



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministry of Higher Education and Scientific Research

جامعة قاصدي مرباح ورقلة
University of Kusdi Merbah Ouargla

كلية الرياضيات وعلوم المادة
Faculty of Mathematics and Sciences of matter



قسم الكيمياء

Department of chemistry

مذكرة مقدمة لنيل شهادة ماستر أكاديمي

في الكيمياء

التخصص: كيمياء تحليلية

من إعداد الطالبتين: بونقاب سارة - بوزيان جمعة

بمعنوان:

دراسة نجاعة قياس الفاعلية لمضادات الأكسدة بالطرق الكيميائية
والكهرو كيميائية لمستخلصات كيميائية

نوقشت علنا يوم: 19 ماي 2022

امام لجنة المناقشة المكونة من:

رئيسا	استاذ المحاضر - أ جامعة قاصدي مرباح - ورقلة	زنخري لويزة
مناقشا	الأستاذ المحاضر - أ جامعة قاصدي مرباح - ورقلة	زروقي حياة
مشرفا	استاذ المحاضر - أ جامعة قاصدي مرباح - ورقلة	بالفار محمد الأخضر
مساعد مشرف	الأستاذ المحاضر - أ جامعة قاصدي مرباح - ورقلة	هادف الدراجي

الموسم الجامعي: 2021/2022م

إهداء

إلى:

كل من كانت ولا تزال دعوتها تملأ الكون نورا
ويضيء لي طريق الحياة صاحبة القلب الكبير
الذي يفيض حبا وحنانا مدرسة الحب والإخلاص

.....أمي الحنونة....

أطال الله عمرها.

إلى من دفع بي إلى منبرج العلم والمعرفة
وكافح من أجل تربيّتي وتعليمي

.....أبي العزيز.....

أطال الله عمره.

إلى إخوتي فاطمة الزهراء ومحمد عبد القادر
وليّام وسعيد ودعاء

إلى كافة أفراد عائلتي وأصدقائي الأعزاء وأحبتي

تتالز

إهداء

إلى صاحب سيرة عطرة وفكر مستنير ، يستطيع الله أن يطيل عمره ،
لأنه صاحب السمعة الأولى في تحقيق التعليم العالي

.....والدي العزيز.....

. بارك الله في روحك ، لمن وضعني على طريق الحياة ، وهداني ،
واعطني بي حتى كبر

.....أمي العزيز.....

إخواني وأخواتي الذين لهم أثر كبير في كثير من المعوقات والصعوبات
وجميع أساتذتي الأعماء الذين لا يترددون في مد يد العون لي

الى صديقاتي حليلة، راضية، سكينه، نور، جمعة وكريمة.

أهدي بحثي لكم...

شكر وتقدير

قال تعالى " وما توفيقى الا بالله عليه توكلت واليه أنيب "

صدق الله العظيم

بداية أشكر الله تعالى وأحمده على بلوغي لهذا المستوى والحمد لله والشكر له بما من علينا به من نعمة والصلاة والسلام على خير خلقه الاميين نبينا محمد واله الأطهار وأصحابه عليه أفضل الصلوات وأزكى التسليم

أتقدم بجزيل الشكر والتقدير والامتنان الى أستاذي الدكتور (محمد الأخضر بالفار) على ما بذله من جهد ووقت لغرض الاشراف على بحثي ومتابعته لي بأرائه القيمة وأفكاره الجميلة فجزاه الله خير الجزاء

كما أتقدم بخالص الشكر والتقدير الى جميع الاساتذة المحترمين مني لكلية علوم المادة والرياضيات وخاصة اساتذة الكيمياء وشكر خالص أعضاء اللجنة

الأستاذ هادف الدراجي -الأستاذة زروقي حياة -الأستاذة زنجري لويزة.

لقبولهم مناقشة واثراء هذه المذكرة

واخيرا اشكر الى كل من ساهم في أنجاز هذا العمل من قريب أو بعيد.

أ.....	فهرس المحتوات
ب.....	فهرس الأشكال
ج.....	فهرس الجداول
د.....	فهرس المنحنيات
ه.....	قائمة الرموز
و.....	الملخص

مقدمة عامة

1.....	مقدمة عامة
--------	------------

الفصل الأول

4.....	I-عموميات حول مضادات الأكسدة
4.....	I - 1 - تعريف الجذور الحرة (الشق الحر):
4.....	I - 2- الجذور النشطة أو غير المستقرة :
5.....	I-3- الجذور المستقرة أو الصامدة :
5.....	I - 4 - متابعة حركية الجذور الحرة:
5.....	I - 5- تفاعلات الأكسدة الذاتية:
6.....	I-5-1 تفاعلات الأكسدة في النظام البيولوجي:
7.....	I - 5 - 2 تعريف مضادات الأكسدة:
8.....	I-5-3 أنواع المضادات الأكسدة :
9.....	I-5-4 مصدر مضادات الأكسدة:
10.....	I-5-5- الإنزيمات المضادة للأكسدة :
11.....	I-5-6- وظيفة مضادات الأكسدة:
11.....	I-6- سلبيات وإيجابيات مضادات الأكسدة :

الفصل الثاني

14.....	II- طرق تقدير مضادات الأكسدة :
14.....	II-1- اختبار DPPH
14.....	الشكل (II-1): جزيئة DPPH
16.....	II-1-1- المواد والأجهزة المستعملة :

17	II -1-2 - طريقة العمل :
18	II -1-3 - المواد الكيميائية المستعملة
20	II -1-4- مزايا طريقة DPPH :
21	II-2- اختبار FRAP : (إختبار مضاد للأكسدة)
22	II-2-1- طريقة العمل
23	II-3- الإختبار الفوسفات موليبيدات (PM):
23	II-3-1 طريقة العمل:
24	II-3-2 - تحضير العينات:
25	II-4- اختبار ABTS (TEAC)
29	II-4-1- مزايا اختبار ABTS :
29	II-4-2- عيوب اختبار ABTS :
30	II-5- اختبار TRAP :
33	II-6- اختبار CUPRAC
37	II -7- اختبار ORAC :

الفصل الثالث

43	III - الكيمياء الكهربائية :
44	III-1- تطبيق الفولتا متر لتحديد قدرة مضادات الأكسدة :
46	III-2- تحضير العينات :
46	III-2-1 الأجهزة والأدوات والمواد المستعملة :
49	III-3- الطرق الكهرو كيميائية :
49	III-3-1- تقنية قياس الفولتمتر الدوري CV
52	III-3-2- تقنية الموجة المربعة الفولتمترية (SWV) :
53	III-3-3- تقنية النبض التفاضلي الفولتمتر (DPV) :
55	III-3-4- قياس الفولتمتر الخطي (LSV) :
56	III-4- الدراسة الكهروكيميائية للكهروليت المساعد :
57	III-4- المقارنة بين الطرق الكيميائية و الطرق الكهرو كيميائية :
58	الخلاصة
	الملاحق
	مراجع

فهرس الأشكال

الصفحة	العنوان	الشكل
الفصل الأول		
7	رسم تخطيطي يوضح مصدر مختلف الجذور الحرة المؤكسدة وأنماط التفاعلات الأكسجين المطبقة بيولوجيا	الشكل رقم 1.I
8	مضادات الأكسدة المستعملة في الصناعة الغذائية	الشكل رقم 2.I
الفصل الثاني		
14	DPPH جزيئة	الشكل رقم 1.II
15	معادلة تثبيط جذر DPPH في وجود مضادات الجذور الحرة	الشكل رقم 2.II
21	جزيئة Fe^{+3} TPTZ	الشكل رقم 3.II
25	اختلاف اللون في اختبار ABTS (a)؛ مخطط التفاعل المتضمن في (ABTS) 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) الراديكالي لفحص نشاط الكسح الكاتيون (b)	الشكل رقم 4.II
30	التركيب الكيميائي لثنائي أسيتات ثنائي هيدروفلوريسئين ولومينول	الشكل رقم 5.II
34	مخطط التفاعل المتضمن في مقايسة الطاقة المضادة للأكسدة الخافضة النحاسية (CUPRAC)	الشكل رقم 6.II
39	مخططات التفاعل المشاركة في مقايسة قدرة امتصاص الأكسجين الجذري (ORAC) للكشف عن جذور الهيدروكسيل والبيروكسيل	الشكل رقم 7.II
الفصل الثالث		

45	الصيغ الجزيئية لمضادات الأكسدة شائعة الاستخدام	الشكل رقم 1.III
46	الخلية الكهروكيميائية	الشكل رقم 2.III
47	المساري على الترتيب ① المسرى المرجعي ② المسرى المساعد ③ مسرى العمل	الشكل رقم 3.III
49	الأجهزة المستعملة لجهاز (PGZ 301، OLTALAB 40).	الشكل رقم 4.III
50	التركيب التجريبي للأجهزة المستعملة في الفولطأمبيرومتر الحلقي	الشكل رقم 5.III
51	إشارة الإثارة المحتملة وفولتاموجرام لقياس الفولتمتر الدوري بالتفصيل	الشكل رقم 6.III
52	إشارة الإثارة المحتملة وفولتاموجرام لفصل الموجة المربعة الفولتمتر	الشكل رقم 7.III
54	إشارة الإثارة المحتملة والفولتاموجرام للنض التفاضلي تجريد الفولتمتر	الشكل رقم 8.III
55	قياس الفولتمتر الخطي (LSV) النموذج الموجي	الشكل رقم 9.III
56	منحنيات تمثل الأشكال الموجية المحتملة لاكتساح خطي ودوري الفولتمترية والفولتاموجرام	الشكل رقم 10.III

فهرس الجداول

الصفحة	العنوان	الجدول
الفصل الثاني		
16	الأجهزة المستعملة في تقدير الفاعلية المضادة للأكسدة بطريقة الكيميائية	الجدول رقم 1.II
16	المواد الكيميائية المستعملة في اختبار DPPH	الجدول رقم 2.II
الفصل الثالث		
57	مقارنة بين الطرق الكيميائية التقليدية والطرق الكهروكيميائية الكلاسيكية	الجدول رقم 1.III

فهرس المنحنيات

الصفحة	عنوان المنحنى	المنحنى
الفصل الثاني		
20	اختبار DPPH للزيت الطيار	منحنى رقم 1.11
20	المنحنيات القياسية لحمض الأسكربيك والطوكوفرول	منحنى رقم 2.11
22	منحنى الحركة لتغير الامتصاصية لاختبار FRAP	منحنى رقم 3.11

قائمة الرموز

طول الموجة الأعظمي	λ_{MAX}
الأشعة فوق البنفسجية- المرئية	UV-V
الإمتصاصية الضوئية	A
حمض الأسكوربيك (الفيتامين C)	V _C
طوكوفيرول (الفيتامين E)	V _E
الجذر الحر 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl	DPPH
تركيز المستخلص الفينولي للقضاء على 50% من الجذور الحرة	IC ₅₀
النسبة المئوية لتنشيط	I%
Ferric Reducing Antioxidant Power	FRAP
Acid Ascorbique Equivalent Antioxydant Capacity القدرة المكافئة لحمض الأسكوربيك المضادة للأكسدة	AEAC
acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)	ABTS
Phosphomolybdate	PM
Cyclic voltammetric الفولتميتر الدوري	CV
Square wave voltammetric الموجة المربعة الفولتميترية	SWV
Differential pulse voltammetric النبض التفاضلي الفولتميتر	DPV
Linear Sweep Voltammetry قياس الفولتميتر الخطي	LSV

Hydroxy anisole butylé	BHA
Hydroxy toluène butyte	BHT
2,4,6-tripyridyl-s-triazine	TPTZ
CUPric Reducing Antioxidant Capacity	CUPRAC
Oxygen Radical Absorbance Capacity	ORAC
Adsorbable Organic Halogen	AOX

المُلخَص

الملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تقدير فعالية المضادات الأوكسدة للمستخلصات الكيميائية بالطرق الكيميائية والطرق الكهروكيميائية كما شملت هذه الدراسة مقارنة بين هذه الطرق (التقليدية والكلاسيكية) تظهر العديد من الدراسات أن مضادات الأوكسدة تلعب دوراً أساسياً في الحفاظ على صحة الإنسان والوقاية من الأمراض وعلاجها ، نظراً لقدرتها على الحفاظ على الخلايا من التلف الذي قد تسببه الجذور الحرة لذلك فإن قياس نشاط قدرة مضادات الأوكسدة للأطعمة والعينات البيولوجية ضروري ليس فقط لضمان جودة الأطعمة الوظيفية ، ولكن الأهم من ذلك في دراسة كفاءة مضادات الأوكسدة الغذائية في الوقاية من الأمراض. لا تزال هناك حاجة إلى الطرق التقليدية لقياس نشاط مضادات الأوكسدة، كما أن البروتوكولات المنهجية المحددة معقدة وتتطلب وقتاً طويلاً للاختبار ومن أهم الاختبارات التي تطرقنا إليها هي DPPH ; FRAP ; ABTS; CURAC; ORAC PM

وبالتالي، هناك إمكانات هائلة في هذا المجال البحثي، لغرض تطوير طرق تحليلية جديدة لتحديد قدرة المركبات المضادة للأوكسدة، وخاصة في المنتجات الغذائية. على سبيل المثال، قد يكون تطوير المستشعرات الحيوية الكهروكيميائية واستخدامها في أبحاث مضادات الأوكسدة ذا أهمية كبيرة ويمكن أن يساعد في دراسة حركية العملية. ومن بين الطرق الكهروكيميائية المذكورة هي LSV، DPV، SWV، CV

حيث تمت المقارنة بينهما من حيث الجودة والدقة والتكلف وطريقة العمل والقياس السريع واستخدام كمية صغيرة من العينات.

الكلمات الدالة: مضادات الأوكسدة. الجذور الحرة. الطرق الكيميائية. الطرق الكهروكيميائية. الكيمياء الخضراء.

Summary:

The point of this study is to measure the antioxidant effectiveness of chemical extracts by chemical and electrochemical methods. This study also involve a relation between these methods (traditional and modern) a lot of studies play a fundamental role in maintaining human health, preventing and treating diseases, due to their ability to preserve cells from damage that may be caused by free There is still a need for traditional methods to measure antioxidant activity and protocols specified are complex and require a long time taken the most important tests that we touched us are the DPPH ; FRAP ; ABTS; CURAC;ORAC; PM. Thus, there is a huge potential in this field of research, for the purpose of developing new analytical methods for determining the ability of antioxidant compounds, especially in food products. For example, the development of electrochemical biosensors and their use in antioxidant research may be of great importance and can help in the study of the kinetics of the process. Among the electrochemical methods mentioned are CV, SWV, DPV, LSV They were compared in terms of quality, accuracy, cost, method of work, quick measurement, use of a small amount of samples and environmental friendliness.

Keywords : antioxidants. Free roots. chemical methods. Electrochemical methods. Green chemistry.

مقدمة عامة

مقدمة عامة

تلعب الجذور الحرة دورا مهم في الكثير من العمليات الحيوية ونظرا لكونها مضرّة فإن للجسم طرق كثيرة يستخدمها لتقليل الأخطار التي يمكن ان تحدث، ولمضادات الأكسدة دورا رئيسيا في تلك الطرق الدفاعية وقد كان اول جذر حر عضوي يتم تعرف عليه هو (جذر ترايفينيل ميثيل) عن طريق " موزس غومبيرغ " في عام 1900م. [1]

ينتج الجسم باستمرار جذور حرة بسبب الاستخدام المنتظم للأكسجين هذه الجذور الحرة مسؤولة عن تلف الخلايا في الجسم وتساهم في أنواع مختلفة من المشاكل الصحية مثل أمراض القلب والسكري والسرطان. تعتبر النباتات مصدر وفير لمضادات الأكسدة التي تنتج بشكل طبيعي وبالتناوب كما يمكن أيضا تصنيع مضادات الأكسدة من خلال عملية كيميائية وكذلك من أنواع مختلفة من النفايات المرتبطة بالزراعة باستخدام عملية بيولوجية. [2]

استخدم مصطلح مضادات التأكسد للإشارة بشكل خاص الى مادة كيميائية تمنع نقصان الأكسجين، أجريت العديد من التجارب والدراسات في القرن التاسع عشر وبداية القرن العشرين لاستخدام مضادات الأكسدة في عمليات صناعية عديدة وهامة. [3]

تقلل الأكسدة من فاعلية العناصر الأساسية للغذاء عن طريق تغير خصائصه وتدمير العناصر الغذائية الأساسية وإنتاج مركبات سامة، تعمل مضادات الاكسدة على تأخير أكسدة الدهون في الأطعمة. [4]

إن مضادات الأكسدة الاصطناعية تسبب أمراض لدى الانسان عند تناولها بتركيز معين.

كانت تأثيرات سمية مضادات الأكسدة الغذائية الاصطناعية محل جدل في السنوات الأخيرة حيث يوجد هناك مجال استخدام مضادات الأكسدة الطبيعية الموجودة في العديد من مكونات الغذاء والمصادر النباتية كمادة حافظة. [5]

حيث وجدت عدة طرق لتقدير الفاعلية المضادة للأكسدة حيث كانت هذه الطرق نسبية التقدير غير دقيقة مهما اختلفت مصادرها.

كما ظهرت طرق حديثة عالية الدقة تعتمد على الأجهزة المتطورة.

الإشكالية التي تطرح في هذا البحث (الدراسة) مدى نجاعة كلا الطريقتين في التعبير الحقيقي والدقيق للفاعلية المضادة للأكسدة، ولذا تم تقسيم هذه الدراسة الى عدة فصول.

حيث يتم التطرق في الفصل الأول الى عموميات حول مضادات الأكسدة وفصل يشمل التقدير الكلاسيكي وأنواعه ومكانيزماتيه بصفة عامة. وفي الفصل الأخير طرق التقدير الحديثة إيجابياتها وسلبياتها وتختتم في الأخير هذه الدراسة بمقارنة لأهم النتائج المتحصلة عليها.

الفصل الأول

تمهيد: مضادات الأكسدة هي عبارة عن جزيئات تحافظ على الخلايا من التلف الذي قد تسببه الجذور الحرة فيها وهي ناتج طبيعي عن عملية الأيض حيث نتطرق في هذا الفصل الى عموميات حول مضادات الأكسدة.

I-عموميات حول مضادات الأكسدة

I - 1 -تعريف الجذور الحرة (الشق الحر):

هي أصناف كيميائية ذرية أو جزيئية تحتوي على إلكترون أو أكثر غير مزدوج، تتولد أثناء التفاعلات الكيميائية كمركبات وسطية وتنتهي بنهاية التفاعل منها:

*الأحادية (الأولية): تحتوي على إلكترون أحادي ومتعادل مثل $H\cdot$ ، $N\cdot$ ، $F\cdot$ ، $Cl\cdot$ ، CH_3 ، NH_2 ، C_6H_5 . [5] [6]

*الثنائيات (أو الثانوية): تحتوي على إلكترونين أو أكثر غير مزدوج ومتعادل مثل: O ، $C\cdot\cdot H_2$ ، $N\cdot\cdot H$.

ذات أعمار قليلة جدا تصل إلى بيكرو ثانية (10-12 ثانية) والميزة الغالبة على كل الجذور الحرة شدة الفاعلية الكيميائية العالية. [7] [8]

إن حجم الذرة والوضعيته الفراغية والخاصية الميزوميرية لهذه العناصر لها علاقة مباشرة في استقرار أو عدم استقرار الجذر، وتقسم على هذا الأساس إلى:

I - 2- الجذور النشطة أو غير المستقرة :

هي التي لها أعمار حياة قصيرة جدا أي غير مستقرة في الضرورة الاعتيادية لها أوزان جزيئية صغيرة مثل جذر الهيدروجين، الفلور، الكلور، H_2O^+ ، I_2^- ، $C\cdot H_3$ ، CH_5^+ ، $O\cdot H$ ، NO^- وما شابه ذلك، طاقة تنشيطها تقترب من الصفر أثناء التفاعل.

I-3- الجذور المستقرة أو الصامدة :

هي التي لها أعمار طويلة تقدر بالثواني أو بالساعات أو حتى بالأيام مثل جذر ثلاثي فينيل مثل (TP3M) وجذور ثنائي فينيل بكريل هايدرازيل (DPPH) وجذور ثنائي فينيل وأكسيد النيتريك (Ph_2NO) ومشتقاته.

ونستطيع القول أن معظم الجذور الأروماتية التي تشمل على تراكيب رنينية متعددة في تركيبها تكون مستقرة في أغلب الأحيان، فكلما زاد ثبات الجذر الحر قلت فعاليته، ومن الناحية الديناميكية الحرارية فإن قلة فعاليته تعود إلى أنه يحتاج إلى طاقة تنشيط عالية نسبياً أثناء التفاعل.

