توصیف می‌شود. نام آیوپاک ریبوفلاوین، ۷ و ۸ دی متیل- ۱۰- (۱-D-ریبیتیل)- بنزو تریدین است و فرمول تجربی و جرم مولکولی آن به ترتیب $C_{17}H_{20}N_4O_6$ و ۳۷۶/۳۶ گرم بر مول است (Adamolekun *et al*., 2012). ریبوفلاوین به طور گسترده‌ای حتی به میزان کم تقریبا در همه غذاهای مشتق شده از حیوانات و گیاهان وجود داشته، اما در غذاهای پروتئینی با منشا حیوانی، میزان آن بیشتر است (Clerici and Carvalho-Silva, 2011).




**شکل ۱- ساختار ریبوفلاوین**

ریبوفلاوین به عنوان یک آنتی اکسیدان متداول از زمان کشف آن در سال ۱۹۲۶ مورد مطالعه قرار گرفته است (Chaudhuri *et al*., 2014). استفاده از ریبوفلاوین به عنوان یک داروی آنتی اکسیدانی در پزشکی متداول است (McNeill *et al*. 2011; Ciliberto *et al*., 2005) و فعالیت این ویتامین تحت نور مرئی، در برخی مطالعات علمی بررسی شده است (Williams and Cheldelin, 1942; Galston and Baker, 1949). مطالعه فرایندهای مختلف تحت تابش نور در موجودات زنده هنوز در بیولوژی، داروشناسی و پزشکی صورت می‌گیرد (Haggi *et al*., 2012).

با توجه به حساسیت ریبوفلاوین به نور، این ماده به دلیل انجام فرایند فوتوشیمیایی یک تغییر شیمیایی در

[1] Adriamycin
[2] Superoxide Dismutase
[3] Catalase
[4] Glutathione Peroxidase
[5] Ribitol
[6] Flavus
[7] Isoalloxazine





www.SID.ir

Archive of SID



مولکول دیگر ایجاد می‌کند (Braslavsky, 2007).

فرآیند حساسیت به نور[1] به‌طور معمول در فوتوبسپارش[2]، تخریب نوری[3] و تجزیه آب استفاده می‌شود (Li *et al*., 2016; Alger, 1996). به طور کلی مواد حساس به نور از طریق جذب تابش الکترومغناطیسی در ناحیه مرئی یا ماوراء بنفش برانگیخته شده و با ایجاد گونه‌های فعال[4] باعث ایجاد تغییرات شیمیایی در مولکول دیگر می‌گردند. مواد حساس به نور به طور معمول در ساختار مولکولی خود دارای سیستم پای مزدوج[5] بوده که در این صورت جذب نور توسط اوربیتال‌های HOMO با انرژی پایین‌تر ممکن است باعث یونش مولکول شود (Avery, 1974). در حال حاضر، بسیاری از دانشمندان در حال تحقیق بر روی راه‌های استفاده از نور خورشید جهت تولید سوخت‌هایی مثل گاز هیدروژن و متانول و همچنین اثر نور بر فرایندهای کاتالیزوری و تخریب آلاینده‌ها می‌باشند. در برخی از این روش‌ها از فوتون‌های خورشیدی جهت دو نیم کردن مولکول‌های آب[6] استفاده می‌شود (Xie *et al*., 2013; Wu *et al*., 2014; Li *et al*., 2016).

در این زمینه، Toyosaki و Mineshita (۱۹۸۹) اثر آنتی‌اکسیدانی ریبوفلاوین را در محلول‌های آبی در تاریکی و در حضور نور مطالعه کرده‌اند. آنها مشاهده کردند محلولی که بعد از تابش نور در تاریکی قرار می‌گیرد، هر چه غلظت ریبوفلاوین در آن بیشتر باشد تجزیه هیدرواکسید نیز بیشتر شده است و دلیل این مشاهده را به خاصیت حساس به نور بودن ریبوفلاوین بیان کردند. Toyosaki (۱۹۹۲) در کاری دیگر اثر آنتی‌اکسیدانی ریبوفلاوین را در طول پراکسایش لیپید در یک سیستم آنزیمی مطالعه کرد. وی دریافت که ریبوفلاوین در این سیستم آنزیمی به عنوان یک آنتی‌اکسیدان عمل کرده و هنگامی که ریبوفلاوین اکسید می‌شود، هیدروپراکسید به عنوان یک پذیرنده الکترون عمل نموده و تجزیه می‌شود. میزان این پدیده با مقدار آنتی‌اکسیدان ریبوفلاوین متناسب است. Chaudhuri و همکارانش (۲۰۱۵) اثر نور مرئی را بر غذاهای حاوی ریبوفلاوین بررسی کرده‌اند. آنها اثر آنتی‌اکسیدانی حساس شده به نور[7] را برای ویتامین $B_2$ در محیط‌های مختلف مطالعه کرده و دریافتند که میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی ریبوفلاوین در حضور نور بیشتر از دو برابر این خاصیت در غیاب نور است. خاصیت آنتی‌اکسیدانی القا شده با نور ریبوفلاوین در تضاد با اثر سمیت نوری گزارش شده است و این به محیط عمل بستگی دارد. مولکول برانگیخته ریبوفلاوین می‌تواند الکترون‌های منتقل شده را به عوامل اکسید کننده مجاور بدهد و فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان دهد و در غیاب مولکول‌های پذیرنده الکترون، گونه‌های فعال اکسیژنی تولید می‌شوند. Chaudhuri و همکارانش (۲۰۱۵) در پژوهشی دیگر، نانوهیبریدی از ریبوفلاوین و نانوذراتی مثل اکسید روی، اکسید تیتانیوم، اکسید آلومینیوم و طلا با اندازه‌های مشابه تهیه کردند. برای بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی ریبوفلاوین از DPPH در تاریکی و در حضور نور آبی استفاده کرده‌اند. در تاریکی تغییر مشهودی در فعالیت آنتی‌اکسیدانی ریبوفلاوین برای این نانوهیبریدها و ریبوفلاوین آزاد مشاهده نشد ولی در حضور نور افزایش زیادی در فعالیت آنتی‌اکسیدان برای نانوهیبریدهای اکسید روی و اکسید تیتانیوم مشاهده شده است. همچنین Anbaraki و همکاران (۲۰۱۶) اثر آنتی‌اکسیدانی ریبوفلاوین را بر پروتئین‌های عدسی چشم در حضور نور خورشید بررسی کرده‌اند. آنها نشان دادند که آنتی‌اکسیدان‌ها مانع مهمی در برابر آثار مخرب نور خورشید هستند.

