



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة قاصدي مرباح ورقلة

كلية الرياضيات و علوم المادة

قسم الكيمياء

رسالة محاضرة لنيل شهادة

دكتوراه في العلوم

تخصص: كيمياء

من إعداد: محمد الأخضر بالفار

تحت عنوان

المساهمة في دراسة القدرة المضادة للأوكسدة لبروبوليس جنوب الجزائر بالطرق الكيميائية
و الكهروكيميائية

نوقشت يوم:/...../.....

أمام لجنة المناقشة المكونة من:

رئيسا	جامعة قاصدي مرباح ورقلة	أستاذ التعليم العالي	أ.د. سقني لعجال
مشرفا	جامعة الشهيد جمه لخضر الوادي	أستاذ التعليم العالي	أ.د. التهامي العانز
مناقشا	جامعة قاصدي مرباح ورقلة	أستاذ التعليم العالي	أ.د. سعيدي مختار
مناقشا	جامعة باجي مختار عنابة	أستاذ التعليم العالي	أ.د. بلقاسم لقصير
مناقشا	جامعة الشهيد جمه لخضر الوادي	أستاذ التعليم العالي	أ.د. وهراني محمد رضا

السنة الجامعية 2015-2016

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

« وَأَوْحَىٰ رَبُّكَ إِلَى النَّحْلِ أَنْ اتَّخِذِي مِنَ
 الْجِبَالِ بُيُوتًا وَمِنَ الشَّجَرِ وَمِمَّا يَعْرِشُونَ (٦٨) ثُمَّ كُلِي
 مِنْ كُلِّ الثَّمَرَاتِ فَاسْلُكِي سُبُلَ رَبِّكِ ذُلًا يَخْرُجُ مِنْ
 بُطُونِهَا شَرَابٌ مُخْتَلِفٌ أَلْوَانُهُ فِيهِ شِفَاءٌ لِلنَّاسِ إِنَّ فِي ذَٰلِكَ
 لَآيَةً لِّقَوْمٍ يَتَفَكَّرُونَ (٦٩) »

سورة النحل الآيات "٦٨-٦٩"



أمي.... لا تؤم القلوب إلا إليك ...

ولا تلين الصخور إلا لحنانك ... أنت العبد... والجنة تحت قدميك ... أحبك أمي...

إلى روحك الكريمة رحمة لله عليكي.

أبي لو كنت أملك أن أهديك قلبي لنزعته من صدري وقدمته إليك ولو كنت أملك أن

أهديك عمري لسجلته أيامي بإسمك ولكن لا أملك سوى الكلمات الكثيرة من صادق

التعبيرات فلتكن هي هديتي لك.

وهذا العمل المتواضع

رحمة لله عليك.

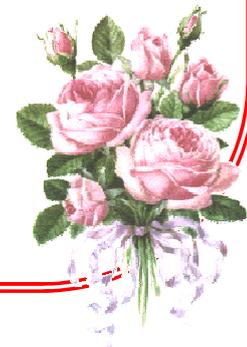
إلى كل من تمنى لي النجاح زوجتي ليلي وابنائي عبد الرحمان اسامة عبد الكافي محمد

ضياء الحق شامل عبد المؤمن ومودة

لكل هؤلاء أهدي ثمرة جهدي في هذا العمل،

راجيا الله أن يجعل العمل خالصا

لوجه الكريم، وأن ينفع به.



أبدأ بحمد الله سبحانه وتعالى والثناء عليه الذي أعانني ووقفني في إنجاز هذا العمل المتواضع، والذي آمل أن أكون قد وفقت بإتمام الغرض الذي كان من أجله. و أصلي وأسلم على حبيبنا، وقودتنا خاتم النبيين، وإمام المرسلين سيدنا محمد الذي علمنا حب العلم والسعي في طلبه.

وبعد،،،

إلى صاحب التميز والأفكار النيرة، أزرى التحيتات وأجملها وأندأها وأطيبها، أرسلها لك بكل ودّ وحب وإخلاص، تعجز الحروف أن تكتب ما يحمل قلبي من تقدير واحترام، وأن تصف ما اختلج بملء فؤادي من ثناء وعجاب. فما أجمل أن يكون الإنسان شمعاً تُنير دروب الحائرين.