I-4- متابعة حركية الجذور الحرة:

إن الجذور الحرة إما أن تكون ذات أعمار طويلة أو قصيرة، القصيرة منها لا يمكن متابعة حركية تفاعلاتها إلا بالطرق الطيفية السريعة مثل مطيافية الكتلة (MS) وأطياف الرنين النووي المغناطيسي (RNM)، أما الجذور المستقرة نسبياً فيمكن متابعة حركية تفاعلاتها بالطرق التقليدية مثل قياس التغير بالتوصيلة الكهربائية بوحدة الزمن، أو التغير بالتركيز المولاري بوحدة الزمن، أو التغير بحجم الغاز عن طريق التسحيح بالحامض أو القاعدة ولكن أدق هذه الطرق هي قياس تغير كثافة الضوء الممتص بوحدة الزمن بواسطة أجهزة قياس أطياف الأشعة فوق البنفسجية-المرئية (UV-V) شرط أن يمتص الجذر الحر الضوء بمنطقة تختلف عن منطقة امتصاص المادة الناتجة فمثلاً يمتص الجذر ثلاثي فينيل المثل ($\text{Ph}_3\dot{\text{C}}$) الضوء عند 345nm وعند 510nm بينما يمتص ثلاثي فينيل ميثان (Ph_3CH) الضوء عند 262 nm فقط. [5]

I-5- تفاعلات الأكسدة الذاتية:

هناك الكثير من تفاعلات الأكسدة للمركبات العضوية تتم وفق آلية الجذور الحرة.

والأكسدة العضوية هي تحول المركبات في وجود أكسجين الهواء والعوامل المساعدة على الأكسدة، وجود كميات ضئيلة من بادئات الجذور الحرة الموجودة في الهواء ومدى حساسية المركبات للضوء. [7] [8] [9]

يعتبر فساد الأطعمة من نتائج الأكسدة الذاتية، فالسلاسل غير المشبعة في الأحماض الدهنية تتأكسد إلى أحماض كربوكسيلية ذات أوزان جزئية أقل، معظمها ذات رائحة كريهة جداً.

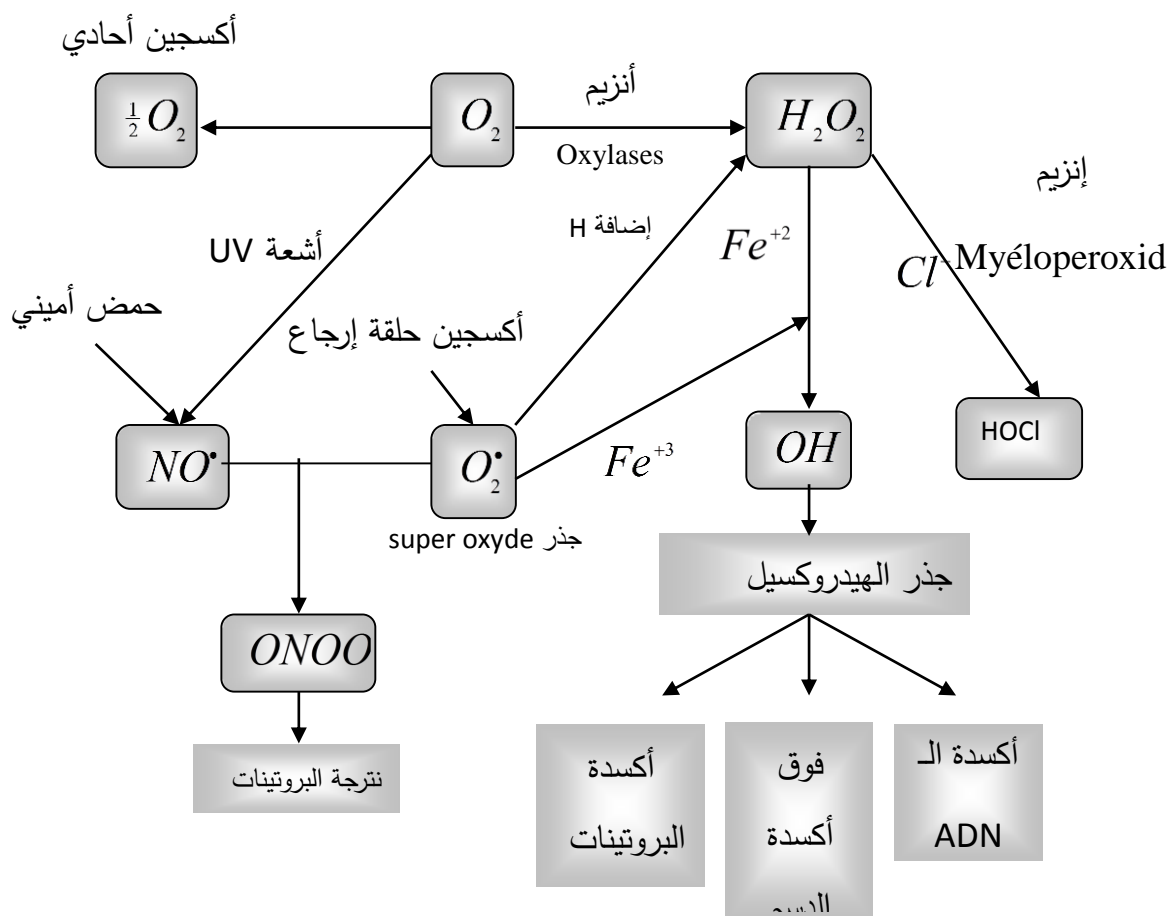
ويعتبر تلف معظم المواد العضوية عند تعرضها للهواء والضوء كجفاف الطلاءات، وتغير تركيبة اللدائن والمطاط وتحول المذيبات إلى بروكسيدات أحد نواتج الأكسدة. [10]

I-5-1 تفاعلات الأكسدة في النظام البيولوجي:

بلا شك تعتبر التفاعلات الجذرية المساهم الأول في نمو الإنسان والحفاظ عليه [6]، وهذا لما تقوم به هذه التفاعلات من أدوار مهمة في عملية البيولوجية [7] حيث أن الخلايا تحتوي على الجذور الحرة لاسيما في مرحلة التصنيع الحيوي للمركبات الفعالة Biosynthèse أو في عمليات الهدم العادية للمركبات الفعالة [11] bioactive الأكسجين هو العنصر الأساسي للخلايا التي يتم فيها عملية الإحراق وهي عبارة عن تفاعل بين مركب عضوي و أكسجين الهواء، وأهم ما ينتجه هذا التفاعل هي الطاقة التي تدخل في تصنيع العديد من المركبات منها المواد الخلوية، بالإضافة إلى القيام بنشاطات وظيفية معقدة مثل الحركة، النمو، الإفرازات والامتصاص. [12]

من بين الأنواع الجذرية القابلة للتصنيع في الخلايا نميز مجموعة من المكونات والتي تلعب دورا خاصا في علم الخلايا والتي تدعى بالجذور الأولية مع مكونات بيو كيميائية في الخلية. [13]

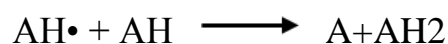
مثلا: سلاسل نقل الإلكترون بروكسيد peroxisomes ونظام السيتوشروم cytochrome هذه الجذور تكون مسؤولة عن فساد ADN للخلايا المسنة، والتي هي أساس منشئ بعض الأمراض مثل: السرطان، مرض الشلل الاهتزازي، مرض التصلب العضلي.



الشكل (1-I) : رسم تخطيطي يوضح مصدر مختلف الجذور الحرة المؤكسدة وأنماط التفاعلات الأكسجين المطبقة بيولوجيا [13]

I - 5 - 2 تعريف مضادات الأكسدة:

هي عبارة عن مواد مانحة لذرات الهيدروجين [13] [14]، أو أنها تتحد مع الجذور وتحوله إلى مركب مستقر كما هو موضح في المعادلة رقم (1) التالية:

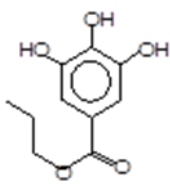


والدور الأساسي لمضادات الأكسدة هو كسر سلسلة التفاعلات الجذرية الناتجة من الأكسدة، وتقسّم مضادات الأكسدة من حيث مصادرها إلى الطبيعية والمصنعة والغذائية والذاتية.

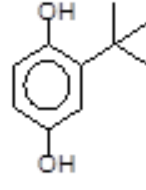
I-3-5 أنواع المضادات الأكسدة :

I-3-5-1- مضادات الأكسدة المصنعة :

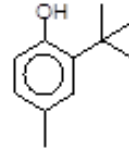
تعتبر عنصر أساسي يجب إضافته للأطعمة المعلبة للتقليل من إفسادها إلى أقصى حد وذلك لتأكسدها قبل غيرها، منها (BHA) butylhydroxyanisole، و (BHT) butylhydroxytoluene و (PG) gallat propylée و (TBHQ) tetra-butylhydroquinone هذه المركبات واسعة الاستعمال في الصناعة الغذائية، لأنها فعالة وقليلة التكلفة بالمقارنة مع المضادات للأكسدة الطبيعية [15] وغير السامة، و لكن لها أضرار جانبية على المدى البعيد لذلك تم التخلي عنها في دول الاتحاد الأوروبي مؤخرا .



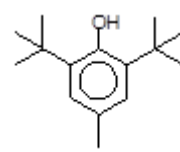
PG



TBHQ



BHA



BHT

الشكل (I-2): مضادات الأكسدة المستعملة في الصناعة الغذائية [15]

I-3-5-2- مضادات الأكسدة الطبيعية:

وفي الحالة الفسيولوجية العادية فإن تركيز الجذور الحرة مثل: $O_2^{\bullet\bullet}$ ، HO^{\bullet} ، HOO^{\bullet} ، تكون مراقب من طرف الخلايا [16] التي تستعمل العديد من الاستراتيجيات المضادة للأكسدة و تستهلك طاقة كبيرة من أجل مراقبة مستوى تفاعلات الأوكسجين، باستعمال وسائل دفاع طبيعية ذاتية داخلية مثل إنزيمات (Peroxydases, catalases, superoxyde dismutases) وعوامل مضادة للأكسدة والتي تستخرج من الغذاء (مضادات خارجية) كالفيتامين (C) (Acide, ascorbique) (الفيتامين Q ubiquinone) وحمض اليوليك (Acide urique) والجزريات والتي تستخلص من الغذاء، فتشكل فخ للجذور الحرة وتقبض على الالكترونات الحرة و تحولها إلى مركبات ثابتة [17]. ومما سبق يمكن أن نعرف مضادات الأكسدة بأنها مواد داخلية المصدر أو خارجية تستطيع أن تعدل أو تصلح الإتلاف الذي سببته الجذور الحرة.

I-3-3-5- مضادات الأكسدة الغذائية :

تعتبر النوع الأساسي للمضادات الأكسدة تتمثل في الأسكوروبات والتروكوفيرول والكاروتينات المعروفة جيداً حيث نجد هذه المركبات في الأطعمة النباتية بالإضافة إلى مكملات غذائية وهي ضرورية للصحة. [18].

I-3-4- مضادات الأكسدة الذاتية :

إضافة إلى مضادات الأكسدة الغذائية يعتمد الجسم على العديد من الآليات الدفاع الذاتية للمساعدة في حماية تلف الخلايا الناجمة عن الجذور الحرة. [19].

I-4-5- مصدر مضادات الأكسدة :

الغذاء هو المصدر الأساسي لمضادات الأكسدة، حيث نجدها في المصادر النباتية والحيوانية، إلا أنها متوفرة أكثر في النباتية كالخضار والفواكه والمشروبات كالقهوة والشاي. نذكر أهم مصادر مضادات الأكسدة إليكم فيما يأتي:

* فيتامين ج Vit C :

يعد فيتامين ج من أهم مضادات الأكسدة القابلة للذوبان في الماء ومغذيات الخلية الأساسية يتوفر في العديد من الخضراوات والفواكه أهمها الفراولة، والحمضيات، والفلفل الرومي الملون.

*. فيتامين هـ Vit E :

يعد فيتامين هـ من مضادات الأكسدة الرئيسية القابلة للذوبان في الدهون، حيث يلعب دوراً أساسياً في حماية أغشية الخلايا من الأضرار التأكسدية.

يتوفر في العديد من المصادر أهمها: المكسرات، والبذور المختلفة، والزيوت النباتية، والخضراوات الورقية.

[20]

• مصادر أخرى لمضادات الأكسدة

نذكر أهمها فيما يأتي:

الفلافونويدات: تعمل كحماية مجموعة متنوعة من الضغوط البيئية في النباتات أما في الإنسان تعمل كمعدلات الاستجابة البيولوجية وهي مجموعة من مضادات الأكسدة الموجودة في الأغذية النباتية.

البيتا كاروتين: توفر حماية مضادات الأكسدة للأنسجة الغنية بالدهون حيث نجده في الجزر، والسبانخ، والمانجا.

اللوتين: موجود في الخضروات الورقية، والذرة، والبابايا، والبرتقال.

السيالينيوم: موجود في الحبوب الكاملة، والبيض، والجبن، والبقوليات.

العديد من المواد والفيتامينات والمعادن لديها مهام أخرى متعددة في الجسم عدا عن كونها مضادات أكسدة، مثلاً تلك الموجودة في زيت الزيتون البكر لديها أيضاً خصائص مضادة للالتهابات.

I-5-5- الإنزيمات المضادة للأكسدة :

هناك العديد من الإنزيمات التي تعتبر أحد أنواع مضادات الأكسدة في الجسم، والتي تحارب الجذور الحرة عن طريق تحويل الجذور الحرة إلى بيروكسيد الهيدروجين ثم إلى الماء، وذلك من خلال عملية تشمل استخدام النحاس، والزنك، والمنغنيز، والحديد. لذا، فإنه من المهم تزويد الجسم بالفيتامينات والمعادن لتأثيرها المباشر وغير المباشر في نشاط مضادات الأكسدة ومكافحة الجذور الحرة في الجسم. [21] ومن الأمثلة على مضادات الأكسدة الإنزيمية ما يلي :

- فوق الأكسيد الديسموتاز (Superoxide Dismutase)
- جلوتاثيون بيروكسيداز (Glutathione Peroxidase)
- كاتالاز : (Catalase)

I-5-6- وظيفة مضادات الأكسدة :

تعمل مضادات الأكسدة على تأخير تلف الخلايا ومنع تأكسد مواد الكيمائية حيث تستخدم في الوقاية من المواد غير مشبعة في الدهون [22]

تستخدم مضادات الأكسدة لمنع أكسدة المكونات الغير مستقرة في الصناعات الغذائية والمستحضرات التجميل والأدوية [23]

يمكن أن تعمل في اليات مختلفة ليس في تخلص من الجذر الحرة ولكن أيضا في ازالة معدن الثقيل من أيونات المعادن الانتقالية [24]

I-6- سلبيات وإيجابيات مضادات الأكسدة :

*** إيجابياتها**

- يمكن أن تساعد في تعزيز جهاز المناعة
- احمينا من العديد من الأمراض عن طريق القضاء على الجذور الحرة في أجسامنا
- يسهل الحصول عليها من خلال بعض الأطعمة مثل الفاكهة أو الخضار
- يمكن الحصول عليها من خلال المكملات الغذائية في حالة عدم تناول ما يكفي من الفاكهة أو الخضار
- يمكن أن يحمينا من الأمراض العقلية ويقلل من الأعراض المرتبطة بالشيخوخة

*** سلبياتها:**

- يمكن أن يؤدي الكثير منها إلى إتلاف جسمك وتقليل جهاز المناعة لديك
- قد يكون من الصعب الحصول على جميع الكميات المطلوبة لأنه ليست كل الفواكه والخضروات متشابهة (على سبيل المثال، قد يحتوي بعضها على فيتامين ج بينما يحتوي البعض الآخر على فيتامين هـ.)
- يمكن أن يكون تناول المكملات الغذائية للتعويض عن الأطعمة أمراً خطيراً اعتماداً على الجرعة لأنه يمكن أن يتعارض مع الحالة الطبيعية لجسمنا
- يتم التخلص من الجذور الحرة فقط على أساس واحد إلى واحد (لكل حصة من الفاكهة أو الخضار يتم تناولها، يتم التخلص من كمية صغيرة فقط من الجذور الحرة)

- قد يؤدي تناول الكثير من فيتامين أ إلى تلف الحمض النووي
- يمكن أن يؤدي تناول الكثير من فيتامين (هـ) Vit E إلى تكوين مواد مؤكسدة وزيادة تلف الخلايا.

[25]

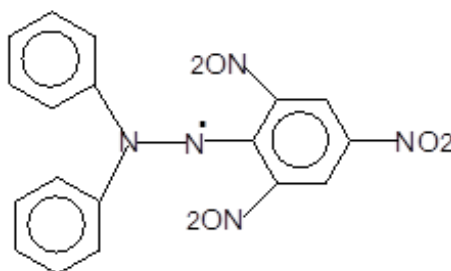
الفصل الثاني

تمهيد: لقياس قدرة مستخلص او مركب لتثبيط الجذر الحر او توقيف عملية الأوكسدة، تقدر الفاعلية للمضادات الأوكسدة بعدة طرق التي من بينها CUPRAC، ABTS، DPPH، TRAP،FRAP ، PM هذه الطرق تعتمد على التلوين ونزع التلوين في طول موجي معين. [26] حيث نتطرق في هذا الفصل الى تقدير مضادات الأوكسدة (الطرق الكيمائية).

II- طرق تقدير مضادات الأوكسدة :

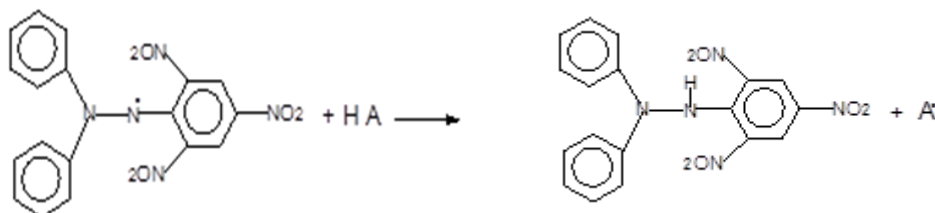
1-II- اختبار DPPH:

هو اختبار مضاد للجذور الحرة لقد سبق تعريفه من 50 سنة ماضية من طرف العالم "بولواز" سنة 1958 ولقد اعتمد في ذلك على توضيح بعض الحسابات الخاصة بمضادات الأوكسدة.



الشكل (1-II): جزيئة DPPH [17]

DPPH : ثنائي فينيل بكريل هايدرازيل (diphenyl picryl hydrazyl) هي مادة صلبة لونها بنفسجي - مسود، يشتق هذا الجذر الحر من جزيئة DPPH-H ثنائي فينيل بكريل هايدرازيل diphenyl picryl hydrazine وهي مادة صلبة غير جذرية لونها أصفر [27]



الجذر الحر DPPH

ذو اللون البنفسجي

الجزيء المستقر DPPH-H

ذو اللون الاصفر

الشكل (2.II): معادلة تثبيط جذر DPPH في وجود مضادات الجذور الحرة [17]

يتميز اختبار DPPH بتشكيل الجذر الحر والمستقر للمركب الأزوتي Diphenyl picryl hydrazyl (DPPH) وهذا الاستقرار ناتج عن تمركز الإلكترون الحر على مستوى الجزيء، و يعتمد هذا الاختبار على نسبة إرجاع الجذر DPPH في وجود مركب مضاد للأكسدة قادر على منح إلكترون أو جذر هيدروجيني، و يظهر ذلك من خلال التفاعل اللوني للجذر DPPH • ذو اللون البنفسجي الداكن الذي يتحول إلى جزيئة DPPH-H مستقرة. [28] وهي مادة صلبة غير جذرية لونها أصفر. [29]

هذا الاختبار يعتمد على تثبيط الجذور الحرة حيث يترك 30 دقيقة مباشرة مع المستخلصات المضادة للجذور، مع العلم أن الجذر DPPH مستقر نسبياً يتفاعل مع جزيئة مضادة للجذور ليتحول إلى DPPH-H مع فقدان الامتصاصية بطول الموجة الأعظمي 517nm. [30]

إن قدرة مضادات الجذور الحرة تحدد بعبارة كمية حسابية بدلالة تركيز المحلول للقضاء على 50% من الجذور الحرة، النتيجة نعبر عليها ب IC50 وهي معرفة بتركيز المحلول المعبر عنه بوحدة (g/l) بالنسبة للمستخلصات الخام أو ب (Mm). للمركبات النقية معلومة الكتلة المولية لمسح 50% من جذور DPPH ، وتحسب انطلاقاً من منحنيات التغير في نسب التثبيط المئوي % بدلالة تركيز المحلول، كلما كانت قيمة IC50 صغيرة كانت فعالية مضادات الجذرية كبيرة. [31] [32]

هذا الاختبار مستعمل بكثرة نظرا للخصائص التي يتميز بها: سريعة، سهلة، غير مكلفة [30] كما استخدم هذا الجذر بصورة شائعة كمادة كاسحة للجذور، يتحد جذر DPPH على الفور مع جميع أنواع الجذور الحرة أو مضادات الجذور الحرة مكونا نواتج أخف لونا بكثير من لون الجذر لمتابعة حركية هذا التفاعل نستعمل جهاز UV-V.