در مطالعه حاضر فعالیت آنتی‌اکسیدانی ریبوفلاوین در دو شرایط مختلف یکی در غیاب نور و در حضور نور خورشید برای اولین بار به این شیوه بررسی می‌شود. چهار پارامتر تاثیرگذار شامل دما، غلظت ریبوفلاوین، زمان و تابش‌دهی نور به صورت مجزا یا در کنار یکدیگر بر خاصیت آنتی‌اکسیدانی ریبوفلاوین مورد بررسی قرار می‌گیرند. برای بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی از DPPH به عنوان یک رادیکال آزاد استفاده شد و غلظت آن به عنوان معیار در نظر گرفته شد.

## مواد و روش‌ها

در این پژوهش رادیکال آزاد DPPH، ریبوفلاوین و استونیتریل با خلوص بالا استفاده شد. DPPH یک ترکیب شیمیایی آلی با نام آیوپاک دی فنیل- ۲، ۴، ۶-تری

[1] Photosensitivity
[2] Photopolymerizasion
[3] Photodegradation
[4] Reactive Species
[5] Located π Systems
[6] Water Splitting
[7] Photosensitivity



www.SID.ir

Archive of SID





نیتروفنیل ایمینوازانیوم[1] و یک رباینده[2] رادیکال است. از این رو کاهش سرعت یک واکنش شیمیایی می‌تواند با افزودن این رادیکال به عنوان یک شاخص[3] بررسی گردد. از آنجا که DPPH دارای یک نوار جذبی قوی در حدود ۵۲۰ نانومتر است رنگ محلول حاوی این ترکیب بنفش بوده و در حالت خنثی رنگ محلول به بی‌رنگ یا زرد کم رنگ متمایل می‌شود. این خاصیت DPPH این امکان را می‌دهد که بتوان عملکرد واکنش و نیز تغییر میزان رادیکال‌های آغازین موجود در واکنش را با استفاده از تغییر جذب نوری دنبال نمود (Ameta and Sing, 2014; Sharma and Bhat, 2009).

دستگاه طیف‌سنج ماوراء بنفش–مرئی[4] Perkin Elmer Lambda 25 برای بررسی کیفی و کمی میزان DPPH و ریبوفلاوین به کار گرفته شد. محلول استونیتریل تهیه شده DPPH در ۵۱۷ نانومتر دارای بیشینه جذب است و ریبوفلاوین نیز در ۴۵۰ نانومتر دارای بیشینه جذب می‌باشد که از این نظر در اندازه‌گیری جذب رادیکال آزاد DPPH تداخل نمی‌کند. برای تنظیم دما از سیرکولاتور استفاده شد. این دستگاه با اتصال به دستگاه طیف‌سنج ماوراء بنفش–مرئی، دمای سیستم را ضمن واکنش با دقت ۰/۱ کنترل می‌کند و بررسی واکنش در دماهای مختلف را امکان‌پذیر می‌سازد. در انجام آزمایش با نور خورشید میزان خطای دمای اندازه‌گیری ۰/۵ درجه سانتی گراد بود.

در این پژوهش چهار پارامتر مهم شامل دما، غلظت ریبوفلاوین، زمان و تابش‌دهی نور به صورت مجزا یا در کنار یکدیگر بر خاصیت آنتی‌اکسیدانی ریبوفلاوین مورد بررسی قرار گرفته‌اند. برای انجام آزمایشات مربوطه، ابتدا ۲/۵ میلی لیتر از محلول استونیتریلی رادیکال آزاد DPPH با غلظت ۰/۰۵۷ میلی‌مولار درون سل دستگاه طیف‌سنج ریخته شد. سپس طیف جذبی محلول رادیکال آزاد DPPH را در محدوده ۸۰۰–۴۸۰ نانومتر با دستگاه طیف‌سنجی ماوراء بنفش–مرئی گرفته شد. بلافاصله مقدار ۱ میلی‌لیتر محلول ریبوفلاوین با غلظت مشخص به آن اضافه شد. کاهش جذب طیف ماوراءبنفش– مرئی نمونه در بازه زمانی ۸–۰ دقیقه در تاریکی و ۲۲–۰ دقیقه در حضور نور ثبت گردید. برای بررسی اثر غلظت ریبوفلاوین بر خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن غلظت‌های ۰/۴، ۰/۵، ۰/۶ و ۰/۷ میلی‌مولار در حلال آب مقطر تهیه شد. اثر دما در محدوده ۳۷–۲۵ درجه سانتی‌گراد مورد مطالعه قرار گرفت. آزمایش‌های مربوط به اثر دما، غلظت و زمان در غیاب و در حضور نور خورشید انجام شد.

بررسی طیف جذبی رادیکال آزاد DPPH در محیط مورد مطالعه توسط دستگاه طیف‌سنجی ماوراء بنفش – مرئی، طول موج بیشترین جذب را در حدود ۵۱۷ نانومتر نشان داد که بر این اساس در این طول موج بررسی سینتیکی در شرایط مختلف مورد مطالعه قرار گرفت.

### - تجزیه و تحلیل آماری

از نرم افزارهای Excel 2016 و SPSS 18 برای انجام محاسبات و آنالیزهای همبستگی و تحلیل نمودارهای مربوط به داده‌های آزمایشگاهی استفاده شد. در این روش داده‌های تولید شده در آزمایشگاه پس از پایش در گروه‌های مستقل دسته‌بندی (جدول ۱) و سپس ضریب همبستگی پیرسون برای آنها محاسبه شده است.

**جدول ۱- متغیرهای مستقل آزمون آماری و سطوح کد شده**

| متغیرهای مستقل | | سطوح کد شده | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| غلظت | $C_{B2}(\mathrm{mM})$ | ۰/۴ | ۰/۵ | ۰/۶ | ۰/۷ |
| دما | $T\,(^oC)$ | ۲۷ | ۳۱ | ۳۳ | ۳۵ | ۳۷ |

متغیر ثابت سرعت $k(min^{-1})$ به عنوان متغیر مستقل و در شرایط متفاوت مورد آزمون قرار گرفته است. در هر بار آزمون، برای داده های متغیر مستقل و متغیر وابسته، آزمون ضریب همبستگی پیرسون اجرا و نتایج آزمون‌ها در جدول ۲ نمایش داده شده است. این نتایج آماری نشان می‌دهد که داده های آزمایشگاهی دو متغیر غلظت و دما و همچنین ضرایب ثابت سرعت محاسبه شده همبستگی خوبی با هم دارند.

## یافته‌ها

فعالیت آنتی‌اکسیدانی ریبوفلاوین در دو شرایط مختلف یکی در غیاب نور و در حضور نور خورشید مطالعه شد. اثر عوامل مختلف در این دو شیوه مورد بررسی قرار گرفته است.

[1] di(phenyl)-(2, 4, 6- trinitrophenyl) Iminoazaniom [2] Scavenger [3] Indicator [4] UV-Vis Spectroscopy





www.SID.ir

Archive of SID





**جدول ۲- محاسبه ضریب همبستگی برای متغیرهای مستقل و وابسته در غیاب و در حضور نور**

| متغیر مستقل | متغیر وابسته | شرایط | | ضریب همبستگی پیرسون |
|---|---|---|---|---|
| | | **در غیاب نور** | | |
| $C_{B2}$(mM) | $k(min^{-1})$ | غلظت (mM) | ۰/۴ | ۰/۹۹۱۲ |
| | | | ۰/۵ | ۰/۸۷۹۵ |
| | | | ۰/۶ | ۰/۹۹۲۳ |
| | | | ۰/۷ | ۰/۹۹۳۶ |
| $T\ (^oC)$ | $k(min^{-1})$ | دما ($^o$C) | ۲۷ | ۰/۹۹۷۵ |
| | | | ۳۱ | ۰/۹۹۲۲ |
| | | | ۳۳ | ۰/۹۸۳۳ |
| | | | ۳۵ | ۰/۹۹۸۰ |
| | | | ۳۷ | ۰/۹۹۴۵ |
| | | **در حضور نور** | | |
| $C_{B2}$(mM) | $k(min^{-1})$ | غلظت (mM) | ۰/۴ | ۰/۹۹۸۱ |
| | | | ۰/۵ | ۰/۹۸۰۹ |
| | | | ۰/۶ | ۰/۹۹۶۳ |
| | | | ۰/۷ | ۰/۹۸۸۳ |
| $T\ (^oC)$ | $k(min^{-1})$ | دما ($^o$C) | ۲۷ | ۰/۹۹۱۱ |
| | | | ۳۱ | ۰/۹۹۰۶ |
| | | | ۳۳ | ۰/۹۸۷۱ |
| | | | ۳۵ | ۰/۹۸۳۲ |
| | | | ۳۷ | ۰/۹۸۵۷ |