في اختبار DPPH نلاحظ تغيرات مختلفة لمضادات الأكسدة تبعا لطبيعتها، من بينها الحركية السريعة، المتوسطة أو البطيئة وفقا للزمن اللازم للوصول إلى نتيجة، وقدرة مضاد الجذور تحسب انطلاقا من نسبة DPPH المتبقية في نهاية الوقت المحدد للتفاعل. [30]

II-1-1- المواد والأجهزة المستعملة :

تتم تقدير فاعلية مضادات الأكسدة في المستخلصات الكيمائية وفق الأجهزة والمواد التالية :

❖ الأجهزة:

الجدول (1.II) الأجهزة المستعملة في تقدير الفاعلية المضادة للأكسدة بطريقة الكيمائية [30]

الجهاز	
evaporator Rotary	جهاز المخبر الدوار
UV-Spectro photometer	جهاز الأشعة فوق البنفسجية - المرئية

II - 2-1 - طريقة العمل:

تحضير المحاليل المعيارية:

- تحضير محلول DPPH تركيزه 0.1mM في الميثانول
- تحضير تراكيز مختلفة من حمض السكوريك تكون محصورة بين 0.01mg/ml و 0.1 mg/ml
- يتم تعين قدرة كبح المستخلصات الكيمائية المراد تحليلها لجذر DPPH حسب طريقة *Singh et al* [33].
- نضع في أنابيب اختبار $150 \mu\text{l}$ من كل تركيز نضيف لها 3 ml من DPPH ، نرج الأنابيب جيدا ليتجانس المحلول نضعها في الظلام لمدة 30min، نقرأ الامتصاصية بجهاز مطيافية-UV (Visible) عند طول الموجة $\lambda_{\text{max}} = 517 \text{ nm}$ ،
- نعامل BHT و BHA بنفس الطريقة. يستخدم حمض السكوريك كعيار و كل من BHA و BHT كشواهد مرجعية.

II - 3-1 - المواد الكيمائية المستعملة :

الجدول (II-2): المواد الكيمائية المستعملة في اختبار DPPH [30]

النقاوة	المادة	
%99	Méthanol	الميثانول (CH ₃ -OH)
%99	2,2-diphenyl-1-Picrylhydrazyl	ثنائي فينيل-2-بيكريل-هيدرازيل DPPH C ₁₈ H ₁₂ N ₅ O ₆
%99	ferric chloride	كلوريد الحديدك (FeCl ₃)
%99	Trichloroacetic Acid) TAC (حمض ثلاثي كلور أستيك (C ₂ HCl ₃ O ₂)
%99.7	Ascorbic Acid	حمض الاسكروبيك (C ₆ H ₆ O ₆)
%99	Acid Gallic	حمض الغاليك ((OH) ₃ C ₆ H ₁₂ COOH,H ₂ O)
%99	Hydroxytoluènebutylé	بوتيل هيدروكسي تولين (C ₁₅ H ₂₄ O)
%99	Hydroxyanisolebutylé	بوتيل هيدروكسي الانيسول (C ₁₁ H ₁₆ O ₂) (BHA)
%99	Monosodium phosphate	فوسفات أحادي صوديوم (NaH ₂ PO ₄)
%99	Disodium phosphate	فوسفات ثنائي صوديوم (Na ₂ HPO ₄)
%99	Quercetin	كرستين (C ₁₅ H ₁₀ O ₇)
%99	molybdate Ammonium	مولبيدات الامنيوم (H ₂₄ Mo ₇ N ₆ O ₂₄)
%99	Acid Sulfuric	حمض الكبريت (H ₂ SO ₄)

تحضير العينات:

نحضر عدة تراكيز مخففة من المستخلصات الكيمائية المراد تحليلها ونعاملها بنفس الطريقة التي عاملنا بها حمض الاسكوريك . يتم تعين القدرة التثبيطية للمستخلصات بحساب النسبة المئوية للتثبيط % لي (DPPH) وذلك من العلاقة التالية :

$$I\% = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100$$

حيث أن:

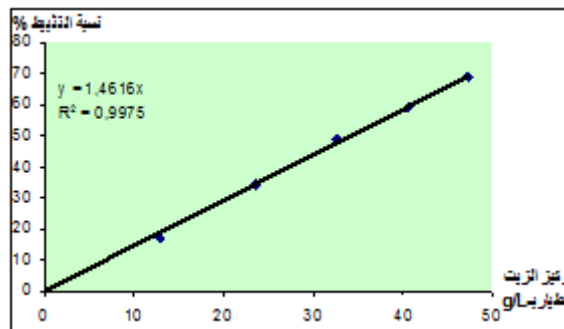
%: نسبة تثبيط العامل المضاد الأكسدة للجذر الحر • DPPH .

A_0 : الامتصاصية الضوئية للجذر الحر في غياب المستخلصات النباتية بعد مرور 30min

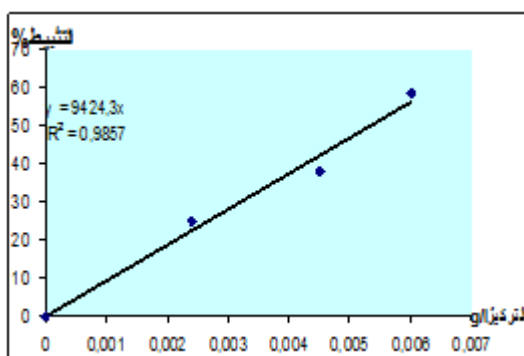
A_1 : الامتصاصية الضوئية للخليط (الجذر + المستخلصات الكيمائية المراد تحليلها) بعد مرور 30min.

يرسم المنحنى البياني للنسبة المئوية للتثبيط بدلالة التركيز، هو عبارة عن معادلة مستقيم من الدرجة

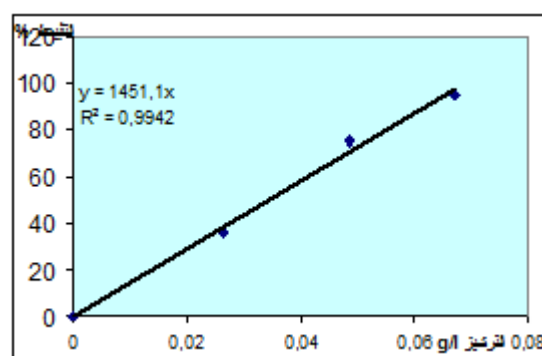
الأولى يمر بالمبدأ.



المنحنى رقم (II-1): اختبار DPPH للزيت الطيار



ب. حمض الأسكربيك (VC)



أ. الطوكوفول (VE)

المنحنى رقم (II.2): المنحنيات القياسية لحمض الأسكربيك والطوكوفول [17]

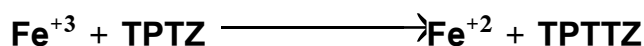
II-1-4-1- مزايا طريقة DPPH :

يسمح تطبيق هذا الاختبار بفهم الظواهر الكيمائية المختلفة وله مزايا واضحة، مثل التكلفة المنخفضة، وسهولة إجراء التجارب، والتكاثر، والتطبيق في درجة حرارة الغرفة، فضلاً عن إمكانيات النظام، وهو يشرح سبب استمرار المجتمع العلمي في تطبيق اختبار DPPH ويعمل على تحسين / توحيد البروتوكولات لتحقيق نتائج مهمة وقابلة للمقارنة.

2-II- اختبار FRAP : (اختبار مضاد للأكسدة)

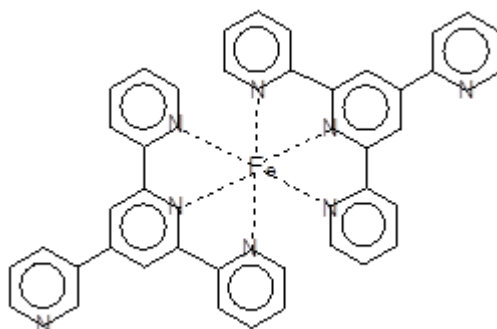
الاختبار FRAP (Ferric Reducing / Antioxydant Power) يدرس فاعلية مضادات الأكسدة الإرجاعية في تفاعل الإرجاع اللوني، أي تدرس مدى قدرة المستخلصات كمثبطات لعملية الأكسدة يعتمد مبدأ الطريقة على تلوين أو عدم تلوين للمعقد ثلاثي بيريديل ثلاثي أزين فريك (TPTZ) - tripyridyl- 2,4,6-s-triazine ferrique في الوسط الحامضي. [34] [35]

طريقة التحليل بـ FRAP هي تجربة سريعة مباشرة نوظفها لقياس مضادات الأكسدة لا إنزيمية داخل السائل البيولوجي الحيوي (البلازما البشرية) ونحن استعملنا هذا الاختبار لدراسة ومتابعة مضادات الأكسدة في مستخلصاتنا فنلاحظ التغير بزيادة الامتصاصية الضوئية في مجال زمني منظم من 0 إلى 10 دقائق وبصورة أدق هذا الاختبار يسمح لنا بمتابعة حركية التفاعل وكذلك متابعة كثافة الضوء الممتص بدلالة الزمن ومن ثم حساب ثابت معدل سرعة التفاعل.



بني فاتح

أزرق غامق

الشكل (3.II): جزيئة TPTZ Fe⁺³

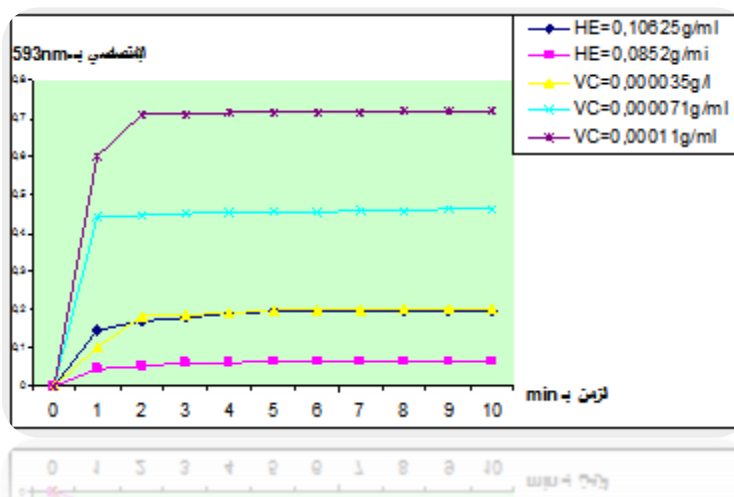
- تحضير المحاليل: للحصول على خليط FRAP نحضر ثلاث محاليل في أوساط مائية كالتالي:
- المحلول الأول: هو محلول منظم (الموقي-Tampou) نحضر 300mM من أسيتات بريف (buffer) عند PH=3.6 (نحضر 3.1g من أسيتات الصوديوم (CH₃COONa) مع 16ml من حمض الخل المجمد (CH₃COOH) يكمل المحلول إلى 1 لتر بالماء المقطر).
- المحلول الثاني: نحضر 10mM من (TPTZ) أي (نزن 3.123 من (TPTZ) مع 40mM من (HCl
- المحلول الثالث: نحضر 20mM من ثلاثي كلوريد الحديد المائية (FeCl₃-6H₂O)

نخلط المحاليل الثلاثة بتكافؤ 10 : 1:1 ونسميه خليط FRAP. [36]

1-2-II-طريقة العمل

لرسم المنحنى القياسي نقوم بتحضير تراكيز مختلفة من حمض الأسكوربيك تكون محصورة بين 0.01mM و 0.2 mM.

نأخذ 2ml من الميثانول نضيف لها 1ml من الخليط FRAP و 100 µl من التركيز الأول لـ حمض الأسكوربيك مع إضافة القطرة الأولى تبدأ القراءة في جهاز UV-V ونسجل القيم كل دقيقة ولمدة 10 دقائق (المنحنى (3.II)), نكرر العملية مع جميع التراكيز المحضرة لحمض الأسكوربيك، ثم نرسم منحنيات الحركة لتغير الامتصاصية بدلالة الزمن.



منحنى رقم (3.II): منحنى الحركة لتغير الامتصاصية لاختبار FRAP [17]

من المنحنى نلاحظ أن الامتصاصية تزداد بمرور الزمن إلى أن يثبت، و كلما كان تركيز المستخلص كبير كلما كانت الامتصاصية كبيرة وبالتالي التقدير الكيفي للفعالية المضادة للأكسدة يمكن أن نختاره عند زمن معين.

3-II الاختبار الفوسفات موليبدات (PM):.

يسمح هذا الاختبار بقياس القدرة المضادة للأكسدة للمستخلصات المراد دراستها في وجود عامل اختزال، وهذا بإرجاع Acide Phosphmolybdic الى Phosphomolybdate ذو اللون الأزرق. يتم في هذا الاختبار انتقال الهيدروجيني أو الإلكترون من المستخلص الكيمائية أو المركب المضاد للأكسدة نحو المعقد PM .

1-3-II طريقة العمل:

تحضير المحاليل المعيارية:

- تحضير تراكيز مختلفة من حمض الاسكوريك تكون محصورة بني 0.02 ml/mg و 0.02 ml/mg
- تحضير مزيج يحتوي على موليبدات الامونيوم (4 mM) فوسفات الصوديوم (28mM) حمض الكريبت (M.006)

يتم تعين القدرة الكلية المضادة للأكسدة لمستخلصات الكيمائية حسب قيمة *Prieto et al* [37].

مع بعض التعديلات التي قام بها *Dasgupta et al* [38] نضع في أنابيب الاختبار 0.3ml من كل محلول و نضيف لها 3ml من المزيج، يحضن الخليط في حمام مائي عند درجة حرارة 95 C° لمدة 90min نترك العينات تبرد في درجة حرارة الغرفة ثم نقرأ الامتصاصية بجهاز مطيافية-Visible UV عند طول الموجة λ.

نعامل BHA و BHT بنفس الطريقة. يستخدم حمض السكوريك كعيار و كل من BHA و BHT بتركيز g/l 0.1 كشواهد مرجعية.

II-3-2 - تحضير العينات:

نحضر عدة تراكيز مخففة من المستخلصات الكيمائية ونعاملها بنفس الطريقة التي عاملنا بها حمض الاسكروبيك يتم تعين القدرة الكلية المضادة للأكسدة بحساب المقدار (TAC) Capacity Antioxidant (Total) وذلك من العلاقة التالية:

$$TAC = K / K'$$

حيث:

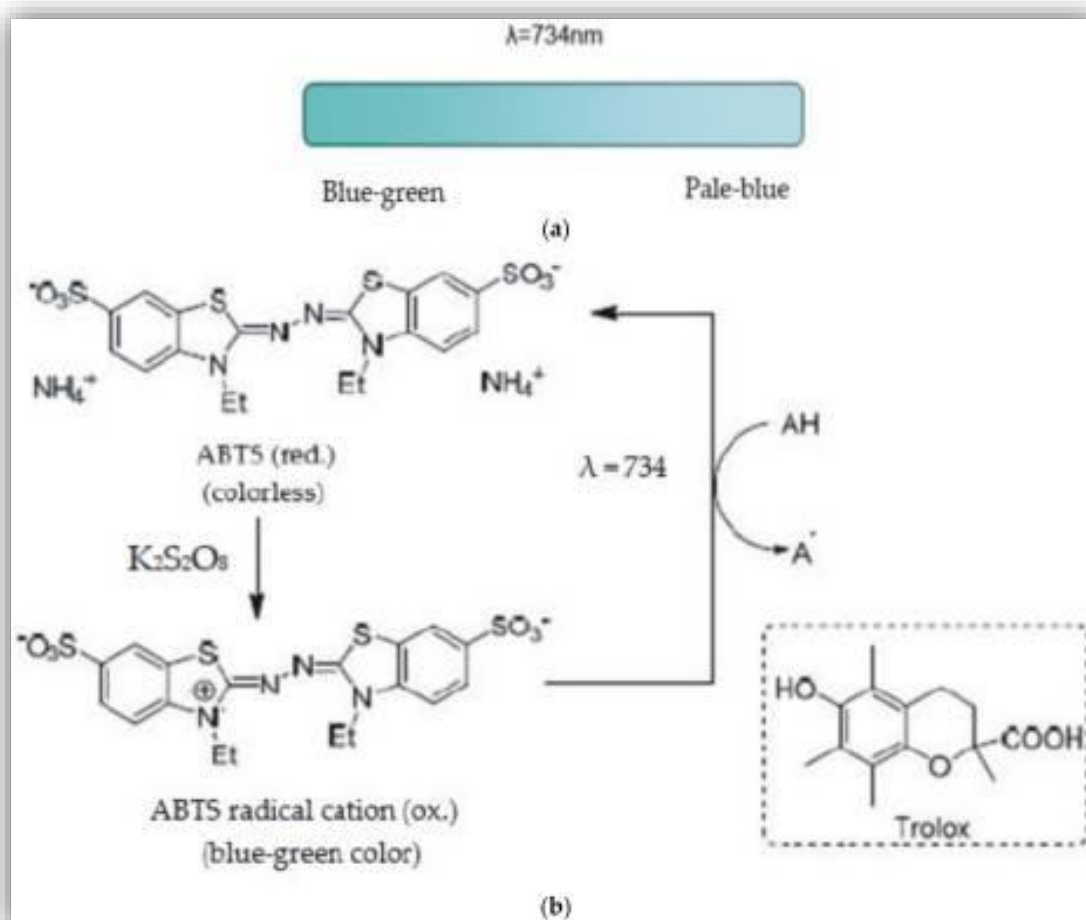
TAC: القدرة الكلية المضادة للأكسدة

K: ميل منحنى المستخلصات

K': ميل منحنى قياس حمض الأسكروبيك

4-II اختبار (TEAC) ABTS

تم تطوير اختبار TEAC لأول مرة بواسطة *Miller et al (1993)* كطريقة بسيطة ومريحة تستخدم لقياس السعة الكلية لمضادات الأكسدة [39] (TAC) يقيس الاختبار قدرة مضادات الأكسدة على تحييد $ABTS^{•+}$ (2,2'-azinobis (3- ethylbenzthiazolin-6-sulfonic acid) (ABTS^{•+})، وهو حامل للون الأزرق والأخضر بأقصى امتصاص عند 734 nm، وتتنخفض شدته في وجود مضادات الأكسدة.

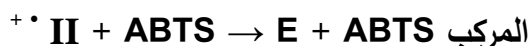
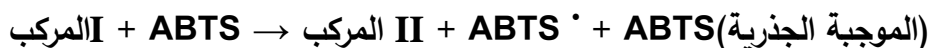


الشكل (4-II): اختلاف اللون في اختبار ABTS (a)؛ مخطط التفاعل المتضمن في
 (ABTS) 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid
 الراديكالي لفحص نشاط الكسح الكاتيون (b) [40]

قد يتم إنشاء $ABTS^{++}$ من $ABTS$ في وجود عوامل قوية مضادة للأكسدة. تعتمد درجة تغير لون اللون الأزرق والأخضر، التي تُقاس على أنها انخفاض مفاجئ في الامتصاصية إلى 734 nm، على مدة التفاعل، والنشاط المضاد للأكسدة الجوهري، وتركيز العينة.

في اختبار TEAC الأصلي، تم استخدام ميثيوغلوبين وبيروكسيد الهيدروجين لتوليد شق وسيط من فيريلميغلوبين، والذي يتفاعل لاحقاً مع $ABTS$ لإنتاج $ABTS^{++}$ في وقت لاحق، تم استبدال عامل الأكسدة مع بيروكسيد أو بيرسلفات. بيرسلفات البوتاسيوم هو أكثر العوامل المؤكسدة شيوعاً لتوليد $ABTS^{++}$.

كما يتضح من التفاعلات أدناه، في النظام المكون من $ABTS / H_2O_2 / peroxidase$ ، يتصرف $ABTS$ كعامل اختزال، مستبدلاً الشكل الممكن من الإنزيم (المسمى المركب I) في المركب II، والذي يعود إلى الشكل الأولي لـ الإنزيم (E).



يتأكسد $ABTS$ بواسطة المؤكسدات إلى كاتيون الجذري ($ABTS^{++}$)، الذي يتلون بشكل مكثف باللونين الأزرق والأخضر. إضافة إلى ذلك، فإن جذري $ABTS$ قابل للذوبان في الماء والمذيبات العضوية، مما يتيح تحديد قدرة مضادات الأكسدة لكل من المركبات المحبة للماء والمحبة للدهون.

أعد *Durmaz (2012)* مسحوق ($ABTS^{++}$) الجذري الجاهز للاستخدام من خلال احتضان $ABTS$ مع بيروكسيدسلفات البوتاسيوم، ثم تجفيف المحلول الناتج وتجميده. [40] تم استخدام هذا المسحوق الجذري المجفف بالتجميد كبديل للمحلول، وقد أثبت المؤلفون الخطية ودقة الاختبار المعدل.

تم استخدام التبييض بمحلول مُشكل مسبقاً من الكاتيونات الجذرية الزرقاء-الخضراء ($ABTS^{++}$) على نطاق واسع لتقييم قدرة مضادات الأكسدة للخلائط المعقدة للحث على تفاعل أكسدة الكحوليات العطرية، مع

p- تكوين الألدheid المقابل. بالإضافة إلى ذلك، تم استخدام ABTS لتحديد أحماض hydroxybenzoic ومركبات البوليفينول عن طريق إنزيم laccase. [41.42] وأيضًا لتحديد مجموعة متنوعة من مركبات الفلافونويد باستخدام بيروكسيداز. [43] في كلتا الحالتين، نتيجة للتفاعل الأنزيمي، يتم تكوين مركب ABTS – polyphenol.