**- اثر غلظت**

به منظور بررسی اثر غلظت ریبوفلاوین بر ویژگی آنتی‌اکسیدانی آن، غلظت‌های ۰/۴، ۰/۵، ۰/۶ و ۰/۷ میلی‌مولار از این ویتامین به کار برده شد. گستره غلظت با توجه به روش سنجش رادیکال آزاد DPPH و رابطه خطی بین جذب و غلظت انتخاب شده است. نمودار ۱ منحنی جذب DPPH بر حسب زمان برای طول موج ۵۱۷ نانومتر، به عنوان معیاری برای فعالیت آنتی‌اکسیدانی ریبوفلاوین در غیاب نور و در حضور نور خورشید برای غلظت‌های مختلف را در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نشان می دهد. نمودار مذکور نشان می‌دهد که در محدوده غلظت‌های به کار رفته در گستره زمانی ابتدایی فرایند، بیشترین کاهش جذب DPPH رخ می‌دهد. زمان تعادل برای فعالیت آنتی‌اکسیدانی در غیاب نور کوتاه بوده و در مدت زمان ۵ دقیقه از شروع فرایند به تعادل رسیده است. همچنین مشاهدات نشان می‌دهد که بهترین عملکرد در غیاب نور مربوط به غلظت ۰/۷ میلی‌مولار است. با افزایش غلظت، عملکرد آنتی‌اکسیدانی ریبوفلاوین افزایش یافته بنابراین با افزایش غلظت توان آنتی‌اکسیدان برای مهار رادیکال آزاد DPPH در این شرایط بیشتر می‌شود. در حضور نور برای همه غلظت‌ها، میزان رادیکال آزاد به نزدیک صفر رسیده است.

اثر غلظت در حضور نور بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی ریبوفلاوین برای غلظت‌های مختلف در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در نمودار ۱ب نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود در محدوده غلظت‌های به کار رفته از ریبوفلاوین، میزان جذب DPPH به سمت صفر میل می‌کند که این حاکی از فعالیت بالای آنتی‌اکسیدانی ریبوفلاوین در حضور نور خورشید است. مولکول برانگیخته ریبوفلاوین می‌تواند الکترون‌ها را به عوامل اکسید کننده مجاور منتقل نماید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان دهد و در غیاب مولکول‌های پذیرنده الکترون، گونه‌های فعال اکسیژنی تولید می‌شوند. Toyosaki تایوساکی و Mineshita (۱۹۸۹) در مطالعه‌ای مشابه پژوهش حاضر اثر آنتی‌اکسیدانی ریبوفلاوین را در تاریکی و در حضور نور مطالعه کرده‌اند. آنها فعالیت بیشتر آنتی‌اکسیدان ریبوفلاوین

www.SID.ir

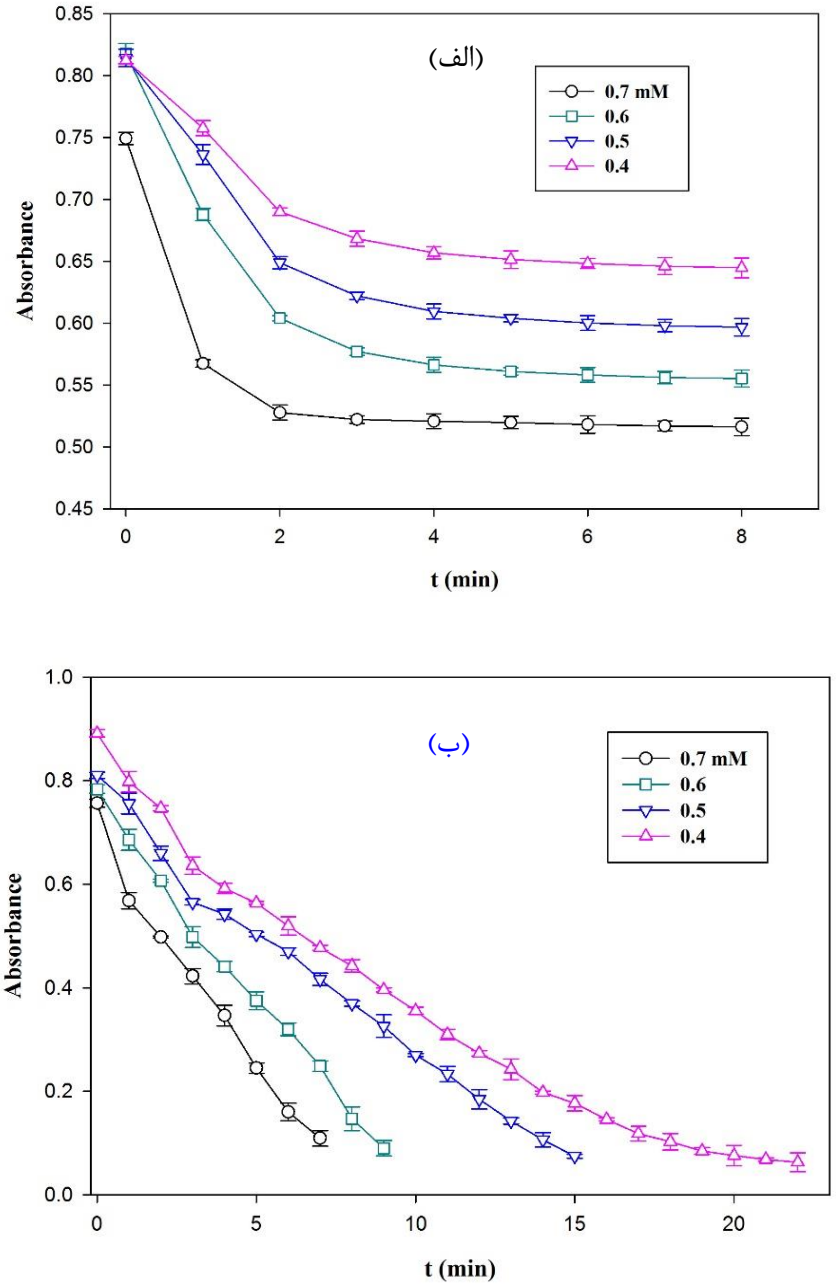
Archive of SID



در حضور نور را به خاصیت حساس به نور بودن ریبوفلاوین مرتبط ساختند. همچنین Toyosaki و Mineshita (۱۹۹۲) در کاری دیگر اثر آنتی‌اکسیدانی ریبوفلاوین را بر پراکسایش لیپید در یک سیستم آنزیمی مطالعه کرده‌اند. آنها بیان نمودند که زمانی که ریبوفلاوین اکسید می‌شود، هیدروپراکسید به عنوان یک پذیرنده الکترون عمل نموده و تجزیه می‌شود. میزان فعالیت آنتی‌اکسیدان ریبوفلاوین با مقدار آن متناسب است.

**- اثر دما**

به منظور بررسی اثر دما بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی ریبوفلاوین، گستره دمایی ۳۷-۲۵ درجه سانتی‌گراد مورد مطالعه قرار گرفت (نمودار ۲). گستره دمایی کار شده نزدیک به دمای محیط و بدن انسان می‌باشد. اطلاعات بدست آمده نشان می‌دهد که با افزایش دما میزان مهار رادیکال آزاد افزایش یافته و همچنین زمان رسیدن به جذب صفر برای رادیکال آزاد DPPH کوتاه‌تر شده است.




**نمودار ۱- نمودار جذب DPPH بر حسب زمان برای غلظت‌های مختلف ریبوفلاوین در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد الف) در غیاب نور خورشید ب) در حضور نور خورشید**



www.SID.ir

Archive of SID



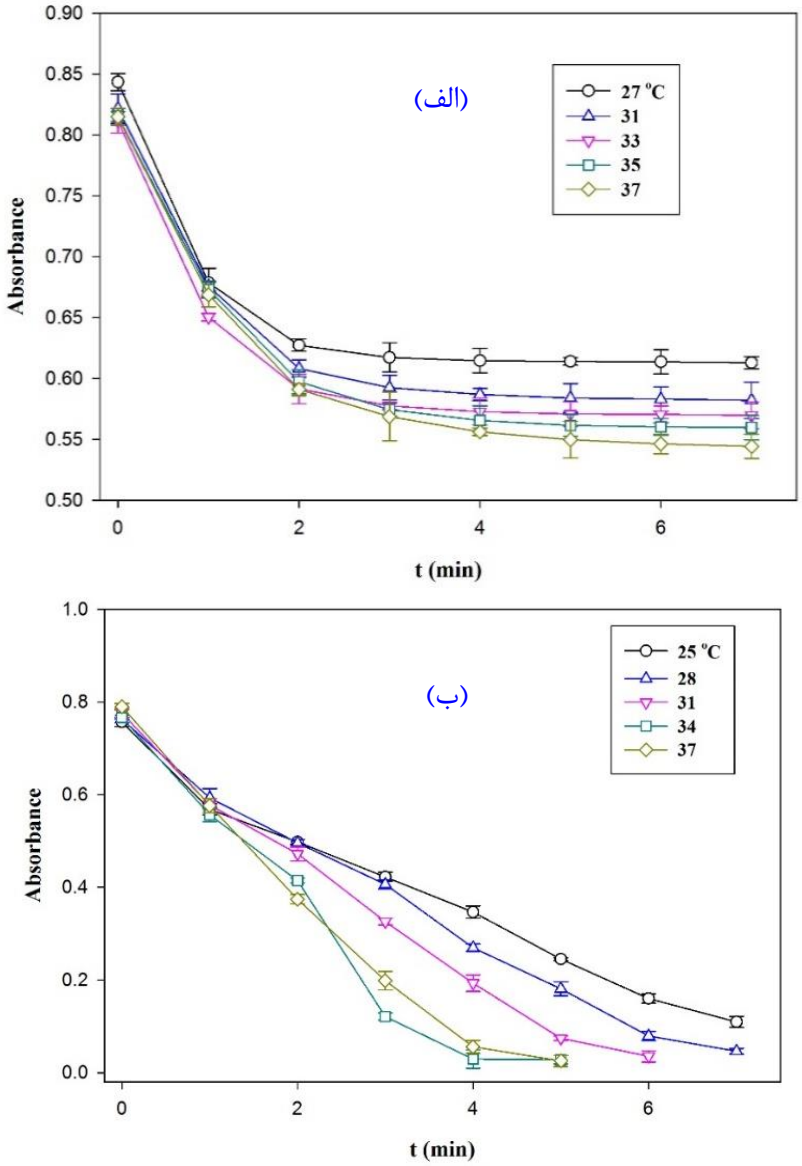
می‌توان نتیجه گرفت که در دماهای بالاتر فرایند مهار رادیکال‌های آزاد توسط آنتی‌اکسیدان ریبوفلاوین با سرعت بیشتری انجام می‌شود. غلظت مورد مطالعه در بررسی اثر دما، غلظتی است که در آن بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی ریبوفلاوین در غیاب نور و در حضور نور مشاهده شد.