تم استخدام اختبار TEAC لقياس القدرة المضادة للأكسدة للمواد النقية والسوائل الجسدية والمواد النباتية. قد يكون اختبار TEAC، المماثل للطرق الأخرى للتحديد الجذري، آليًا ومكيفًا مع الألواح الدقيقة وتقنيات حقن التدفق. يمكن أيضًا أن يقترن بـ HPLC عن طريق تضمين تفاعل العمود مع الراديكالية ABTS لتسهيل تحديد مضادات الأكسدة الفردية في خليط معقد. يوفر HPLC-TEAC طريقة سريعة وفعالة لفصل وتحديد المركبات النشطة بيولوجيًا في مادة المصدر. [43] يمكن تحقيق حساسية وكفاءة أعلى لاختبار TEAC عندما تقترن الطريقة بتقنيات الكشف الأخرى، مثل قياس التيار [44] و FTIR. [45] تستخدم العديد من فحوصات TEAC المعدلة الجيل الإنزيمي لـ (ABTS⁺⁺)، بشكل أساسي تلك التي تستخدم أنظمة التدفق المستمر. على سبيل المثال، أبلغ *Milardovic et al (2007)* عن توليد ABTS⁺⁺ بواسطة الجلوكوزوكسيداز والبيروكسيداز المثبتين بشكل منفصل في مفاعلات التدفق الأنوبي لتحليل قيم TEAC للمشروبات الكحولية. [46]

يمكن تقييم طريقة الكسح الجذري ABTS على نطاق واسع من الأس الهيدروجيني، وهو أمر مفيد لدراسة تأثير الأس الهيدروجيني على آليات مضادات الأكسدة لمكونات الغذاء. إضافة إلى ذلك، فإن جذري ABTS قابل للذوبان في الماء والمذيبات العضوية، مما يتيح تحديد قدرة مضادات الأكسدة لكل من المركبات المحبة للدهون والماء. في حالة المركبات المحبة للدهون، مثل الكاروتينات والتوكوفيرول وما إلى ذلك، تم استخدام المحاليل المتجانسة لتقييم درجة وقدرة مضادات الأكسدة القابلة للذوبان في الدهون على الدهون.

وفقًا للبروتوكول الذي وضعه *Miller et al*، [47] فيما يتعلق بتقدير النشاط المضاد للأكسدة للكاروتينات، تم إذابة هذه المواد في الأسيتون وتم تخفيفها في خليط من الهكسان والأسيتون (90:10V/V)، باستخدام ثاني أكسيد المنغنيز كوسيط تفاعل. *Böhm et al (2002)* غير هذه الطريقة باستخدام الهكسان كمذيب لإذابة الكاروتينات. أعقب مرحلة الذوبان هذه بالطرد المركزي وقياس امتصاص الطبقة السفلية المحبة للماء باللونين الأزرق والأخضر. [48] ومع ذلك، تسببت هذه الاختبارات في حدوث مشكلات تفاعلية خطيرة بين الكاروتينات و ABTS⁺⁺ في البيئة المائية. [49]

استنادًا إلى قدرة إنزيم بيروكسيداز للعمل في البيئات العضوية، *Cano et al (2000)* وصف طريقة تتضمن الإنتاج المباشر للكاتيون في مثل هذه البيئات. [50]

تم استخدام مذيبات مختلفة، مثل الميثانول والإيثانول والأسيتون وثنائي ميثيل سلفوكسيد، وبالتالي إنشاء حركية التفاعل وكذلك ثبات الجذور. كان الوقت اللازم لتوليد $ABTS^{+ \cdot}$ جذريًا بواسطة إنزيم البيروكسيداز حوالي 100 ثانية، باستخدام الوسائط الإيثانولية. تم ربط القصور في هذا النشاط لتوليد $ABTS^{+ \cdot}$ الجذري بقابليته للذوبان في مثل هذه البيئات. [51] تم تحديد النشاط المضاد للأكسدة الكلي (TAA) لكل من المركبات المحبة للماء والمحبة للدهون من خلال الجمع بين نشاط مضادات الأكسدة المحبة للدهون (LAA) من خلال $ABTS^{+ \cdot}$ الكاتيون الجذري.

Puangbanlang et al (2019) تحدث عن أول استخدام لجهاز مثبت على الورق كمنصة كشف بسيطة ورخيصة وسريعة من أجل التحديد المتزامن لنشاط مضادات الأكسدة والمحتوى الفينولي الكلي في عينات الطعام. اختبران للنشاط المضاد للأكسدة، بما في ذلك تحليل الجذر الموجب (ABTS) وتحليل القدرة المضادة للأكسدة المخفضة لأيون النحاس (CUPRAC)، وكذلك اختبار المحتوى الفينولي الكلي، اختبار (Folin-Ciocalteu FC)، تم استخدامها في نفس الوقت.

يتألف الجهاز من منطقة أخذ عينات مركزية متصلة بأربع مناطق متتالية للمعالجة المسبقة والكشف تستضيف جميع الاختبارات الثلاثة وقياس الشاهد للعينة. تم إجراء الاختبار عن طريق تثبيت العينات في منطقة أخذ العينات من أجل التدفق خلال مناطق المعالجة المسبقة والكشف التي تحتوي على الكواشف المخزنة لكل اختبار مضاد للأكسدة، مما أدى إلى تغيير اللون الذي تم قياسه ضوئيًا، تضمنت تحسينات الاختبار تركيزات الكواشف الرئيسية ووقت التفاعل وتعديل السطح، والتي يتم إجراؤها للحصول على اختبارات حساسة، مع مجالات خطية واسعة. تم تقييم معايير مضادات الأكسدة المختلفة لاحقًا من أجل تحديد الخصائص التحليلية للطريقة. تم تطبيق الاختبارات الورقية بنجاح لاكتشاف النشاط المضاد للأكسدة والمحتوى الفينولي الكلي في 10 مشروبات ذات قيم مكافئة لحمض جاليك (GAE) مماثلة لتلك التي تم الحصول عليها في الاختبارات الأخرى، بفاصل ثقة 95%. بالإضافة إلى ذلك، كانت قيم GAE للعينات التي تم الحصول عليها نتيجة للتحليلات الثلاثة للاختبار الورقي مرتبطة جيدًا فيما بينها مع معاملات ارتباط Pearson عالية نسبيًا، أظهرت هذه النتائج أن الاختبار الورقي أسفر عن نتائج دقيقة ومناسب للتحليل المتزامن للنشاط المضاد للأكسدة والمحتوى الفينولي الكلي في عينات حقيقية. [52]

II-4-1- مزايا اختبار ABTS :

- تسمح اختبارات TEAC بتحديد مجموعة كبيرة ومتنوعة من المواد المضادة للأكسدة، لأن $ABTS^{+•}$ جذري يتفاعل بسرعة مع كل من المواد المضادة للأكسدة الاصطناعية والطبيعية (مثل الفينولات والأحماض الأمينية والبيبتيدات وفيتامين E وفيتامين C) في مكونات الغذاء. [53]
- يمكن استخدام اختبار مضادات الأكسدة TEAC على نطاق واسع من الأس الهيدروجيني، على الرغم من أنه في كثير من الحالات، قد تؤثر العينة التي يتم قياس نشاط مضادات الأكسدة فيها على قيمة الرقم الهيدروجيني. [54] ويرجع ذلك إلى حقيقة أن آلية التفاعل قد تختلف باختلاف الأس الهيدروجيني، على سبيل المثال، يتم تسهيل نقل الإلكترون عن طريق الظروف الحمضية. [55]
- $ABTS^{+•}$ القابلية للذوبان في البيئات العازلة والعضوية أدت إلى تطوير طرق لتحديد نشاط مضادات الأكسدة المحبة للماء والدم [51]، والتي أسفر مجموعها عن تحديد دقيق لقدرة المضادة للأكسدة للمنتجات. [52]
- مقايسة TEAC رخيصة وبسيطة من الناحية التشغيلية.

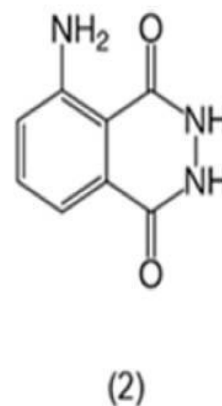
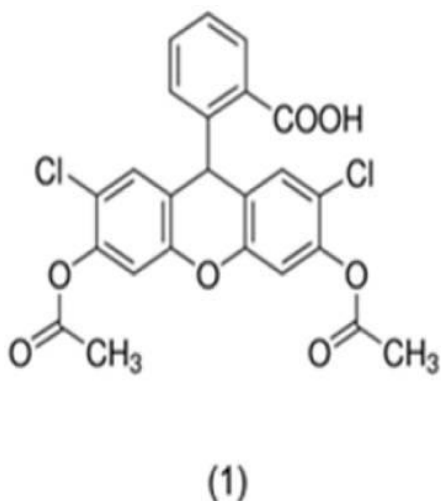
II-4-2- عيوب اختبار ABTS :

- في الاختبارات الحركية، يكون التفاعل المتضمن في اختبار TEAC غير مؤكد لأن مادة الاختبار يمكن أن تتفاعل مع المؤكسد والإنزيم والكاتيون الجذري، وبالتالي الحصول على قيمة مبالغ فيها. [53]
- في حين أن اختبار تغير اللون قد يحل هذه المشكلة، تحدث عيوب أخرى بسبب مشاكل الإجراءات والآلية. [54]
- تم أيضًا تحدي اختبار TEAC بسبب افتقاره إلى الأهمية البيولوجية بسبب استخدام الكاتيون الجذري ABTS الاصطناعي غير الموجود في النظم الغذائية أو البيولوجية. [55]
- تحتوي العديد من المركبات الفينولية على إمكانات منخفضة للأكسدة والاختزال، وبالتالي يمكن أن تتفاعل مع $ABTS^{+•}$. بالإضافة إلى ذلك، قد يكون تفاعل TEAC مختلفًا بالنسبة للتفاعلات البطيئة، وقد يستغرق وقتًا طويلًا للوصول إلى نقطة النهاية. في مثل هذه الحالات، قد يؤدي استخدام نقطة نهاية قصيرة المدة (4 أو 6 دقائق) إلى التقليل من قدرة مضادات الأكسدة بسبب القراءة قبل انتهاء التفاعل. [56]

5-II اختبار TRAP :

يعتمد اختبار TRAP على قدرة مضادات الأكسدة على تثبيط التفاعل بين جذور البيروكسيل والجزء المستهدف، والذي يمثل مبدئيًا استهلاك O₂ (كعينة) في عملية الأكسدة الناتجة عن التحلل الحراري لثنائي هيدروكلوريد (ABAP).

يمكن قياس زمن التخلف لامتنصاص الأكسجين، أي فترة الاستقراء، كميًا واستخدامه للتعبير عن السعة الكلية لمضادات الأكسدة للعينات كقيمة TRAP منذ ذلك الحين. [57] تم تعديل هذه الطريقة عدة مرات باستخدام مجموعة واسعة من العينات والمبدعين وقياسات النقطة النهائية، على سبيل المثال تم استخدام إنزيمات AAPH والبيروكسيدز كمبادرين، وفلورسين، ثنائي هيدروفلوريسين ثنائي الأستات (DCFH-) (DA) و as luminol قياسات النقاط النهائية للتفاعلات. [58] يتم عرض التركيب الكيميائي لثنائي أستات ثنائي هيدروفلوريسين ولومينول في الشكل التالي:



الشكل (5-II): التركيب الكيميائي لثنائي أستات ثنائي هيدروفلوريسين [58]

تم تعريف مؤشر TRAP على أنه عدد مولات ROO^\bullet الموجودة في كل لتر من السوائل (البلازما) [59]، وفقاً للمعادلة:

$$TRAP = R_{ROO^\bullet} \times \tau_{plasma}$$

حيث:

R_{ROO^\bullet} : هو ROO^\bullet معدل التكوين

τ_{plasma} : هي وقت التأخير في استهلاك الأوكسجين الناتج عن وجود البلازما البشرية.

تم اقتراح طرق مختلفة لتقييم مؤشر TRAP للمنتجات الطبيعية. يستخدم أحدهم لومينول (o-aminofthalhydrazide) و pyranin (8-hydroxy-1,3,6-pyrene trisulfonic acid) كجزيئات مستهدفة. يتفاعل Luminol مع ROO^\bullet ، ينبعث منه فوتونات يمكن قياسها بواسطة مقياس اللعان، بينما يمكن تتبع أكسدة البيرانين، الناتجة عن ROO^\bullet ، عن طريق قياسات التألق. [57] يمكن ملاحظة أن شدة انبعاث الضوء أثناء احتضان luminol مع AAPH ترتبط ارتباطاً مباشراً بتركيز الحالة المستقرة لـ ROO^\bullet المتولد في التحلل الحراري AAPH. [57] في وجود المركب الفينولي (أو محاليله المعقدة)، يمكن ملاحظة أن تركيز الحالة المستقرة لـ ROO^\bullet يتناقص، وفقاً للمعادلة التالية:

$$[ROO^\bullet]_{ss} = R_{ROO^\bullet} / \sum k_i$$

حيث:

$[ROO^\bullet]_{ss}$: هو تركيز الحالة المستقرة لـ ROO^\bullet .

R_{ROO^\bullet} : هو معدل تكوين ROO^\bullet .

$\sum k_i$: هو معدل ثابت لجميع التفاعلات بين المركب الفينولي و ROO^\bullet .

عند استخدام luminol كجزيء مستهدف، بتركيزات عالية من العينة قيد الدراسة (تركيزات عالية من المركب الفينولي)، يمكن تقدير قيم TRAP وفق المعادلة التالية:

$$\text{TRAP} = \sum n_i [X_i] / \sum n_{\text{TROLOX}}$$

حيث:

- $\sum n_i$: هو عدد الجذور الحرة التي يلتقطها كل جزيء i
- $[X_i]$: هو التركيز الميكرومولار لهذا المكون
- $\sum n_{\text{TROLOX}}$: هو مكافئ TROLOX

لذلك يرتبط مؤشر TRAP ارتباطاً مباشراً بقياس العناصر الكيميائية للتفاعل بين المركب الفينولي و $(n) \cdot \text{ROO} \cdot$ ، والذي يتم تعريفه على أنه عدد جزيئات ROO التي تم التقاطها لكل جزيء بواسطة المركب الفينولي. على أي حال، عند تركيزات منخفضة من العينة، عندما يكون تركيز المركب الفينولي غير كافٍ للحماية الكاملة للومينول، يمكن ملاحظة أن $[\text{ROO} \cdot]$ فقط يتناقص، دون وجود أوقات تأخير في الحركة مظهر. في ظل هذه الظروف، يمكن تقدير مؤشر TAR، على النحو المحدد في المعادلة التالية، مما يعكس تفاعل المركب الفينولي تجاه $\text{ROO} \cdot$:

$$\text{TAR} = \sum k_i / k_{\text{TROLOX}}$$

حيث:

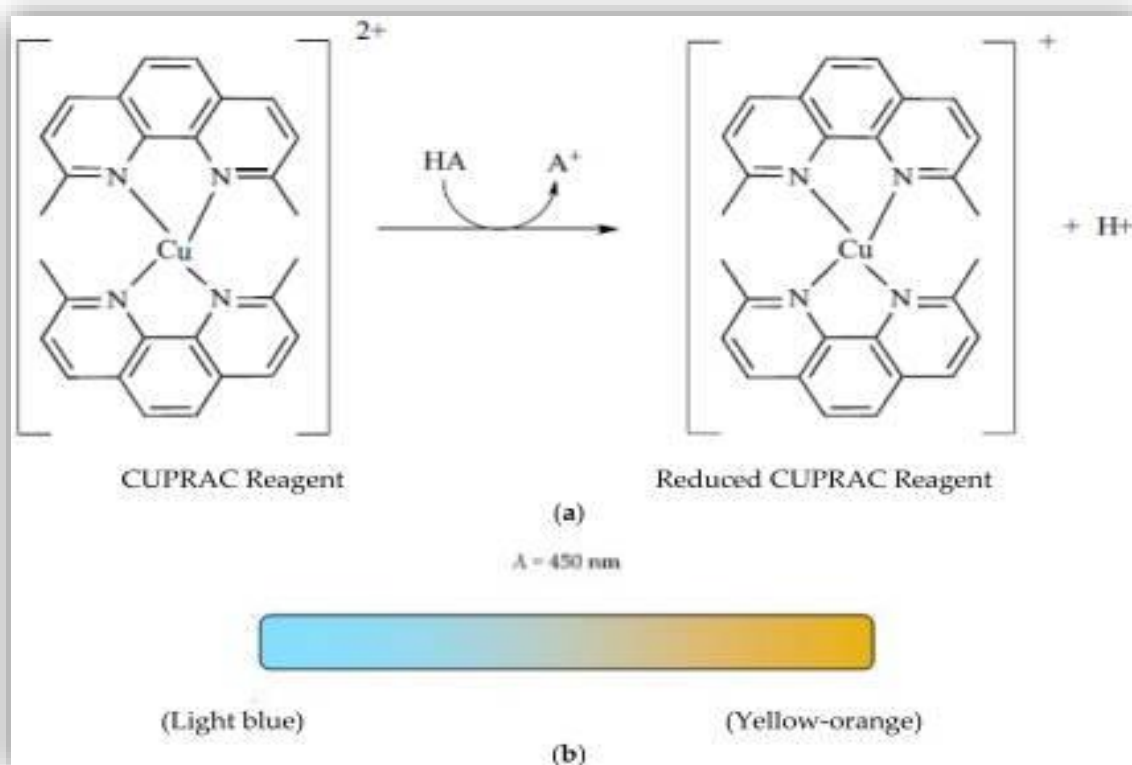
$\sum k_i$: هي النسبة بين كفاءة المركب المدروس و TROLOX في تقليل تركيزات الحالة المستقرة للجذور المشاركة في العملية.

اعتمادًا على التطبيقات المحتملة للعينة المدروسة، يمكن استخدام TRAP أو TAR. إذا تمت إضافة المركب الفينولي في مشروب معين (أو زيت) لتحسين ثباته، فمن المهم معرفة قيمة TRAP للمركب الفينولي المتضمن في العينة. ومع ذلك، إذا كان هذا المركب يعمل كجهاز التقاط جذري في النظم البيولوجية، فيجب أن يؤخذ في الاعتبار تفاعله مع $ROO \cdot (TAR)$.

6-II اختبار CUPRAC

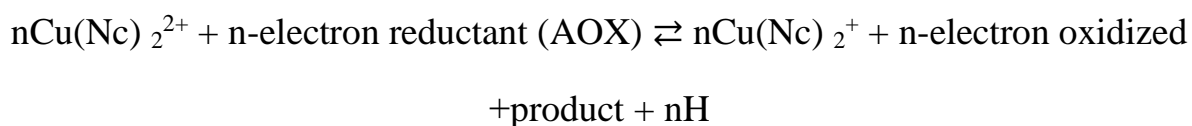
تم تصميم مقايصة CUPRAC لتحديد السعة الإجمالية لمضادات الأكسدة في أوائل القرن الحادي والعشرين [60]، ولكن تم تعديلها بالفعل لطرق مختلفة لقياس نشاط مضادات الأكسدة بناءً على اختزال النحاسي (Cu^{2+}) إلى نحاسي (Cu^+). على غرار المقاسات الأخرى، يتم استخدام ليجند لتكوين مركب ليجند نحاسي لتسهيل قياس الامتصاص، نيكروبين NC؛ (9،2-ثنائي ميثيل-1،10-فينانثرولين) هو الليجند المستخدم بشكل شائع في اختبار CUPRAC، تم تطبيق هذه الطريقة على العديد من المصفوفات التي تحتوي على مضادات الأكسدة المحبة للدهون والماء.

يمكن استخدام هذه الطريقة لتحديد قدرة مضادات الأكسدة لمكونات الغذاء بواسطة كاشف neocuproine - Cu^{2+} كعامل مؤكسد كروموجينيك. يؤدي تقليل Cu^{2+} في وجود النيوكوبروين بواسطة عامل الاختزال إلى إنتاج مركب Cu^+ مع ذروة امتصاص قصوى عند 450 nm.



الشكل (II-6): مخطط التفاعل المتضمن في مقايسة الطاقة المضادة للأكسدة الخافضة النحاسية [60] (CUPRAC)

يتفاعل كاشف الأكسدة الكروموجينيك لمقايسة CUPRAC ، $\text{Cu}^{2+} - \text{Nc}$ ، مع المواد المضادة للأكسدة التي تقلل من الالكترن (AOX)، كما هو موضح في المعادلة التالية:



في هذا الاختبار المختزل، تتأكسد مجموعات Ar-OH التفاعلية من البوليفينول ومضادات الأكسدة الأخرى إلى الكينونات المقابلة ويتم تحويل $\text{Cu}^{2+} - \text{neocuproine}$ إلى مركب $\text{Cu}^+ - \text{neocuproine}$ والذي يتم تلوينه بشكل مكثف باللون الأصفر البرتقالي. وتجدر الإشارة إلى أن المؤكسد الحقيقي هو نوع $\text{Cu}(\text{Nc})_2^{2+}$ وليس Cu^{2+} وحده، حيث أن احتمالية الأكسدة القياسية للزوجين $\text{Nc} - (\text{II} / \text{I})$ هي: (0.6 V) ، وهي أعلى بكثير من تلك الخاصة بالزوجين غير المعقدين $\text{Cu}^{2+} / \text{Cu}^+$ (0.17 V). [9]

تحتوي مضادات الأكسدة الرئيسية في المواد الغذائية والمركبات البيولوجية على إمكانية الأكسدة والاختزال المقابلة لنطاق (0.6-0.2 V)، وفقاً لزوج الأكسدة والاختزال Cu (II / I) -Nc .