## بحث

مطالعه سینتیکی عوامل غلظت آنتی‌اکسیدان ریبوفلاوین و تاثیر دما بر واکنش مهار رادیکال‌های آزاد DPPH در دو شرایط غیاب و حضور نور خورشید در پژوهش حاضر مورد بررسی قرار گرفته است.

**– مطالعه سینتیک اثر غلظت**

همان‌طور که از منحنی‌های نمودار ۱ مشاهده می‌شود، با توجه به شیب منحنی جذب بر حسب زمان می‌توان دریافت که میزان شیب تغییرات جذب برای محلول ریبوفلاوین ۰/۷ میلی‌مولار نسبت به سایر غلظت‌ها بیشتر است. با کاهش غلظت ریبوفلاوین این شیب برای منحنی‌های دیگر کمتر می‌شود. این نتیجه نشان می‌دهد که سرعت حذف رادیکال آزاد در غلظت‌های بالاتر بیشتر بوده و همچنین مدت زمان لازم برای میل نمودن غلظت رادیکال آزاد DPPH به سمت صفر با افزایش غلظت ریبوفلاوین کاهش یافته است.




**نمودار ۲– نمودار جذب DPPH بر حسب زمان برای دماهای مختلف الف) در غلظت ۰/۷ میلی‌مولار و در غیاب نور و ب) در غلظت ۰/٤ میلی‌مولار و در حضور نور**



www.SID.ir

Archive of SID





داده های تجربی نشان می‌دهد که تغییرات غلظت با زمان از نظر سینتیکی از معادله شبه مرتبه یک[1] پیروی می‌کنند (Heravi *et al.*, 2012):

$$\ln(A_\infty - A_t)/(A_\infty - A_o) = -kt \qquad (۱)$$

در این معادله $A_t$ جذب در لحظه‌ی $t$، $A_\infty$ جذب در لحظه‌ی تعادل، $A_o$ جذب در لحظه شروع واکنش و $k$ ثابت سرعت واکنش است. شیب نمودار $\ln(A_\infty - A_t)/(A_\infty - A_o)$ بر حسب زمان مقدار ثابت سرعت را می دهد (نمودار ۲). داده‌های سینتیکی به دست آمده در جدول ۳ گزارش شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود ضریب تصحیح ($R^2$) به دست آمده با سینتیک مرتبه یک، سازگاری خوبی دارد. داده‌های تجربی در حضور نور خورشید در زمان‌های ابتدایی در نظر گرفته شده‌اند. داده‌های سینتیکی این جدول نشان می‌دهد، با کاهش غلظت ثابت سرعت سینتیکی کاهش می‌یابد. به عبارت دیگر در غلظت‌های بیشتر تعداد برخوردها بیشتر شده و سرعت مهار رادیکال آزاد بیشتر می‌شود.

**- مطالعه سینتیک اثر دما**

داده‌های تجربی اثر دما در نمودار ۲ با معادله سینتیکی شبه مرتبه یک سازگاری خوبی دارد. ثابت‌های سرعت محاسبه شده برای هر کدام از دماهای به کار رفته در جدول ۴ و ۵ گزارش شده است. اطلاعات بدست آمده نشان می‌دهد که در گستره دمایی مورد مطالعه با افزایش دما ثابت سرعت نیز افزایش یافته است.

با استفاده از معادله آرنیوس، معادله ۲،

$$k = Aexp(-\frac{E_a}{RT}) \qquad (۲)$$

که در آن، $E_a$ انرژی فعال‌سازی($J\ mol^{-1}$)، $A$ فاکتور پیش‌نمایی($min^{-1}$)، $R$ ثابت گازها ($J\ mol^{-1}\ K^{-1}$ ۸/۳۱۴) و $T$ دما بر حسب کلوین است، انرژی فعال سازی واکنش از شیب منحنی $ln\ k$ بر $1/T$ بدست می‌آید. انرژی فعال‌سازی محاسبه شده با استفاده از این نمودار در غیاب نور و در حضور نور خورشید به‌ترتیب ۳۶/۰۱ و ۴۷/۴ کیلو ژول بر مول بدست آمده است. این نتایج نشان می‌دهد که سازوکار فعالیت آنتی‌اکسیدانی ریبوفلاوین در غیاب نور و در حضور نور با هم متفاوت است.



**جدول ۳- ثابت سرعت در دمای ۲۵ °C برای غلظت‌های مختلف ریبوفلاوین**

| | در حضور نور خورشید | | | | در تاریکی | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $C_{B2}$ (mM) | ۰/۷۰ | ۰/۶۰ | ۰/۵۰ | ۰/۴۰ | ۰/۷۰ | ۰/۶۰ | ۰/۵۰ | ۰/۴۰ |
| $k$ ($min^{-1}$) | ۰/۲۰۶ | ۰/۱۵۷ | ۰/۱۳۶ | ۰/۱۱۷ | ۰/۷۷۲ | ۰/۷۶۱ | ۰/۷۴۲ | ۰/۶۶۷ |
| $R^2$ | ۰/۹۹ | ۰/۹۹ | ۰/۹۸ | ۰/۹۹ | ۰/۹۹ | ۰/۹۹ | ۰/۹۹ | ۰/۹۹ |

**جدول ٤- ثابت‌های سرعت برای غلظت ۰/۷ میلی‌مولار ریبوفلاوین در دماهای مختلف در تاریکی**

| T (°C) | ۲۷ | ۳۱ | ۳۳ | ۳۵ | ۳۷ |
|---|---|---|---|---|---|
| $k$ ($min^{-1}$) | ۰/۷۹۲ | ۰/۹۲۳ | ۰/۹۸۹ | ۱/۰۱۱ | ۱/۲۶۹ |
| $R^2$ | ۰/۹۹۷۵ | ۰/۹۹۲۲ | ۰/۹۸۳۳ | ۰/۹۹۸۰ | ۰/۹۹۴۵ |

**جدول ۵- ثابت‌های سرعت برای غلظت ۰/٤ میلی‌مولار ریبوفلاوین در دماهای مختلف در حضور نور**

| T (°C) | ۲۵ | ۲۸ | ۳۱ | ۳٤ | ۳۷ |
|---|---|---|---|---|---|
| $k$ ($min^{-1}$) | ۰/۱۱۷ | ۰/۱۵۱ | ۰/۱۸۸ | ۰/۲۱۵ | ۰/۲۴۸ |
| $R^2$ | ۰/۹۹۱۱ | ۰/۹۹۰۶ | ۰/۹۸۷۱ | ۰/۹۸۳۲ | ۰/۹۸۵۷ |

[1] Pseudo-First-Order Kinetic Model



www.SID.ir

Archive of SID



## نتیجه‌گیری

در بررسی واکنش مهار رادیکال آزاد DPPH در حضور آنتی‌اکسیدان ریبوفلاوین (ویتامین $B_2$)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی ریبوفلاوین در غیاب نور محدود است به طوری که در غلظت‌های به کار رفته بعد از گذشت حدود ۸ دقیقه، کاهش قابل ملاحظه‌ای در طیف جذبی رادیکال آزاد DPPH مشاهده نشد. این موضوع حاکی از ظرفیت کم آنتی‌اکسیدان در شرایط به کار رفته دارد. با این وجود در گستره زمانی ابتدایی فرایند مهار رادیکال آزاد به تعادل رسیده و در گستره غلظت‌های بکار رفته در زمان‌های آغازی فرایند، بیشترین کاهش جذب DPPH رخ می‌دهد.

اثر غلظت ریبوفلاوین بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی در فرایند مهار رادیکال آزاد DPPH در حضور نور، مشابه این اثر در غیاب نور است. در حضور نور نیز با افزایش غلظت ریبوفلاوین، عملکرد آن بهتر شده است اما با این تفاوت نسبت به غیاب نور که در تمام غلظت‌های به‌کار رفته، مقدار رادیکال آزاد DPPH به صفر رسیده است.

نتایج بدست آمده از فعالیت آنتی‌اکسیدان ریبوفلاوین در دماهای مختلف نیز نشان می‌دهد که در گستره دمایی به کار رفته، با افزایش دما فعالیت آنتی‌اکسیدان در مهار رادیکال آزاد افزایش یافته است. مقدار مثبت انرژی فعال‌سازی حاصل از بررسی‌ها نشان می‌دهد که افزایش دما در گستره‌ی دمایی مورد مطالعه باعث افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌گردد.

## منابع


Alger, M. (1996). Polymer science dictionary. Springer Science & Business Media.

Ameta, R. K. & Singh, M. (2014). A thermodynamic in vitro antioxidant study of vitamins B (niacin and niacin amide) and C (ascorbic acid) with DPPH through UV spectrophotometric and physicochemical methods. Journal of Molecular Liquids, 195, 40-46.

Anbaraki, A., Khoshaman, K., Ghasemi, Y. & Yousefi, R. (2016). Preventive role of lens antioxidant defense mechanism against riboflavin-mediated sunlight damaging of lens crystallins. International journal of biological macromolecules, 91, 895-904.

Ardalan, P., Ardalan, T. & Momen Heravi, M. (2014). A DFT Study on Antioxidant Activity of Trolox and Substituted Trolox and Their Radicals. Journal of Applied Chemistry, 8(29), 45-50.

Avery, H. E. (1974). Basic reaction kinetics and mechanisms. Macmillan.

Braslavsky, S. E. (2007). Glossary of terms used in photochemistry, (IUPAC Recommendations 2006). Pure and Applied Chemistry, 79(3), 293-465.