مع الأخذ في الاعتبار الارتباط الإيجابي للحالة النحاسية مع النيوكوبروين، فإن كمية منتج chromophore التي تحدث في نهاية التفاعل تساوي تلك الخاصة بـ Cu (II) -Nc. يتم تخزين البروتونات المحررة في محلول يحتوي على أسيتات الأمونيوم، مع درجة حموضة 7.0. هذا الرقم الهيدروجيني هو الأمثل لمقايصة CUPRAC لأنه قريب جداً من درجة الحموضة الفسيولوجية (7.4).

بالنسبة لبعض المركبات المحددة، بما في ذلك إبيكاتشين جالات، وحمض روزمارينيك، وكيرسيتين، وإبيغالوكاتشين، وكاتشين، وحمض الكافيين الحمضي، وإبيكاتشين، وغالليك، وروتين، وحمض الكلوروجينيك. [61.62] لوحظت أفضل القدرات المضادة للأكسدة باستخدام طريقة CUPRAC كان هذا ممكناً لأن النقل الأمثل للإلكترونات يعتمد على عدد واتجاه مجموعات الهيدروكسيل وأيضاً على درجة اقتران الجزيء بأكمله. [63]

على الرغم من حقيقة أن هناك مشتقات أخرى من الفينانترولين يمكن أن تثبت بشكل انتقائي أيون النحاس بالنسبة إلى أيون Cu_2^+ ، من بينها-BCS (2,9-diméthyl-4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline disulfonic acide) [64] وحمض البيسينكونينييك

(BCA : 2-(4-carboxyquinolin-2-yl) chinolin-4-carboxylic acide). [65]

يستخدم neocuproin فقط باعتباره ينجداً أولياً لفحص CUPRAC على نطاق واسع في قياس قدرة مضادات الأكسدة. من الجدير بالذكر أن BCS و BCA لهما عيوب خاصة بالمقارنة مع Nc. بادئ ذي بدء، نظراً لوجود مجموعات السلفونات السالبة الشحنة على حلقة الفينانترولين، فإن مركب- Cu (I) BCS له شحنة عالمية أعلى من مركب Cu (I) -Nc. تسبب تفاعلات أيون-ديبول مع جزيئات الماء تفاعلاً عكسياً متناسباً بين الشحنة الموجودة على حامل الكروم وتقاربها للطرد كاره للماء لذلك، فإن Cu (I) -BCS سيكون له بلا شك نفاذية أقل للغشاء، وهذا هو السبب في أنه سيتم استخدامه بشكل أقل تواتراً ككاشف TAC في المذيبات غير القطبية مقارنة بالنحاس -Nc.

من حيث حركية التفاعل للمركبات المضادة للأكسدة في البلازما المحبة للدهون (على سبيل المثال، كاروتين، ألفا توكوفيرول)، من *Çelik et al (2012)*، لا يمكن مقارنة اختبار Cu (I) -BCS عملياً بمقاييس CUPRAC .

Zhou et al (2012) أظهروا أن إمكانية الاختزال للزوجين Cu (I,II)-BCS لها قيمة

$E^{\circ} = 0.844 \text{ V}$ [66] أعلى قليلاً من تلك الخاصة بكواشف ET الأكثر شيوعاً. هذا يمكن أن يؤثر سلباً على انتقائية المواد المضادة للأكسدة الحقيقية.

من ناحية أخرى، حتى لو كان BCA له طول موجي أعلى من أقصى امتصاص، والذي يبدو أنه مفيد (558 nm)، مقارنة بـ NC لمركبها النحاسي (الذي يسمح بإزالة لون الخلفية من معظم أصباغ النبات)، فقد لاحظوا أنه أثناء إجراء اختبار BCA، لا يمكن الحفاظ على تركيز الأيونات النحاسية الحرة بشكل زائد. [67]

إضافة على ذلك، تم الإبلاغ عن أن النتائج التي تم الحصول عليها من قياسات تقليل الأيونات النحاسية في المختبر (Cu^{2+}) قد يتم تمديدها بشكل أكثر كفاءة إلى المستوى الممكن. تفاعلات الجسم الحي لمضادات الأكسدة.

يتم إجراء تفاعل الأكسدة والاختزال الكروموجيني CUPRAC عند $\text{PH}=7.0$ قريبة من الرقم الهيدروجيني الفسيولوجي، والذي تبلغ قيمته 7.4. قد يختلف وقت رد الفعل حتى الاكتمال بين (30 و 60 min)، اعتماداً على مدى سرعة مضادات الأكسدة، على سبيل المثال، قد تتطلب جليكوسيدات الفلافونويد تحلاً مائياً أولاً لتسليط الضوء بشكل كامل على قدرتها المضادة للأكسدة.

تم تعديل اختبار CUPRAC الأصلي ليشمل عينات مختلفة في تطبيقات متنوعة، على سبيل المثال، تم استخدام بيئة الأسيون / الماء، بمساعدة methyl- β -cyclodextrine، لتحديد مضادات الأكسدة المحبة للماء ومحبة للدهون في نفس الوقت. [68] من أجل تقييم مضادات الأكسدة الفينولية في الأشكال الحرة، وكذلك في الأشكال المقيدة في مصفوفة الغذاء دون الاستخراج الأولي وتقليل عملية التحلل المائي المعقدة، تم تقديم اقتراح لإذابة مضادات الأكسدة المرتبطة بكاشف CUPRAC بقوة، والتي لها

مزايا باعتبارها نتيجة لظاهرة التفاعل السطحي بين المادة الصلبة (مضادات الأكسدة المرتبطة) و(المادة السائل كاشف CUPRAC القابل للذوبان). [69]

تم اقتراح هذه الطريقة المعدلة على أنها قابلة للتطبيق على مصفوفات الأغذية غير القابلة للذوبان نسبياً، وكذلك منتجات التجميل غير القابلة للذوبان، مثل الكريمات والبلسم والمساحيق.

في اختبار CUPRAC معدل آخر، تم تعديل مستشعر بصري لاحتواء كاشف الأكسدة والاختزال الكروموجينيك المعطل لقياس قوة الاختزال لعينات السائل دون أي معالجة مسبقة. [62] تم تجميد كاشف CUPRAC Cu^{2+} -neocuproin على فيلم Nafion المتغير الكاتيوني، وتم تقليل المركب بواسطة مضادات الأكسدة إلى Cu^{+} -neocuproin، مما أسفر عن تعديلات على الامتصاص عند (450 nm)، والتي تمت مراقبتها بطريقة طيفية، استخدمت نسخة أخرى من المستشعر البصري المساعدة في اختبار CUPRAC مقياس طيف انعكاس مصغر لقياس تغيرات الانعكاس عند 530nm بدلاً من الامتصاص. [71]

تم اقتراح استخدام المستشعر البصري لتبسيط العملية إلى حد كبير، حيث إنه موثوق وقوي، وبالتالي فهو قادر على السماح بتقدير في الموقع للقدرة المضادة للأكسدة لمختلف المستخلصات الغذائية والعينات البيولوجية.

تم تحليل اختبار CUPRAC ، جنباً إلى جنب مع تعديلاته للقياسات التي تهدف إلى القضاء على الأنواع التفاعلية من الأكسجين، وتم إبراز مزايا معينة مقارنة بالمقاسات الأخرى المستندة إلى ET ، في تحليل شامل أجراه *Özyürek et al (2011)*. [72]

كاشف CUPRAC سريع بما يكفي لأكسدة مضادات الأكسدة من نوع الثيول، بينما لا تسمح مقاسات ET الأخرى القائمة على Fe (III)، مثل طريقة FRAP، بقياس بعض مضادات الأكسدة الثيول، مثل الجلوتاثيون، قد يكون السبب في ذلك هو الهيكل الإلكتروني لـ Cu (II) الذي يتيح الحركة السريعة.

II -7- اختبار ORAC :

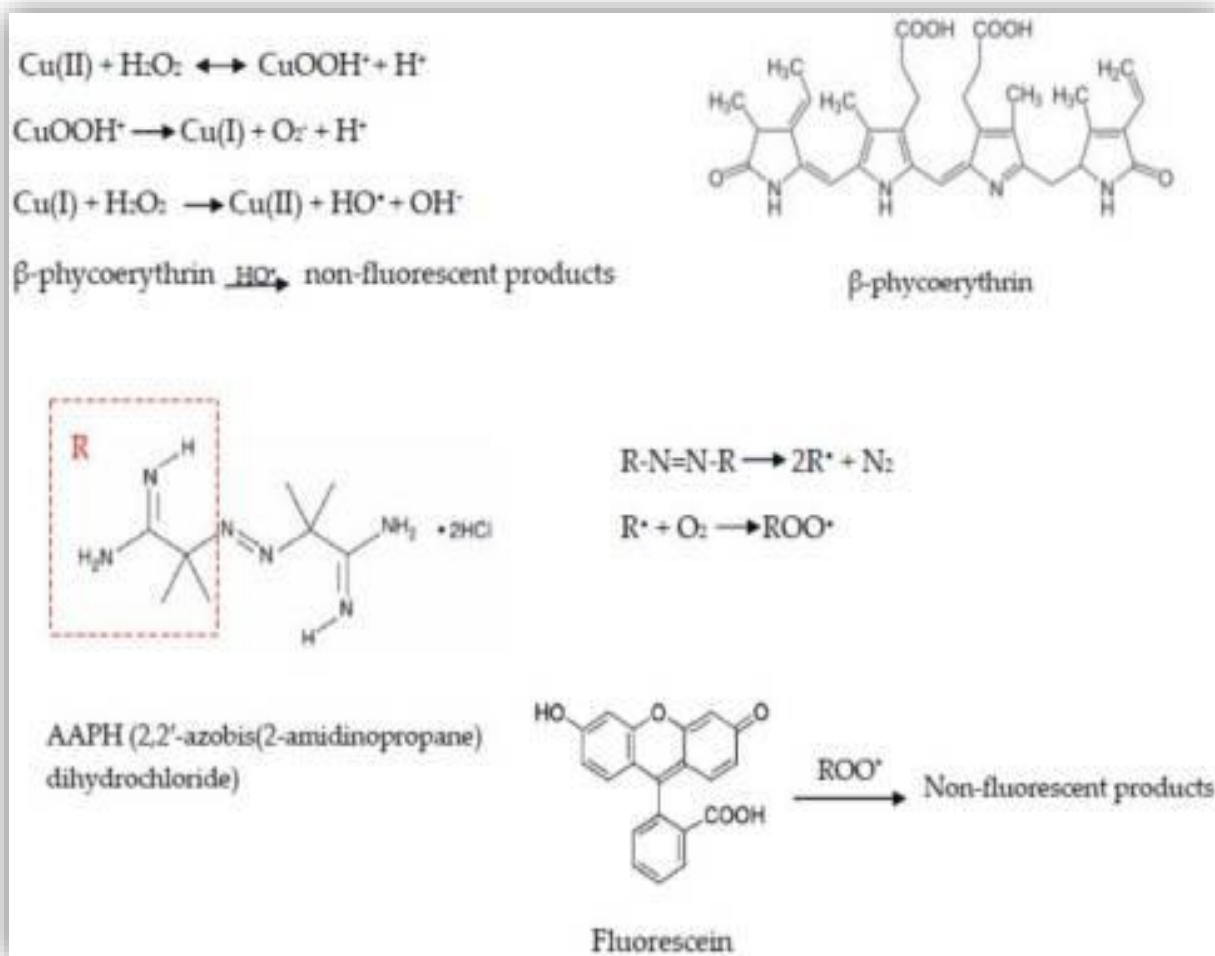
يقيس اختبار ORAC قدرة الانقسام للتفاعل المتسلسل الجذري بواسطة مضادات الأكسدة من خلال مراقبة تثبيط أكسدة جذور البيروكسيل، تتميز جذور البيروكسيل بالجذور الحرة التي تسود في أكسدة الدهون

في النظم البيولوجية وكذلك في المواد الغذائية، في ظل الظروف الفسيولوجية، نتيجة لذلك، يتم تقدير قيم ORAC من قبل بعض الباحثين باعتبارها ذات صلة بيولوجيًا، وهي معيار لكفاءة مضادات الأكسدة. [73]

يتم تمثيل مولدات جذور البيروكسيل شائعة الاستخدام في هذا الاختبار بمركبات الآزو، بما في ذلك المحبة للدهون α ، α ، -azobisisobutyronitril (ABIN)، 2,2-azobis (2-amidino propane)، الكلوريد (ABAP) (2,4-dimethyl valeronyl azobis (2,2'-azobis (2,4-dimethyl valeronyl azobis (2,2'-azobis (2-amidino propane) والمحببة للماء (AMVN) الكلوريد (AAPH) 2,2'-azobis (2-amidino propane) ثنائي هيدروكلوريد (AAPH).

وفقًا لهذا الاختبار، يتفاعل شق البيروكسيل المنبعث من المولد مع عينة الفلورسنت، وتستخدم هذه الطريقة كتقنية للمنطقة السفلية في وجود مضادات الأكسدة وغيابها، كمركب مرجعي، يتم استخدام أحد مضادات الأكسدة القياسية، عادةً trolox، ويتم وصف قيم ORAC لمضادات الأكسدة التي تم تقييمها على أنها مكافئة لـ trolox. يصف اختبار ORAC قدرة مضادات الأكسدة على إنتاج ذرة الهيدروجين، وبالتالي فهو اختبار يعتمد على HAT من أجل تحسين الطريقة، تم تطوير مقاييس عالية الإنتاجية باستخدام نظام معالجة سائل متعدد القنوات مقترن بقارئ مضان صفيحة ميكروسكوبية. [74]

يستخدم نظام $H_2O_2 - CuSO_4$ عمومًا كمولد جذري للهيدروكسيل وبيتا فيكويريثرين يستخدم كبروتين كمؤشر فلوري حساس للاختزال، يتم قياس اضمحلاله في المحلول في وجود كاسحات الجذور الحرة، باستخدام ترولوكس كمعيار، في الخطوة الأولى، يؤدي تعقيد النحاس (II) بواسطة H_2O_2 إلى تكوين هيدروبيروكسيد النحاس (II)، هذا الأخير يعاني من التحلل أحادي الجزيئي في الخطوة البطيئة لتشكيل $Cu(I)$ و O_2^- ، في حالة عدم وجود مانحين لذرة الهيدروجين، قد يكون الانقسام المتماثل لرابطة $Cu-O$ هو المسار المفضل لتحلل $CuOOH^+$ في المعادلة التالية، يتفاعل $Cu(I)$ مع H_2O_2 لتكوين شق هيدروكسيل حر.



الشكل (7-II): مخططات التفاعل المشاركة في مقايضة قدرة امتصاص الأوكسجين الجذري (ORAC) للكشف عن جذور الهيدروكسيل والبيروكسيل. [74]

مركب azo AAPH هو أكثر مولدات جذور البيروكسيل استخدامًا في الأنظمة المحبة للماء، باستخدام مسبار الفلورسنت β -phycoerythrin أو الفلوريسين مؤخرًا وهكذا تتشكل جذور البيروكسيل عن طريق التحلل الحراري لـ AAPH، مما يعطي شق ألكيل يتفاعل مع الأوكسجين الجزيئي لإعطاء شق بيروكسيل، مع الأخذ في الاعتبار حقيقة أن توليد جذور البيروكسيل يتأثر بدرجة الحرارة، فإنه يعتبر أحد العوامل الرئيسية التي تتداخل مع النتائج، يمكن أن تؤدي الاختلافات الصغيرة في درجة الحرارة في الآبار الخارجية للصفحة إلى تقليل إمكانية تكرار نتائج الفحص وبالتالي، من الأهمية بمكان مراقبة درجة الحرارة وضبطها

أثناء الفحص ومع ذلك، تم علاج المشكلة عن طريق تطوير قارئات ميكروبيلايت الفلوريسنت الآلية المزودة بحاضنة. [75]

تم وصف واقتراح سلسلة من المواد الفلورية كعينات في اختبار ORAC في البداية، تم استخدام البروتين المعزول من *Porphyridium cruentum* ، β -phycoerythrin ، كمسبار فلوري، والذي يتفاعل مع \cdot ROO لتشكيل منتج غير فلوري ومع ذلك، فإن استخدام β -phycoerythrin في مقاسات مضادات الأكسدة له عيوب لبعض الأسباب:

β -phycoerythrin له تنوع كبير في التفاعل مع \cdot ROO ، مما يؤدي إلى عدم تناسق في نتائج الفحص.

β -phycoerythrin يصبح مبييضًا ضوئيًا بعد التعرض لتفاعل ضوء الإثارة مع البوليفينول بواسطة ارتباط غير محدد بالبروتين. [74]

تم تحديد عينات بديلة خالية من البروتين الاصطناعي على أنها بدائل β -phycoerythrin ، من بينها الفلوريسين هو العينة الفلورية الأكثر استخدامًا لاختبار ORAC في العقود الأخيرة، على الرغم من ذلك، فقد تبين أن الفلوريسين يخضع لفقدان مضان غير مرغوب فيه وتفاعلات ثانوية، [75] وتم اقتراح جزيئات فلورية جديدة، تم استخدام الفسفور الأزرق النيلي كعينة بديلة لتحديد قيم ORAC في عصائر الفاكهة والنبيد، وكانت القيم المتحصل عليها متوافقة مع نتائج طريقة فولوسين. [76]

Nkhili et al (2011) ذكر أنه من الضروري الاستمرار في تغيير طريقة ORAC لإزالة تأثير الأيونات المعدنية في أنظمة الاختبار على قيم ORAC المقاسة للمركبات المضادة للأكسدة، قد يؤدي ذلك إلى تكوين مجموعات معقدة مع الأيونات المعدنية ، مما يؤدي إلى التقليل من قدرتها على تحييد جذور البيروكسيل، قد يكون حمض إيثيلين أمينيترا أسيتيك (EDTA) مفيدًا لتخفيف التداخلات وفي هذا الصدد تم الإبلاغ عن قيم ORAC أعلى بشكل ملحوظ عند استخدام EDTA. [77]

في الختام يقيس هذا الاختبار التحلل التأكسدي للفلوريسنت، *c-cyclodextrin* أو جزيء الفلوريسين، بعد إضافة مولدات الجذور الحرة، على سبيل المثال، مركبات البادئ *azo* تنتج البادئات *Azo ROO* عن طريق التسخين، مما يضر بجزيء الفلوريسنت، مما يؤدي إلى فقدان التآلق مع استمرار التتس

التأكسدي، تنخفض شدة الفلورسنت، ويتم تسجيل هذه الشدة في أغلب الأحيان لمدة نصف ساعة بعد إضافة البادئ azo كمولد للجذور الحرة، تحمي مضادات الأكسدة الجزيء الفلوري من التتس التأكسدي، حيث يتم قياس درجة الحماية باستخدام مقياس التألّق حاليًا، غالبًا ما يستخدم الفلورسين كمسبار فلوري، تتوفر معدات القياس التي يمكنها حساب السعة تلقائيًا تجاريًا.

الفصل الثالث

III - الكيمياء الكهربائية :

الكيمياء الكهربائية هي فرع من فروع العلم الذي يبحث في التغيرات الفيزيائية والكيميائية الناتجة عن تفاعل المادة مع العوامل الكهربائية مثل التيار والجهد وشحنة الإلكترون. تعتمد الكيمياء التحليلية على قياس الخواص الكهربائية للمحلول التي تحتوي على مواد تحليلية والتحول إلى القياس الكمي باستخدام الإشارات الكهربائية المقاسة ومجموعة من الطرق الكهروكيميائية. إضافة على ذلك، تعتمد طرق القياس التحليلي على نقطتين أساسيتين: قياس الجهد (طرق ثابتة) وقوة الجهد (طرق ديناميكية). يتم غمر أنظمة القطب في كلتا الطريقتين في المحلول الذي يحتوي على المادة التحليلية، والتي تسمى الخلية الكهروكيميائية. تُستخدم طرق الجهد الكبدي على نطاق واسع للتحليل الروتيني لأنها أقل تكلفة، وحساسية عالية، وانتقائية ولها مجالات تطبيق محتملة أوسع من طرق التحليل الكهربائي الأخرى. المبدأ الأساسي لهذه الطرق هو قياس التيار الذي يحدث أثناء أكسدة أو اختزال المادة المحللة في التفاعل الكيميائي.