Chaudhuri, S., Batabyal, S., Polley, N. & Pal, S. K. (2014). Vitamin B2 in nanoscopic environments under visible light: photosensitized antioxidant or phototoxic drug?. The Journal of Physical Chemistry A, 118(22), 3934-3943.

Chaudhuri, S., Sardar, S., Bagchi, D., Singha, S. S., Lemmens, P. & Pal, S. K. (2015). Sensitization of an endogenous photosensitizer: electronic spectroscopy of riboflavin in the proximity of semiconductor, insulator, and metal nanoparticles. The Journal of Physical Chemistry A, 119(18), 4162-4169.

Ciliberto, H., Ciliberto, M., Briend, A., Ashorn, P., Bier, D. & Manary, M. (2005). Antioxidant supplementation for the prevention of kwashiorkor in Malawian children: randomised, double blind, placebo controlled trial. Bmj, 330(7500), 1109.

Clerici, M. T. P. S. & Carvalho-Silva, L. B. (2011). Nutritional bioactive compounds and technological aspects of minor fruits grown in Brazil. Food Research International, 44(7), 1658-1670.

Dizdaroglu, M. & Jaruga, P. (2012). Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. Free radical research, 46(4), 382-419.

Galston, A. W. & Baker, R. S. (1949). Inactivation of enzymes by visible light in the presence of riboflavin. Science (Washington), 109, 485-486.

Gutteridge, J. & Halliwell, B. (1994). Antioxidants in nutrition, health, and disease. Oxford University Press.

Haggi, E., Blasich, N., Gutiérrez, L., Vázquez, G., Criado, S., Miskoski, S., Ferrari. G., Paulina Montana, M. & García, N. A. (2012). On the generation and quenching of reactive-oxygen-species by aqueous vitamin B2 and serotonin under visible-light irradiation. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 113, 22-28.

Heravi, M. M., Haghi, B., Morsali, A., Ardalan, P. & Ardalan, T. (2012). Kinetic




www.SID.ir

Archive of SID



study of DPPH scavenging in the presence of mixture of Zinc and Vitamin C as an antioxidant. Journal of Chemical Health Risks, 2(2).

Knak, A., Regensburger, J., Maisch, T. & Bäumler, W. (2014). Exposure of vitamins to UVB and UVA radiation generates singlet oxygen. Photochemical & Photobiological Sciences, 13(5), 820-829.

Kumar, S., Lemos, M., Sharma, M. & Shriram, V. (2011). Free radicals and antioxidants. Advances in Applied Science Research, 2, 129-135.

Li, J., Yuan, H. & Zhu, Z. (2016). Improved photoelectrochemical performance of Z-scheme $gC_3N_4/Bi_2O_3/BiPO_4$ heterostructure and degradation property. Applied Surface Science, 385, 34-41

Marković, Z., Milenković, D., Đorović, J., Marković, J. M. D., Stepanić, V., Lučić, B. & Amić, D. (2012). PM6 and DFT study of free radical scavenging activity of morin. Food Chemistry, 134(4), 1754-1760.

McNeill, G., Jia, X., Whalley, L. J., Fox, H. C., Corley, J., Gow, A. J. & Deary, I. J. (2011). Antioxidant and B vitamin intake in relation to cognitive function in later life in the Lothian Birth Cohort 1936. European Journal of Clinical Nutrition, 65(5), 619-626.

Nakchat, O., Nalinratana, N., Meksuriyen, D. & Pongsamart, S. (2014). Tamarind seed coat extract restores reactive oxygen species through attenuation of glutathione level and antioxidant enzyme expression in human skin fibroblasts in response to oxidative stress. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 4(5), 379-385.

Sen, S. & Chakraborty, R. (2011). The role of antioxidants in human health. In Oxidative stress: diagnostics, prevention, and therapy (pp. 1-37). American Chemical Society.

Sen, S., Chakraborty, R., Sridhar, C., Reddy, Y. S. R. & De, B. (2010). Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: current status and future prospect. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, 3(1), 91-100.

Sharma Om, P., & Bhat, T. K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. Food Chemistry, 113.4, 1202-1205.

Toyosaki, T. (1992). Antioxidant effect of riboflavin in enzymic lipid peroxidation. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40(10), 1727-1730.

Toyosaki, T. & Mineshita, T. (1989). Antioxidant effect of riboflavin in aqueous solution. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 37(2), 286-289.

Williams, R. R. & Cheldelin, V. H. (1942). Destruction of riboflavin by light. Science (Washington), 96, 22-23.

Wu, D., Wang, H., Li, C., Xia, J., Song, X. & Huang, W. (2014). Photocatalytic self-cleaning properties of cotton fabrics functionalized with p-BiOI/n-$TiO_2$ heterojunction. Surface and Coatings Technology, 258, 672-676.

Xie, G., Zhang, K., Guo, B., Liu, Q., Fang, L. & Gong, J. R. (2013). Graphene-Based Materials for Hydrogen Generation from Light-Driven Water Splitting. Advanced Materials, 25(28), 3820-3839.

Yagi, T. (2012). B vitamins and folate: chemistry, analysis, function and effects (No. 4). Royal Society of Chemistry.



www.SID.ir