بدأت الأساليب الكهروكيميائية مع الكيميائي التشيكي ياروسلاف هيروفسكي، واكتشاف أساس علم الاستقطاب في عام 1922 واحتلت مكاناً مهماً بين الأساليب التحليلية. على وجه الخصوص، منذ الثمانينيات، أصبح من الممكن تطوير أقطاب كهربائية تم تعديلها ميكانيكياً أو كيميائياً باستخدام التكنولوجيا المحسنة. في عمليات التعديل، تم استخدام البوليمرات، الروابط العضوية، الطين غير العضوي، الفثالوسيانين والجسيمات النانوية بشكل شائع للكشف عن المواد النشطة كهربياً في عينات معقدة الحجم صغيرة جداً مثل الأجسام البيولوجية والبيئية والبشرية. في العشرين سنة الماضية، حتى الكميات الصغيرة جداً من المواد النشطة كهربياً تم تحليلها أيضاً بدقة عالية، انتقائية بالطرق الكهروكيميائية باستخدام أقطاب كربونية أو معدلة لها خصائص رائعة. لطرق التحليل الكهربائي أيضاً مكاناً مهماً في القياس الكمي وكذلك في الحصول على تفاصيل مثل التحديد والامتصاص ومعدل التفاعل وثوابت التوازن لعدد الإلكترونات المنقولة في تفاعلات إلكترونية أو الأوكسدة. باختصار، توفر طرق التحليل الكهربائي تفاصيل عن التحليل الكمي والنوعي المباشر أو غير المباشر لأنواع النشطة كهربياً مثل مضادات الأوكسدة والأدوية ومبيدات الآفات وما إلى ذلك. [78]

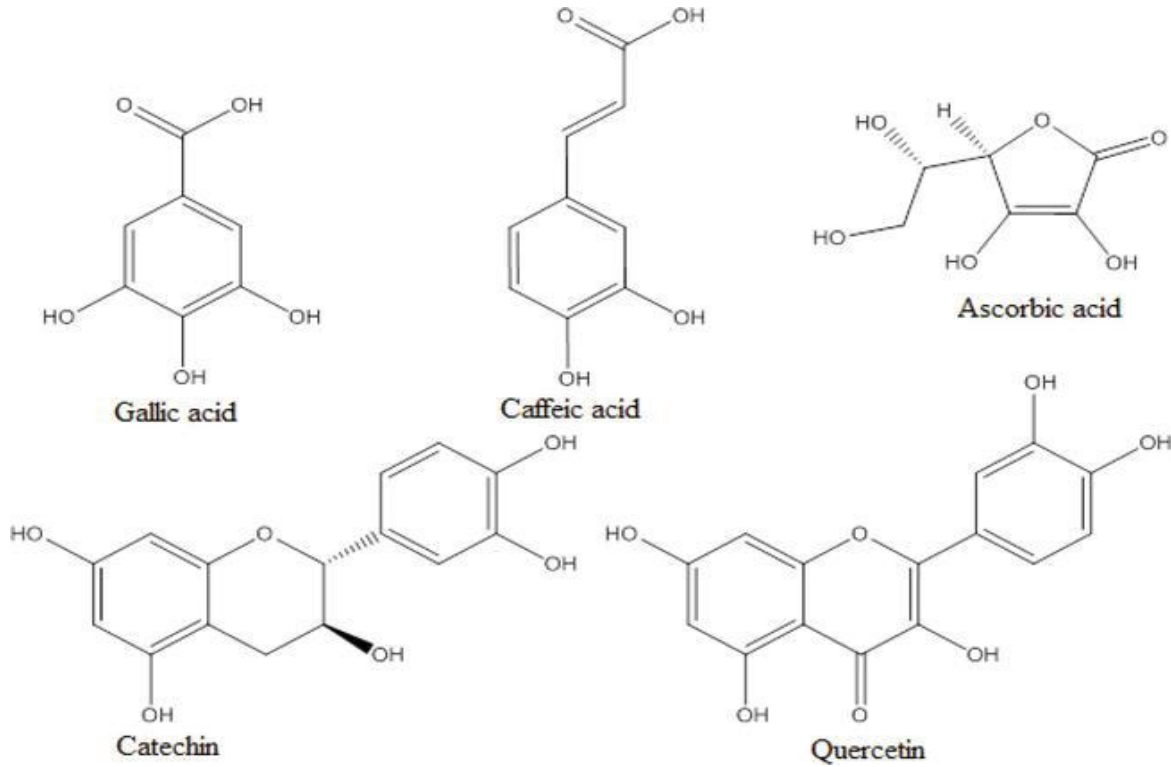
III-1- تطبيق الفولتا متر لتحديد قدرة مضادات الأكسدة :

قياس الجهد هو اختبار جهد يعتمد على تسجيل تيار الذروة في تباين محتمل محكوم بالأكسدة أو الاختزال والذي يتيح التحليل النوعي والكمي عن طريق التفاعلات الكهروكيميائية، على مدى العقدتين الماضيين مقارنة بتقنيات التحليل الكهربائي الأخرى، كان قياس الفولتية فضولياً بشدة في جميع طرق التحليل الكهربائي نظراً لاستخدامها لتحليل العديد من المركبات عن طريق المسح الأنودي أو الكاثودي وللتحقق من الأساس المفاهيم للآلية الكهربائية. هناك أربع تقنيات قياس الفولتمتر بما في ذلك الدورية (CV)، والخطية (LSV)، والتفاضلية (DPV)، والمربع (SWV) تستخدم عادة لتحديد المركبات من النوع المضاد للأكسدة. [79]

تعد تقنيات الفولتمتر طريقة تحليلية بديلة، وقد ثبت أن لها ارتباطاً ممتازاً مقارنة بعملية تحليلية تقليدية أخرى، لفترة من الوقت لدراسة التيار المتردد في عينات الأطعمة والمشروبات المختلفة، يمكن أن تكون مفيدة لتوصيف مركبات الأنواع التي لها مساهمة أكبر في قدرة مضادات الأكسدة الموجودة للعينات الحقيقية من حيث الكمية والنوعية من خلال التحكم في إمكانات ذروة نصف الموجة، وتيار الذروة ورقم نقل الإلكترون في التفاعل، ترتبط قدرة مضادات الأكسدة بتيارات الذروة لأنواع الأكسدة التي تسببها مجموعات الهيدروكسيل (-OH) وتحتوي الأنواع المضادة للأكسدة على العديد من مجموعات الهيدروكسيل، عادة ما تعطي ذروة واسعة للأكسدة الكهربائية في نطاق (400-600) mV تعتمد على الرقم الهيدروجيني لذلك، تحتوي جميع المواد المضادة للأكسدة تقريباً على مركبات نشاط كهربى، وتوفر ذروة تيارها وإمكاناتها القصوى تفاصيل كمية ونوعية، على التوالي إضافة على ذلك، تسمح تقنيات الفولتمتر بالتحقيق في السلوك الكهروكيميائي للعوامل المضادة للأكسدة والتفاعل مع الأنواع المؤكسجة.

اكتسبت طرق الفولتمتر مكانة مهمة بين تحديدها القدرة المضادة للأكسدة في العقد الماضي، نظراً لتفوقهم الكبير، فقد انتشر استخدام العينات المعقدة مثل الأطعمة والمشروبات وانتشارها على نطاق واسع ومن بين هذه الطرق التحليلية الكهربائية، يعتبر تجريد الموجة المربعة، وتجريد النبضات المختلفة، وتقنيات القياس الفولتمتر الدوري هي الأكثر شيوعاً لتحليل مضادات الأكسدة بالدقة والدقة. من الماضي إلى هذه الأيام، المركبات المستخدمة كعوامل معيارية لتطور التيار المتردد من خلال الدراسات الطرق الكهروكيميائية هي الأبيجينين، وحمض الأسكربيك، والكافيين، والكاتشين، وكريسين الكلوروجينيك، وحمض الكومارين، والأوجينول، والفيسيتين، وحمض الغاليك، والكايمفيرول، واللوتولين، مورين، كيرسيتين، روتين، تي

ريسفيراترول، ترولوكس ومالفديف-3-جلوكوزيد، فقد فضل العلماء حامض الأسكوربيك وحمض الكافيين وحمض الغاليك والكاتشين والروتين والكيرسيتين والتي غالبًا ما تستخدم كمواد قياسية مضادة للأكسدة بسبب التوافر المفرط لهذه المواد في الطعام والشراب، يتم إعطاء التركيب الكيميائية لبعض جزيئات مضادات الأكسدة، في الشكل التالي :



الشكل (III-1): الصيغ الجزيئية لمضادات الأكسدة شائعة الاستخدام [79]

III-2- تحضیر العينات :

III-2-1 الأجهزة والأدوات والمواد المستعملة :

الأجهزة:

☞ جهاز (UV-Visible)

☞ جهاز حوض الأمواج فوق الصوتية

☞ الميزان التحليلي

☞ حمام مائي.

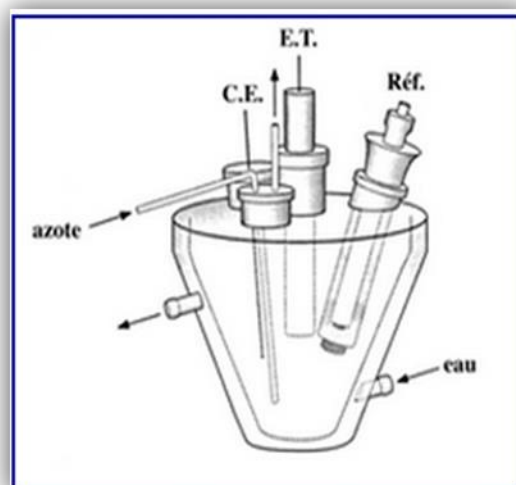
☞ تجرى الدراسة الكهروكيميائية للمستخلصات بواسطة التجهيز التالي:

☞ جهاز (VOLTALAP 40, 230 V)

▪ مرفق ببرنامج تشغيل VoltaMaster

▪ مرفق بخلية كهروكيميائية مصنوعة من الزجاج انظر الشكل (III-2)

▪ مرفق بثلاث أقطاب (III-2)



الشكل (III-2): الخلية الكهروكيميائية. [80]

الأقطاب:

☞ **القطب المرجعي:** هو القطب الكالومال المشبع بكلوريد البوتاسيوم (ECS) صنع (Radiometer Analytical SAS).

☞ **القطب المساعد:** له وظيفة وحيدة وهي إغلاق الدارة، وهو عبارة عن سلك من البلاتين قطره 0.5 سم، صنع (Radiometer Analytical SAS).

☞ **قطب العمل:** وهو عبارة عن اسطوانة من الكربون الزجاجي قطرها 3 ملم. يتم تنظيف هذا الأخير بعد كل عملية باستعمال ورق خاص «ECSCILG,P54» يحتوي على مادة كاشطة بعدها ينظف بالماء المقطر ثم بالأسيتون ويجفف بورق «JOSEPH»، صنع (Radiometer Analytical SAS) هو القطب الذي من خلاله تتم عليه تفاعلات الأكسدة والإرجاع.



الشكل (3-III) المساري على الترتيب ☞1☞ المسرى المرجعي☞2☞ المسرى المساعد ☞3☞ مسرى العمل [80]

الأدوات:

- ☞ بيشر (10-100 ml).
- ☞ ماصة مدرجة (5ml-10).
- ☞ زجاجة ساعة.
- ☞ أنبوب مدرج (25ml-250).
- ☞ ورق الترشيح.
- ☞ إجابة ماصة.
- ☞ حوض مائي
- ☞ قمع.
- ☞ مكروبيبات (FORTUNA) صنع (TRANFERPETT).

المواد الكيميائية المستعملة:

☞ ماء مكرر التقطير.

☞ الميثانول ($\text{CH}_3\text{-OH}$) ذو نقاوة (99%) إنتاج (BIOCHEM/CHEMOPHARMA).

☞ الكاشف فولين (Folin Ciocaltau) (Réactif de Folin Ciocaltau) (BIOCHEM (100%) ، ($3\text{H}_2\text{O}, \text{P}_2\text{O}_5, 13\text{WO}_3, 5\text{MoO}_3, 10\text{H}_2\text{O}$) (CHEMOPHARMA).

☞ كربونات الصوديوم (Na_2CO_3) ذات نقاوة (99%) إنتاج (MERCK).

☞ ثلاثي كلور الألمنيوم (AlCl_3) بنقاوة (99%) إنتاج (MERCK).

☞ حمض الغاليك ($(\text{OH})_3\text{C}_6\text{H}_2\text{COOH}, \text{H}_2\text{O}$) (acid gallique) ، (99%) إنتاج (PROLABO).

☞ حمض الأسكوربيك (acid ascorbic) ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) ، (99%) إنتاج (MERCK).

☞ الروتين ($\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$) (Rutin trihydraté) ، (97%) إنتاج (MERCK).

☞ الكرسيتين

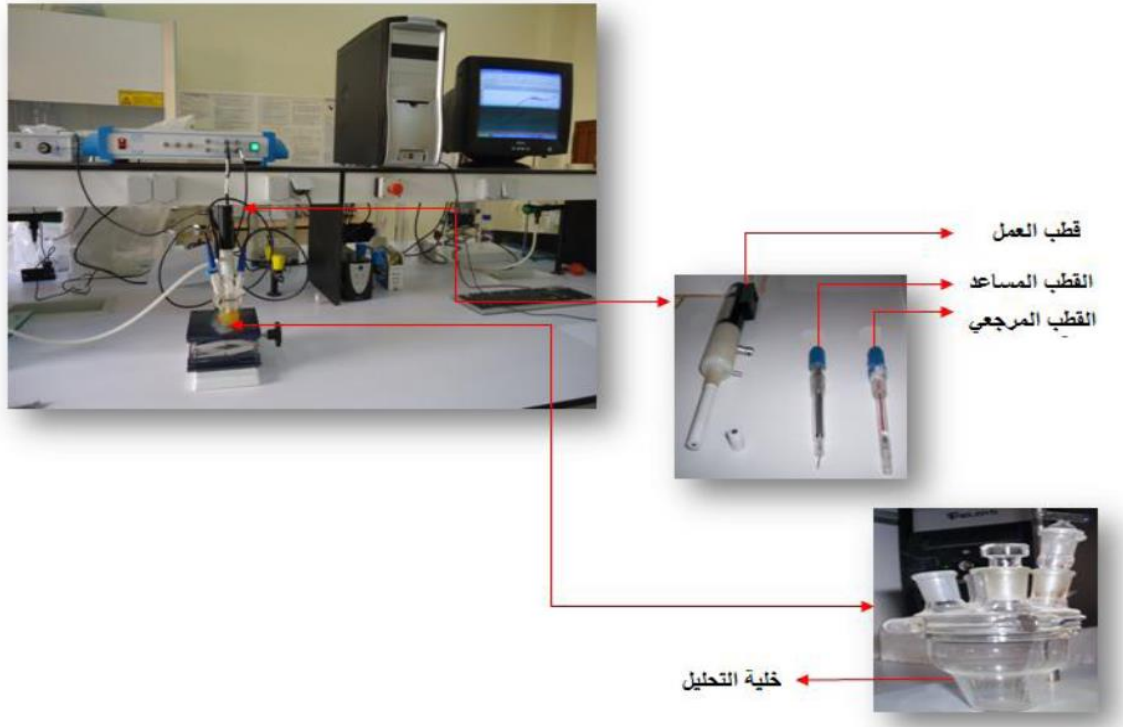
☞ (DPPH) ذو نقاوة (99%) إنتاج (MERCK).

☞ حمض الكبريتيك (Acid sulfurique).

☞ فوسفات الصوديوم ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) ذو نقاوة (99%) إنتاج (MERCK).

☞ موليبدات الامونيوم (molybdate d' ammonium).

☞ كلوريد البوتاسيوم (KCl) ذات نقاوة (99.8%) إنتاج (BIOCHEM [80].CHEMOPHARMA)

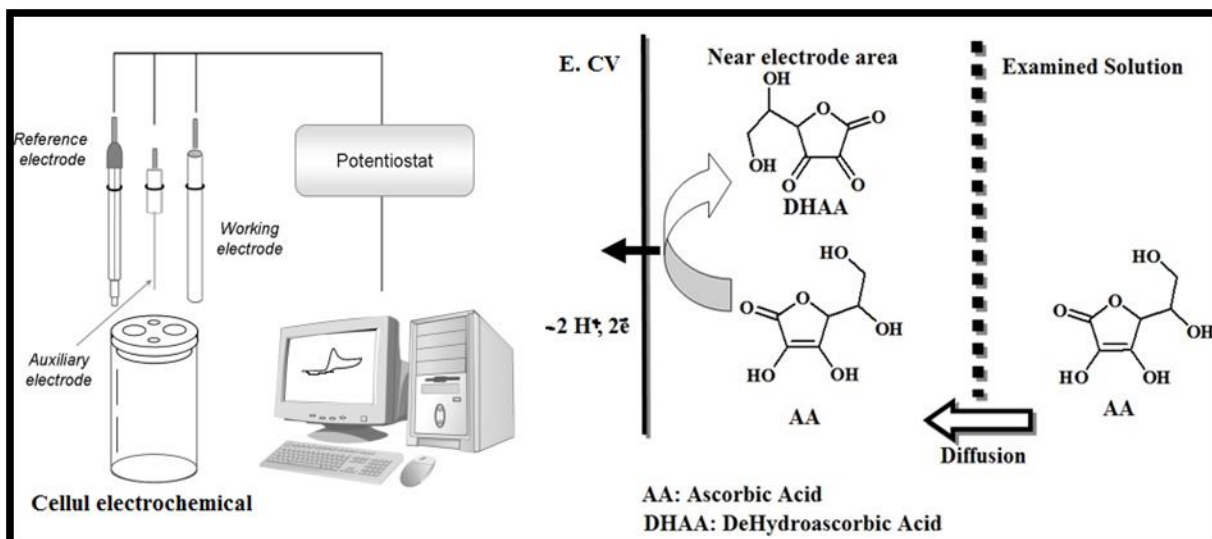


الشكل (4.III): الأجهزة المستعملة لجهاز (PGZ 301 OLTALAB 40). [80]

III-3- الطرق الكهروكيميائية :

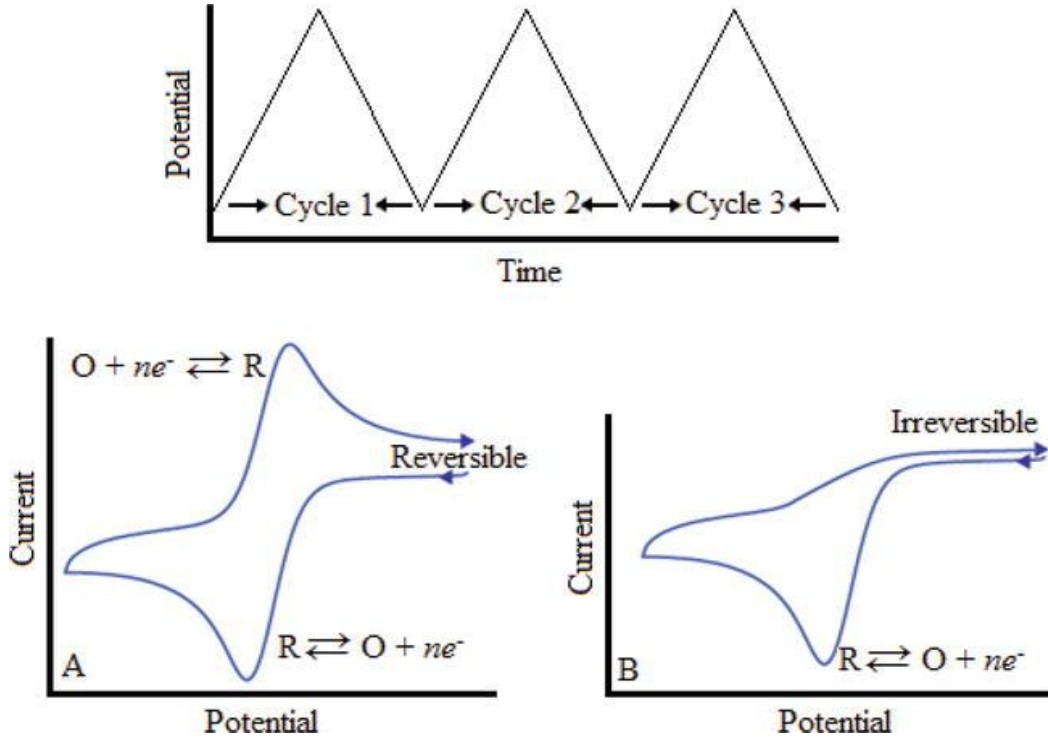
III-3-1- تقنية قياس الفولتميتر الدوري CV

عادة ما يكون قياس الفولتميتر الدوري (CV) هو أول تجربة في العملية الكهروكيميائية لمركب في المواد البيولوجية كعينات من الطبيعة للحصول على تفاصيل حول السلوكيات الكهربائية. على وجه الخصوص، لدراسة الديناميكا الحرارية، الحركية، نقل الإلكترون، نوع نقل المادة، وكذلك التحديدات الكمية لعمليات الأكسدة أو الاختزال يمكن إجراؤها بواسطة تقنية قياس الفولتميتر الدوري، بالإضافة إلى أخذ قياس واحد باستخدام الفولتا متري الدوري، يمكن إجراء قياسات متعددة متتابعة. التطبيقات الأكثر شيوعاً لقياس الفولتميتر الدوري هي البلمرة الكهربائية والتوصيف الكهروكيميائي وتصميم أنظمة التحليل الكهربائي المعدلة. [81]



الشكل (5.III): التركيب التجريبي للأجهزة المستعملة في الفولطأمبيرومتر الحلقي. [81]

يمكن الحصول على نوعين من الصور الفولتامتريّة الحلقية على أنها غير قابلة للعكس أو قابلة للعكس، اعتمادًا على المكونات الكيميائية للجزيئات المستهدفة، في قياس الجهد العكسي، يوجد فرق يبلغ حوالي 59 mV بين إمكانات ذروة الاختزال والأكسدة، الشكل (III-2):



الشكل (III-6): إشارة الإثارة المحتملة وفولتاموجرام لقياس الفولتمتر الدوري بالتفصيل [81]

خلال السنوات الماضية، تم استخدام مقياس الجهد الدوري كبديل للطرق الحالية لتقييم استشعار مضادات الأكسدة في العينات الطبيعية مثل الشاي والسوائل البيولوجية ونباتات عصائر المشروبات والأطعمة على أقطاب عمل مختلفة، المعلمة الأكثر استخدامًا هي ذروة التيار نظرًا لتناسبها مع تركيز مضادات الأكسدة، تم تفضيل الأقطاب الكهربائية العاملة القائمة على الكربون مثل قطب الكربون الزجاجي (GCE)، وقطب معجون الكربون (CPE)، وقطب الكربون المطبوع بالشاشة (SPCE)، والأقطاب الكهربائية المعدلة، (الجسيمات النانوية GCE / والجسيمات النانوية CPE / و Fe₃O₄ GCE) على نطاق واسع في القياسات الكهروكيميائية لتحليل القدرة الكلية المضادة للأكسدة (TAC) عادةً ما يتم الاهتمام بقيم الذروة

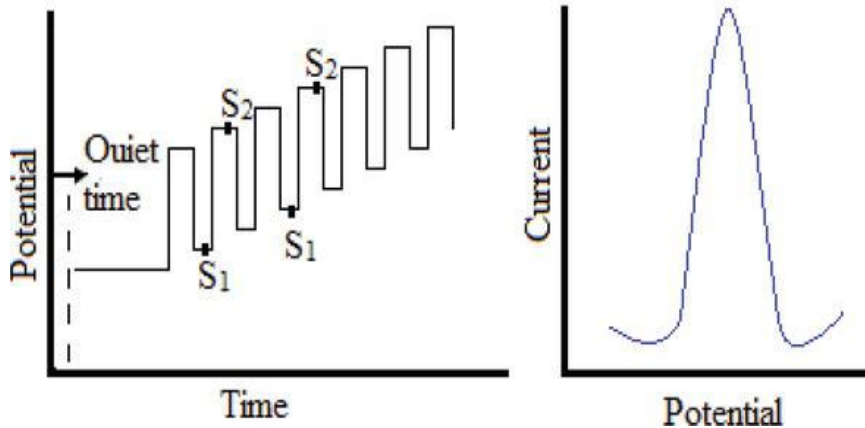
الحالية والقيم المحتملة للمواد القياسية مثل حمض الأسكوربيك وحمض الكافيين والكاتشين والكومارين وحمض الغاليك والمورين والكيرسيتين والروتين لتقييم TAC .

على الرغم من أن هاته الأخيرة تثير الشكوك حول الحساسية، إلا أنها تتمتع أيضًا بمزايا كبيرة، يتم تلخيص التطبيقات السريعة والبسيطة والمنخفضة التكلفة والتطبيق الأرخص والأسهل على أنها مزايا رائعة، تأثير التداخلات على قدرة مضادات الأكسدة بواسطة عامل غير مضاد للأكسدة لتقليل TAC وغير انتقائي لعائلة من الجزيئات بين الكاروتينات والبوليفينول ما لم يتم تعديل القطب الكهربائي.

على الرغم من كل هذه العيوب، تجذب طريقة الفولتميتر الدوري قدرًا كبيرًا من الاهتمام بين الأساليب التحليلية، كما يتم إجراء عدد كبير من الدراسات التي تتناول هاته الطريقة، يتم تلخيص جزء كبير من العمل المنجز حتى وقت اليوم لتحديد سعة مضادات الأكسدة بواسطة طريقة الفولتميتر الدوري.

III-3-2- تقنية الموجة المربعة الفولتميترية (SWV) :

يمكن استخدام قياس الجهد بالموجة المربعة (SWV) لإجراء تجربة أسرع من تقنيات القياس الفولتميتر الأخرى، عادة عندما تكون سرعات المسح لتقنيات أخرى من 1 إلى 10 mv/s أو أكثر، في قياس الجهد بالموجة المربعة، يتم استخدام سرعة المسح عند $1mv/s$ وبالتالي، يمكن تحليل الجزيء المستهدف بسرعة أكبر بواسطة SWS، يمكن أن يتحد مقياس الفولتميتر المربع مع تقنية التجريد، وهكذا تم تطوير تقنية تجريد الفولتميتر لتحديد المواد النشطة كهربيًا عند تمكين الحساسية العالية في مستويات التركيز فائقة التتبع، على وجه الخصوص، يمكن تحليل المواد المستهدفة فائقة التتبع في العينات المعقدة من خلال الجمع بين



شكل (III-7): إشارة الإثارة المحتملة وفولتموجرام لفصل الموجة المربعة الفولتميتر [82]

التقنية وعملية نزع التخصيب، مبدأ العمل لتقنية التجريد هو نفس مقياس الفولتميتر للموجة المربعة ويتم تطبيق معلمتين جديدتين فقط كوقت التراكم وإمكانية التراكم الشكل (III-7) :

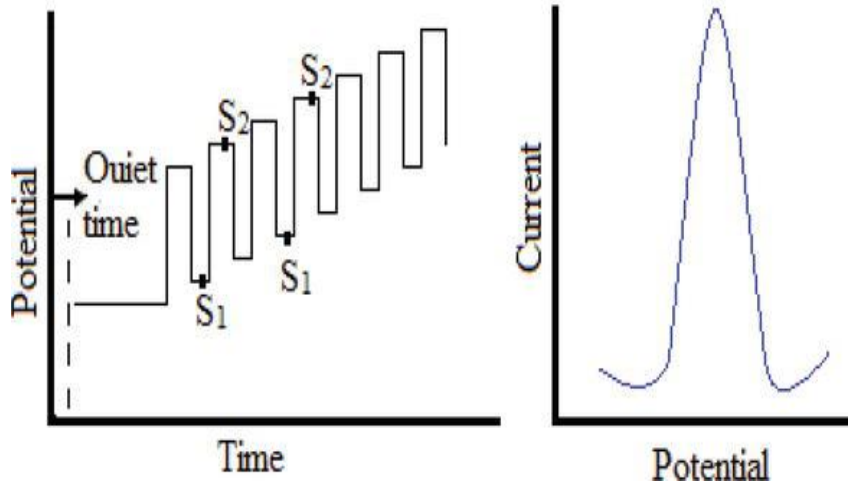
في الوقت الحاضر، كثيرًا ما يتم تطبيق SWV والموجة المربعة للتعرية الفولتميترية (SWSV) لاستنتاج مركبات مثل الأدوية والمعادن الثقيلة والمبيدات الحشرية ومضادات الأكسدة، وما إلى ذلك في أنواع عديدة من العينات لأنها تتمتع بحساسية تحليلية وانتقائية ممتازة، كما يمكن تطبيق SWV وتقنيته المشتركة المشتقة من أجل التحديد المتزامن للمركبات التي هي أكسدة قريبة أو إمكانات ذروة الاختزال مثل الباراسيتامول وحمض الأسكوربيك وحمض البوليك والدوبامين، في العقد الماضي، كانت SWV و SWSV أكثر فاعلية في تحديد المواد المضادة للأكسدة في عينات المراد تحليلها المعقدة وهي متفوقة مقارنة بالطرق التحليلية وخاصة القياس الطيفي لتقييم الكم والتأهيل، إنها واحدة من أهم طرق التحليل الكهربائي لتحديد مضادات الأكسدة لأن لها نطاق عمل واسع، وحدود اكتشاف منخفضة، وسهولة التطبيق، ورخيصة وغير معالجة.

[82]

III-3-3- تقنية النبض التفاضلي الفولتميتر (DPV) :

تعد تقنية قياس النبضات التفاضلية (DPV) واحدة من أكثر التقنيات المستخدمة على نطاق واسع لتحليل كل من الأنواع العضوية وغير العضوية تم اقتراح تقنيات قياس الجهد النبضي بواسطة Baker and Jenkin في عام 1952 كطريقة تحليل كهربائي للقياس أكثر حساسية، يمكن استخدام تقنيات قياس الفولتميتر النبضي التفاضلي لتحديد ما يصل إلى 10-8 م تركيز للعوامل المستهدفة، تيار الذروة (Ip) هو دالة للتركيز للأنواع النشطة كهربياً وهو خطي مثل $I_p = f(C)$ أيضاً، من الممكن تحليل المواد ليس فقط التحليل الكمي ولكن أيضاً التحليل النوعي بتقنية النبض، ترتبط تيارات الذروة بتركيز المادة بينما ترتبط قيم

الذروة المحتملة بالانتقائية، وهكذا، تمت دراسة التحديدات المتزامنة للمواد بواسطة DPV على أقطاب كهربائية عارية أو معدلة الشكل (III-4) :



الشكل (III-8): إشارة الإثارة المحتملة والفولتاموجرام للنضج التفاضلي تجريد الفولتمتر [83]

في الوقت الحاضر، يمكن العثور على الكثير من دراسات DPV للكشف عن المعادن الثقيلة والأدوية ومبيدات وعامل مضادات الأكسدة والأنواع العضوية / غير العضوية على العديد من أقطاب العمل العارية والمعدلة، إلى جانب ذلك، تعد DPV أحد أهم المرشحين لتحديد كمية التتبع للعوامل المستهدفة في الأساليب التحليلية نظرًا لحساسيتها العالية وانتقائية أيضًا، يمكن تطبيقه على العينات المعقدة مثل العينات البيولوجية والغذائية مثل الدم والمصل والمشروبات. على وجه الخصوص، يحتل DPV مكانة مهمة بين طرق تحديد مضادات الأكسدة بسبب هذه المزايا وتوافر التركيز المنخفض.

في السنوات الأخيرة، تم استخدام DPV بشكل متكرر في تحديد القدرة الإجمالية لمضادات الأكسدة دون أي معالجة مسبقة لعينات الطعام الصلبة والسائلة.

في تقنيات قياس التيار، يتم قياس التيار الناتج أثناء الاختزال أو الأكسدة لأنواع النشطة كهربيًا بقيمة محتملة ثابتة يتم تطبيقها بين قطب كهربائي عامل والكترود مرجعي، وبهذه الطريقة يتم توفير معرفة تحليلية كمية محددة للتحليل المستهدف، على وجه الخصوص، يتم استخدام مقياس التيار الكهربائي، الذي يعتمد على تحليل التيار الكهربائي، بشكل شائع في تطبيقات الرقابة الكهربائية الدقيقة نظرًا لحساسيته العالية،

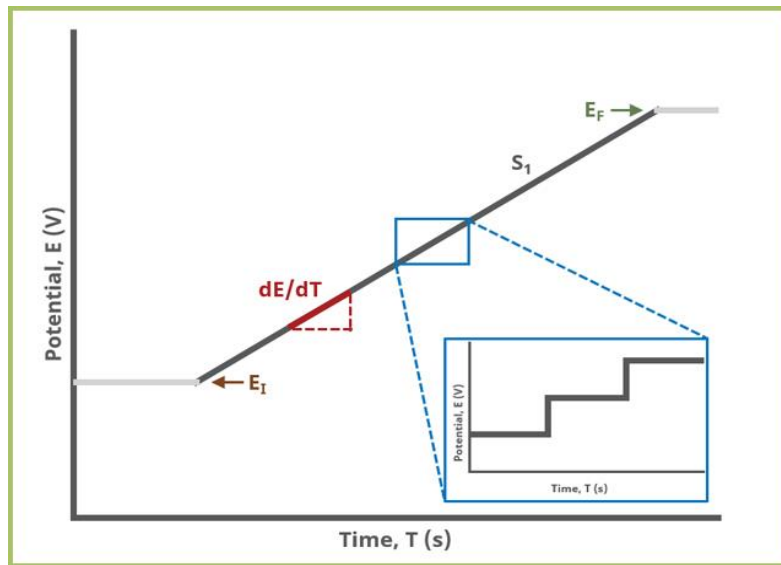
كما أنه يسمح بتحديد الأنواع النشطة التحليلية الكهربية دون اشتقاق، وتحقيق التنوع والانتقائية القابلة للتعديل. [83]

III-3-4-قياس الفولتمتر الخطي (LSV) :

مقياس الجهد الخطي (LSV) هو طريقة مسح فعالة أساسية. وهو مكافئ لتجربة قياس الفولتمتر الدوري من قطعة واحدة في LSV، يتم مسح جهد القطب العامل خطياً بين القيم النهائية والأولية ويتم قياس التيار كدالة للوقت، الناتج الأكثر شيوعاً من تجربة LSV هو التيار مقابل الجهد، ويسمى voltammogram [alert] في أبسط مستوياته الأساسية، يكتسح LSV الجهد مقابل القطب المرجعي في اتجاه واحد، غالباً من خلال الأنواع النشطة كهرياً E_0 ، مما يسمح بفحص الأنواع الكهروكيميائية الناتجة المتولدة على سطح القطب.

يوفر LSV معلومات نوعية وكمية حول الأنظمة الكهروكيميائية وقد أصبح راسخاً كأداة توصيف سريعة وموثوقة، غالباً ما يستخدم LSV لدراسة حركية تفاعلات نقل الإلكترون، بما في ذلك الحفز، وقد تم توسيعه لاستخدامه في التوليف العضوي وغير العضوي، وتقييم المستشعرات والنظام البيولوجي،

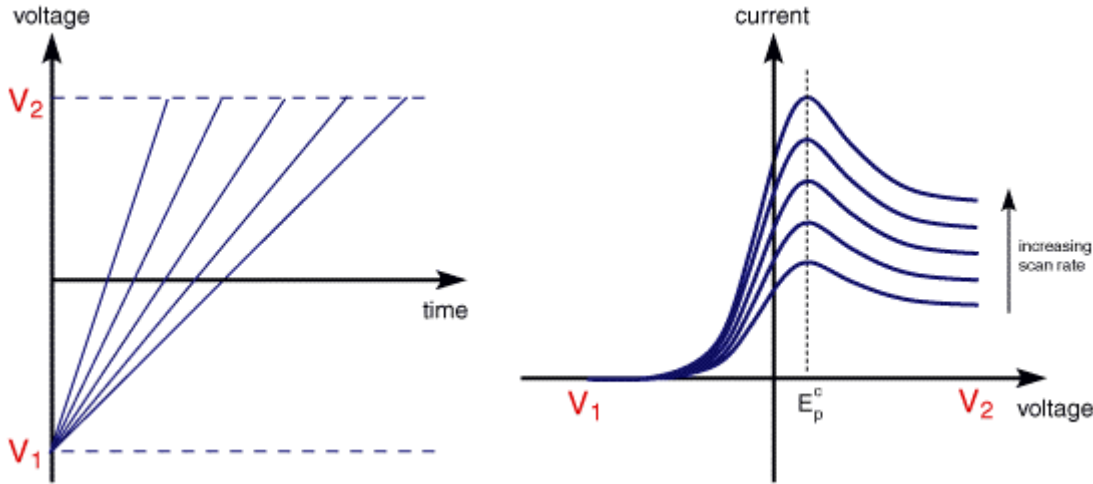
والميكانيكا الفيزيائية الأساسية لتفاعلات نقل الإلكترون، مثل الانعكاس، والإمكانات الرسمية، وتحديد معامل الانتشار. [84] في تجربة LSV، يتم اجتياح الإمكانات خطياً من تيار أخذ العينات الأولي إلى النهائي، على فترات زمنية محددة كما هو موضح في شكل (III-5):



شكل (III-9): قياس الفولتمتر الخطي (LSV) النموذج الموجي [84]

تعتمد خصائص الرسم الفولتموجرام للاكتساح الخطي المسجل على:

- معدل تفاعل (تفاعلات) نقل الإلكترون
- التفاعل الكيميائي للأنواع النشطة كهربياً.
- معدل مسح الجهد.



الشكل (III-10): منحنيات تمثل الأشكال الموجية المحتملة لاكتساح خطي ودوري الفولتميتريّة والفولتموجرام [84]

III-4- الدراسة الكهروكيميائية للكهروليت المساعد :

من أجل الحصول على وسط ناقل للكهرباء، نضيف أملاح خاصة يصعب أكسدة شواردتها السالبة وإرجاع شواردتها الموجبة، حيث يستعمل ملح كلوريد البوتاسيوم (KCl) ذات تركيز 0.1M كمادة كهروليتيّة، وتمّ الاختيار على أساس الخصائص التالية:

☞ ذوبانيته كبيرة في المذيبات المدروسة لضمان ناقلية كهربائية جيدة.

☞ يجب أن يكون تركيزه أكبر بـ 50 إلى 100 مرة من تركيز المواد الفعّالة المدروسة.

☞ يجب أن يكون محايداً كيميائياً عند درجة حرارة ثابتة.

☞ مجال الفعّالية للكهروليت المساعد يجب أن يكون واسعاً قدر الإمكان. [80]

III-4- المقارنة بين الطرق الكيميائية و الطرق الكهرو كيميائية :

من خلال دراستنا نستطيع أن نقول إن هناك فرق كبير بين الطرق الكهروكيميائية والطرق الكيميائية وهذا ما يشجع على التوجه نحو هذه الطريقة كطريقة تعطي نتائج سريعة وهذا يبقى محصور على مستوى الدراسات التي قمنا بتطلع عليها إلى أن يتم إجراء دراسات أخرى تساهم في تطوير وتأكيد النتائج المتحصل عليها، ونلخص المقارنة في الجدول اسفله:

الجدول(III-1): المقارنة بين الطرق الكيميائية والطرق الكهروكيميائية

الطرق الكيميائية (الكلاسيكية)	الطرق الكهروكيميائية (الحديثة)
<ul style="list-style-type: none"> • تستغرق مدة أطول. • تحتاج مواد كيميائية بكميات أكثر. • الدقة تصل لرتبة 10^{-4} كأقصى تقدير. • خطر التعرض للمواد الكيميائية كبير. • تكلفة نظرا لتعدد المواد الكيميائية المستخدمة. 	<ul style="list-style-type: none"> • تجربة سريعة. • كميات المواد الكيميائية المستعملة صغيرة جدا. • الدقة تصل لرتبة 10^{-9} في DPV و 10^{-12} في SWV. • صديقة للبيئة. • غير مكلفة.

الخلاصة

تعتبر مضادات الأكسدة الموجهة للاستهلاك البشري عن طريق مضافات غذائية أو مستحضرات صيدلانية أو تجميلية محل اهتمام العلماء بغية الحفاظ على الصحة العامة لتفادي مشكل الخطر الناتج عن الجذور الحرة $O\cdot$. كما ان مضادات الأكسدة المصنعة اثبتت فشلها مع مرور الوقت حيث أصبح العديد يلجأ للبحث عن مضادات الأكسدة الطبيعية

تمحورت هذه الدراسة حول قياس قدرة الفاعلية للمضادات الأكسدة المعروفة في الأوساط الغذائية وأوساط المجال الطبي (العلاج) لهذا كان الهدف من الدراسة هو تقدير مدى فاعلية مضادات الأكسدة بالطرق الكيميائية والكهروكيميائية وايهما الأكثر دقة .

دراسة فاعلية مضادات الأكسدة للمستخلصات الكيميائية بعدة طرق الكيميائية (التقليدية) والكهروكيميائية (الحديثة) .

من اهم الطرق الكيميائية التي تطرقنا اليها طريقة DPPH التي تمتلك أكبر قدرة لكبح الجذر الحر بطريقة أسرع لها نسبة نشاط عالية على جميع المستخلصات الكيميائية

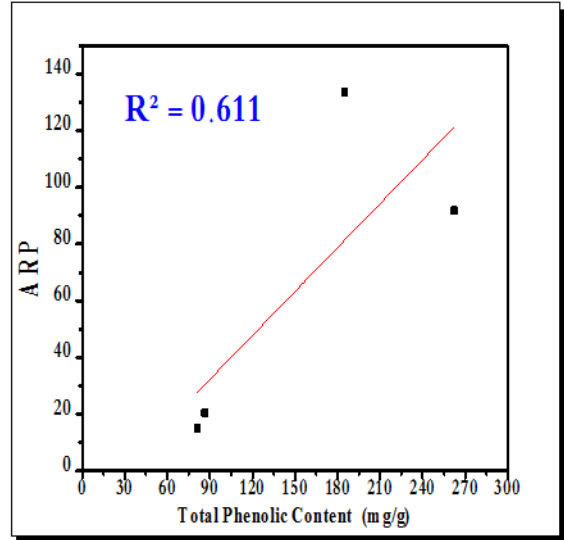
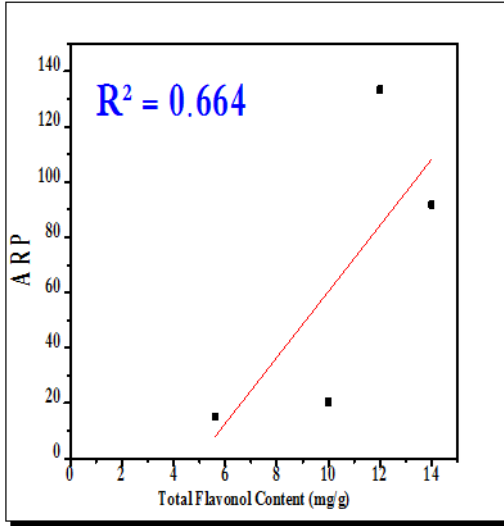
وفي الخطوة الأخيرة من هذا العمل تمت دراسة قياس مدى فاعلية قدرة المضادات الأكسدة لبعض المستخلصات الكيميائية بالطرق الكهرو كيميائية وبالمقارنة بينهما من حيث الجودة وطريقة العمل ومن حيث التكلفة والدقة تبين ان الاعتماد على الطرق الحديثة هو الأنجع والأدق تعبيرا حيث يكون لدينا معامل الارتباط في منحنى التعبير عن الجذور الحرة المستهلكة $R^2=0,999$ يقارب 1 بينما في الطرق التقليدية لا يمكن ربط ثلاث نقاط على استقامة واحدة ومعامل الارتباط لا تتجاوز قيمه $R^2 = (0.6 \quad 0.7)$ في كثير من الأحيان.

كما تعتبر كذلك الطرق الحديثة الكهرو كيميائية طرق صديقة البيئة (green chemistry) ودقيقة تصل دقتها الى 10^{-12} وغير مكلفة (تجهيزاتها بسيطة) ونتائجها سريعة .

الملاحق

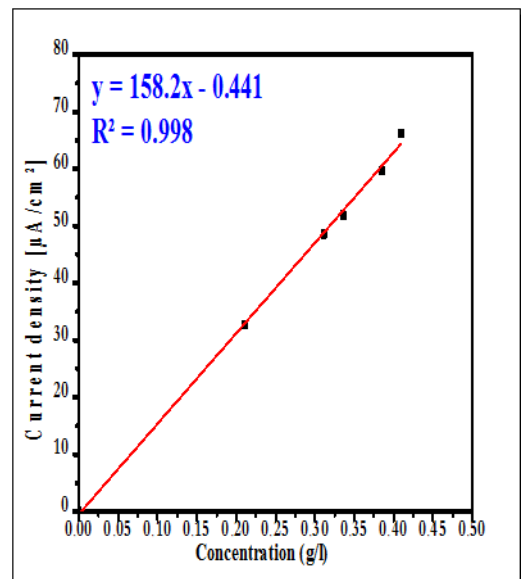
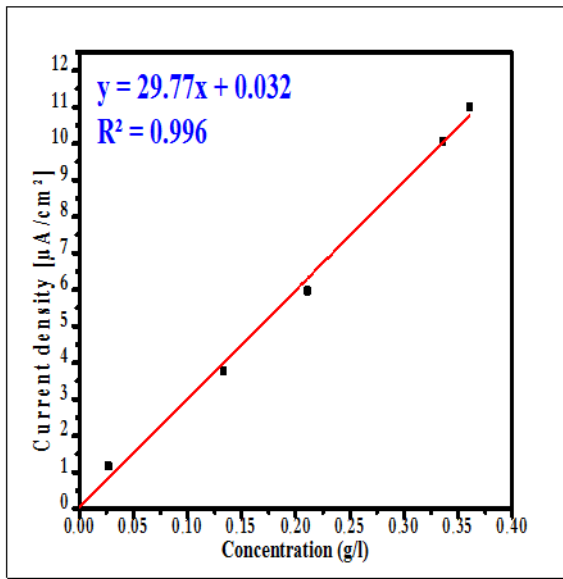
الملاحق

الملحق (1): منحنيات توضح علاقة الارتباط بين كمية الفينولات والفلافونول ونتائج اختبار القوة الفعالية المضادة للأوكسدة (DPPH) للمستخلصات عند IC_{50}



الملحق (2): المنحنى القياسي لـ GA الخاص بالفولتا أمبيرومترى الحلقي $I_a = F(C)$

الملحق (3): المنحنى القياسي لـ GA الخاص بالموجة المربعة $I_a = F(C)$



المراجع

مراجع باللغة العربية:

- 1 علم الوظائف الأعضاء التجريبي مكتبة واي على أنترنت 25 مارس 2009 على موقع واي باك منين
- 2 radical (free radical) PDF نسخة محفوظة 02 مارس 2017 على موقع واي باك مشين.
- 3 المجلة الدولية للدراسات الغذائية 2 أبريل 2013 جامعة أناند الزراعية المعهد المركزي للهندسة الزراعية (جامعة عمان الأهلية كلية تكنولوجيا تصنيع الأغذية والطاقة الحيوية ماجستير في تكنولوجيا)
- 4 معهد علم الوظائف للأعضاء والعلوم
- 5 الدكتور. ع. ع. سعيد كيمياء الجذور الحرة دار المسيرة للنشر والتوزيع والطباعة للأردن 2001 الطبعة الأولى ص 192
- 7 س.ه. باين، ج.ب. هندريكسون، د.ج. كرام، ج.س. هاموند الكيمياء العضوية المجلد الثاني الطبعة الرابعة 1995، الدار الدولية للنشر و التوزيع.
- الدكتور: س.ل. على " الأسس الإلكترونية لميكانيكية التفاعلات العضوية " الطبعة الأولى 2002 دار الفجر للنشر والتوزيع.
- 12 الدكتور: س.ع. المظفر، " الكيمياء الحياتية" الجزء الثاني 1981 France- Sima-Rotomage.
- 15 الدكتور. ب. كامل، الدكتور. ك. الركابي، " كيمياء الأغذية"، 1981، المكتبة الوطنية ببغداد.
- 17 مذكرة دكتوراه بن عشورة صبرينة البتول فاعلية المضادات الأوكسدة الزيوت الطيارة
- 18 قسم تصنيع الأغذية والتكنولوجيا ، جامعة بيلاسبور ، الهند
البريد الإلكتروني: anuj.0720@gmail.com
- (تم الاستلام: 08 كانون الثاني (يناير) 2015؛ تاريخ الاستلام المنقح: 18 (أغسطس) 2016؛ تاريخ القبول: 22 (أغسطس) 2016)
- 26 أطروحة دكتوراه بن عشورة صبرينة فاعلية المضادات الأوكسدة الزيوت الطيارة
- 80 أطروحة دكتوراه ع. خولة دراسة مقارنة المواد المضادة للأوكسدة للبروبوليس لمناطق مختلفة في الجزائر حسب الخريطة المناخية بالطرق الكيمائية والكهروكيميائية

6 DOMINIQUE. G, « Etude de nouvelles réactions radicalaires applications à la Synthèse d'alcoïdes », Thèse de Doctorat, Ecole Polytechnique, 2004.

8 TURRO.N.J, MASAYUKI.. A, GOULD. L.R, « J.AM.Chem.Soc, 1982. 104 856- 858

9 VOLLHARDT.K.P.C, Schore .N. E, « Traité de la chimie organique » traduction 3^e ed, 1999. De Boeck et larcier.s.a

10 VOLLHARDT.K.P.C, Schore .N. E, « Traité de la chimie organique » traduction 3^e ed, 1999. De Boeck et larcier.s.a.

11 OLIVE.G « Synthèse de nouvelles nitrones du Type Pyrroline-N- Oxide et leur utilisation en spin-trapping», Thèse de doctorate,

13 FAVIER.A, « le stressoxydant : Intérêt conceptuel et expérimenta dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique l'actualité chimique 2003.

14 HILCENT.R, « chimie organique hétérocyclique », 2003, EDP. Sciences.

16 WANGL.L,JUI-HUNGYENI,LINGLIANG3.H,JIUAN.WU1.M, «Antioxidant Effect of Methanol Extracts from lotus Plumule and Blossom (Nelumbo nucifera Gertn). Journal of food and Drug Analysis», Vol 11, No. 1,2003

19 See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/311674771>

Antioxidants and its functions in human body - A Review

20[https://www :webteb.com](https://www.webteb.com)

21 Meganware ,how can ,antioxidant benoft our heath? ;retriewedonthe of march 2021

[https://www medicadrevvstoday ,com](https://www.medicadrevvstoday.com)

22 . Knight, J.A. Free radicals: Their history and current status in aging and disease. Ann. Clin. Lab. Sci. 1998, 28, 331–346..

.69Moreau, D. Comptes Rendus des Séances et Mémoires de la Société de Biologie; Au Bureau de la Gazette médicale: Paris, France, 1922;

23 . Yang, M.-H.; Lin, H.-J.; Choong, Y.-M. A rapid gas chromatographic method for direct determination of BHA, BHT and TBHQ in

edible oils and fats. Food Res. Int. 2002, 35, 627–633.

24 . Amarowicz, R.; Pegg, R.B. Natural antioxidants of plant origin. Adv. Food Nutr. Res. 2019, 90, 1–81.

25 [http://EzineArticles ,com /7925701](http://EzineArticles.com/7925701)

[27] Molyneux-P, "the use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH for estimating antioxidant activity" song klana Karin J. sci technol., 2004, (26) - 2-211- 219.

28 Sharma.O.P, and Bhat.T.K, DPPH antioxidant assay revisited. Food chemistry, 2009. 113(4): p. 1202-1205.

29 Bahar.E, Ara.J, Alam.M, Nath.B, Bhowmik.U, and Runi.N, In-vitroAntioxidant and Thrombolytic

activity of Methanol extract of Sida acuta. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 2013. 2(2): p. 125-133.

30 BRAND WILLIAMS. W, BERSET.C, CUVELIER.M.E, " Use of free radical method to evalute antioxidant activity lebens". Wissen.U.Tech, 1995, 28-25-30.

31 BLOIS, "Détermination antioxydants de M.S. par l'utilisation d'un radica libre stable nature 181,1958, pp 1199-2000.

32 Uchiyama M, Suzuki. Y, et fukuzawa Etude biochimiques de K."de la fonction physiologique du tcopherolactome Yakgaku Zasshi 88,1968, pp 68, 683.

33 Singh.R.G, Negi.P.S, and Radha.C, Phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activities

of free and bound phenolic extracts of Moringa oleifera seed flour. Journal of functional foods, 2013. 5(4): p. 1883-1891.

- 34** I.F.F BENZIE, J.J. STAIN. " the ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power, ehe FRAP essay *Anal Biochen.* 1996, 239, 70-76.
- 35** LESGERDS.J.F "Contribution à l'étude du statut antioxidant de l'homme aspects chimiques et biochimiques (thèse de doctrat) Université d'Aix Marseill,e Septembre 2000.
- 36** MARNEY BUTZ. "Use of the ferrie Reducing Antioxidant Power Test (FRAO) Assay as a Measurement of Antioxidant of Plant Phenylpropanoids, Undergraduate Research conference Centennial Studebt Union Minnesota State University, Mankatomars 25-26, 2002.
- 37** Prieto.P, Pineda.M, and Aguilar.M, Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical biochemistry*, 1999. 269(2): p. 337-341.
- 38** Dasgupta.N, and De.B, Antioxidant activity of some leafy vegetables of India: A comparative study. *Food chemistry*, 2007. 101(2): p. 471-474.
- 39** Miller N.J., Diplock A.T., Rice-Evans C., Davies M.J., Gopinathan V., Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.* 1993;84:407–412. doi: 10.1042/cs0840407
- 40** Durmaz G. Freeze-dried ABTS⁺ method: A ready-to-use radical powder to assess antioxidant capacity of vegetable oils. *Food Chem.* 2012;133:1658–1663. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.02.064.
- 41** .Shin T., Murao S., Matsumura E. A chromogenic oxidative coupling reaction of laccase: Applications for laccase and angiotensin I converting enzyme assay. *Anal. Biochem.* 1987;166:380–388. doi: 10.1016/0003-2697(87)90588-4.
- 42** . Solís-Oba M., Ugalde-Saldívar V.M., González I., Viniegra-González G. An electrochemical—Spectrophotometrical study of the oxidized forms of the mediator 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) produced by

immobilized laccase. *J. Electroanal. Chem.* 2005;579:59–66. doi: 10.1016/j.jelechem.2005.01.025

43 . Arnao M.B., Casas J.L., Río J.A., Acosta M., García-Cánovas F. An enzymatic colorimetric method for measuring naringin using 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) in the presence of peroxidase. *Anal. Biochem.* 1990;185:335–338. doi: 10.1016/0003-2697(90)90304-R.

44 . Chan-Eam S., Teerasong S., Damwan K., Nacapricha D., Chaisuksant R. Sequential injection analysis with electrochemical detection as a tool for economic and rapid evaluation of total antioxidant capacity. *Talanta.* 2011;84:1350–1354. doi: 10.1016/j.talanta.2011.02.043.

45 Cerretani L., Giuliani A., Maggio R.M., Bendini A., Toschi T.G., Cichelli A. Rapid FTIR determination of water, phenolics and antioxidant activity of olive oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2010;112:1150–1157. doi: 10.1002/ejlt.201000356.

46 . Milardovic S., Kerekovic I., Rumenjak V. A flow injection biamperometric method for determination of total antioxidant capacity of alcoholic beverages using bioenzymatically produced ABTS. *Food Chem.* 2007;105:1688–1694. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.04.056.

47 . Miller N.J., Sampson J., Candeias L.P., Bramley P.M., Rice-Evans C.A. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Lett.* 1996;384:240–242. doi: 10.1016/0014-5793(96)00323-7.

48 . Böhm V., Puspitasari-Nienaber N.L., Ferruzzi M.G., Schwartz S.J. Trolox equivalent antioxidant. *J. Agric. Food Chem.* 2002;50:221–226. doi: 10.1021/jf010888q

49 Toor R.K., Savage G.P. Antioxidant activity in different fractions of tomatoes. *Food Res. Int.* 2005;38:487–494. doi: 10.1016/j.foodres.2004.10.016.

50 . Dec J., Bollag J.-M. Detoxification of substituted phenols by oxidoreductive enzymes through polymerization reactions. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 1990;19:543–550. doi: 10.1007/BF01059073.

51 Cano A., Acosta M., Arnao M. A method to measure antioxidant activity in organic media: Application to lipophilic vitamins. *Redox Rep.* 2000;5:365–370. doi: 10.1179/135100000101535933.

52 . Cano A., Alcaraz O., Acosta M., Arnao M.B. On-line antioxidant activity determination: Comparison of hydrophilic and lipophilic antioxidant activity

using the ABTS⁺ assay. *Redox Rep.* 2002;7:103–109.
doi: 10.1179/135100002125000334

53 . Schlesier K., Harwat M., Böhm V., Bitsch R. Assessment of Antioxidant Activity by Using Different In Vitro Methods. *Free Radic. Res.* 2002;36:177–187. doi: 10.1080/10715760290006411.

54 . Strube M., Haenen G.R., Van Den Berg H., Bast A. Pitfalls in a Method for Assessment of Total Antioxidant Capacity. *Free Radic. Res.* 1997;26:515–521

55 Schaich K.M., Tian X., Xie J. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *J. Funct. Foods.* 2015;14:111–125. doi: 10.1016/j.jff.2015.01.043.

56 . Tian X., Schaich K.M. Effects of molecular structure on kinetics and dynamics of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity assay with ABTS⁺ *J. Agric. Food Chem.* 2013;61:5511–5519. doi: 10.1021/jf4010725

57 Apak R., Çapanoğlu E., Shahidi F. Measurement of Antioxidant Activity and Capacity—Recent Trends and Applications. John Wiley & Sons Ltd.; Hoboken, NJ, USA: 2018. pp. 1–283

58 Apak R., Özyürek M., Güçlü K., Çapanoğlu E. Antioxidant activity/capacity measurement. 2. Hydrogen atom transfer (HAT)-based, mixed-mode (electron transfer (ET)/HAT), and lipid peroxidation assays. *J. Agric. Food Chem.* 2016;64:1028–1045. doi: 10.1021/acs.jafc.5b04743.

59 Lissi E., Salimhanna M., Pascual C., Delcastillo M.D. Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. *Free Radic. Biol. Med.* 1995;18:153–158. doi: 10.1016/0891-5849(94)00117-3.

60 . Apak R., Güçlü K., Özyürek M., Karademir S.E. Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method. *J. Agric. Food Chem.* 2004;52:7970–7981. doi: 10.1021/jf048741x.

61 Apak R., Güçlü K., Özyürek M., Çelik S.E. Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. *Microchim. Acta.* 2008;160:413–419. doi: 10.1007/s00604-007-0777-0.

- 62** . Bener M., Özyürek M., Güçlü K., Apak R.A. Development of a Low-Cost Optical Sensor for Cupric Reducing Antioxidant Capacity Measurement of Food Extracts. *Anal. Chem.* 2010;82:4252–4258. doi: 10.1021/ac100646k.
- 63** . Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 1996;20:933–956. doi: 10.1016/0891-5849(95)02227-9.
- 64** . Campos C., Guzmán R., López-Fernández E., Casado Á. Evaluation of the copper (II) reduction assay using bathocuproinedisulfonic acid disodium salt for the total antioxidant capacity assessment: The CUPRAC-BCS assay. *Anal. Biochem.* 2009;392:37–44. doi: 10.1016/j.ab.2009.05.024.
- 65** Smith P., Krohn R., Hermanson G., Mallia A., Gartner F., Provenzano M., Fujimoto E., Goeke N., Olson B., Klenk D. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 1985;150:76–85. doi: 10.1016/0003-2697(85)90442-7.
- 66** . Zhou F., Millhauser G.L. The rich electrochemistry and redox reactions of the copper sites in the cellular prion protein. *Coord. Chem. Rev.* 2012;256:2285–2296. doi: 10.1016/j.ccr.2012.04.035.
- 67** . Marques S.S., Magalhães L.M., Tóth I.V., Segundo M.A. Insights on Antioxidant Assays for Biological Samples Based on the Reduction of Copper Complexes—The Importance of Analytical Conditions. *Int. J. Mol. Sci.* 2014;15:11387–11402. doi: 10.3390/ijms150711387
- 68** . Ozyürek M., Bektasoglu B., Güçlü K., Güngör N., Apak R. Simultaneous total antioxidant capacity assay of lipophilic and hydrophilic antioxidants in the same acetone-water solution containing 2% methyl- β -cyclodextrin using the cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method. *Anal. Chim. Acta.* 2008;630:28–39. doi: 10.1016/j.aca.2008.09.057
- 69** . Tufan A.N., Çelik S.E., Özyürek M., Güçlü K., Apak R. Direct measurement of total antioxidant capacity of cereals: QUENCHER-CUPRAC method. *Talanta.* 2013;108:136–142. doi: 10.1016/j.talanta.2013.02.061.
- 70** Bener M., Ozyürek M., Güçlü K., Apak R. Novel optical fiber reflectometric CUPRAC sensor for total antioxidant capacity measurement of food extracts and biological samples. *J. Agric. Food Chem.* 2013;61:8381–8388. doi: 10.1021/jf402327x.
- 71** . Özyürek M., Güçlü K., Apak R. The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2011;30:652–664. doi: 10.1016/j.trac.2010.11.016.

73 .Huang D., Boxin O.U., Prior P.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* 2005;55:1841–1856. doi: 10.1021/jf030723c.

74 Prior R.L., Wu X., Schaich K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem.* 2005;53:4290–4302. doi: 10.1021/jf0502698.

75. Apak R., Gorinstein S., Böhm V., Schaich K.M., Özyürek M., Güçlü K. Methods of Measurement and Evaluation of Natural Antioxidant Capacity/Activity. *Pure Appl. Chem.* 2013;8:995–998.

76. Godoy-Navajas J., Aguilar-Caballos M.P., Gomez-Hens A. Long-wavelength fluorimetric determination of food antioxidant capacity using Nile blue as reagent. *J. Agric. Food Chem.* 2011; 59:2235–2240. doi: 10.1021/jf104538a.

77. Nkhili E., Brat P. Reexamination of the ORAC assay: Effect of metal ions. *Anal. Bioanal. Chem.* 2011;400:1451–1458. doi: 10.1007/s00216-011-4884-8

78 Journal of Electroanalytical Chemistry Volume 799, 15 August 2017, Pages 519-524

79 Journal of Electroanalytical Chemistry Volume 799, 15 August 2017, Pages 519-524

81 Encyclopedia of Interfacial Chemistry Surface Science and Electrochemistry 2018, Pages 48-74

82 Wang J (2006) Analytical electrochemistry, 3rd edn. Wiley-VCH, Hoboken

83 Comprehensive Analytical Chemistry Volume 89, 2020, Pages 91-137

84 Nanoparticles in Analytical and Medical Devices 2021, Pages 83-112