إلى الأستاذ الفاضل أ.د. التهامي العائز

تلوح في سماءنا دوماً نجوم بَرَاقَة لا يخفت بريقها عتًا لحظةً واحدةً، نترقب إضاءتها بقلوب ولهانة، ونسعد بلمعانها في سماءنا كل ساعة، فاستتحقت وبكل فخر أن ترفع اسمها عالياً. الى لجنة المناقشة أ.د. سقني لعجال أ.د.سعيد مختار أ.د. بلقاسم لقصير أ.د.وهرائي محمد رضا

علينا دائماً أن نشكر ونقدر من قدّموا لنا المساعدة ومدّوا لنا يد العون عند حاجتنا لمن يقف جانبنا، وعلينا أن نبوح لهم دوماً عن فرحنا بوجودهم وتقديرنا لمساندتهم. إلى الدكتور علي لونس، والدكتور حجاج محمد والدكتورة زينب غياية

كلمة حبّ و تقدير وتحيّة وفاء وإخلاص، تحيّة ملؤها كلّ معاني الأخوة والصداقة، تحيّة من القلب إلى القلب، شكراً من كلّ قلبي. الى كل من جال غيلاني , عبد الكريم ربيعي, مصطفى بن علي, السعيد نجيمي , ونيسة, مسعودة , زهور , رقية. واخوي محمود وعبد العزيز.

اخوتي جميعا محمد واحمد واستاذي سالم فاطمة الزهراء والطيب وعلي وحزمة والتجاني والعطرة وعبد الكريم السعيد معمر.

الباحث محمد الأخضر بالفار

ملخص

كانت منتجات العسل محل اهتمام الإنسان منذ القدم، وذلك لاحتوائها على مركبات فعالة طبيعية تختلف فيما بينها في البنية والتأثيرات البيولوجية وكذلك آليات التأثير، وتعتبر عديدات الفينول وخاصة الفلافونويدات والأحماض الفينولية ذات تأثيرات مزيحة للجذور الحرة ومضادة للأكسدة.

إن المركبات القياسية ذات فعالية مضادة للأكسدة عالية لكونها عبارة عن مركبات فينولية والتي بدورها مسؤولة عن تثبيط الجذور الحرة، حيث تعتبر هي المسؤولة عن الفعالية المضادة للأكسدة.

من خلال هذه الدراسة نأمل أن نحقق بعض الأهداف لتثمين مادة البروبوليس على قدرته العلاجية، الصيدلانية والغذائية من خلال دور عديدات الفينول في معرفة البروبوليس ذات أعلى تأثير مضاد للأكسدة.

تمحورت دراستنا هذه حول عينات من بروبوليس وذلك قصد دراسة مستخلصاتها الميثانولية حيث يهتم هذا العمل بإجراء دراسة مقارنة على مستويين هما المحتوى الكمي للمواد الفعالة والتي تمثل المركبات الفينولية والفعالية المضادة للأكسدة والتي تمثل القدرة على تثبيط الجذور الحرة هذا من جهة، من جهة أخرى اهتمت هاته الدراسة أيضا بتجربة طرق جديدة لتقدير الفعالية المضادة للأكسدة تعتمد على التقنية الفولطأمبيرومترية الحلقية (CV) والفولتأمبيرومترية الموجه المربعه (SWV) .

وكمرحلة أولى في دراستنا هذه قمنا باستخلاص المركبات الفينولية من عينات البروبوليس (إختيار طريقة استخلاص مناسبة مع اختيار المذيب).

بعد استخلاص البروبوليس بالطريقة المختارة تم تقدير كمية الفينولات الكلية اعتمادا على طريقة Singleton-Rossi (1956) بواسطة اختبار Folin-Ciocalteu reagent لمستخلصات الميثانولية للبروبوليس حيث نلاحظ أنها تحتوي على كميات كبيرة جدا من الفينولات حيث بلغت أقصى كمية سجلتها بومرداس وصلت إلى 262,338 mg/g كذا الفلافونويدات التي بلغت 210.884 mg/g أما بقية المستخلصات وهما غرداية ومستغانم فكانت كميتهما 185.074 mg/g من الفينولات و 85.827 mg/g من الفلافونويدات و 86.213 mg/g من الفينولات و 14.718 mg/g من الفلافونويدات على التوالي، أما اقل نتيجة فسجلها بروبوليس بجاية حيث كانت 81.141 mg/g للفينولات و 23.972 mg/g من الفلافونويدات، يظهر جليا من خلال النتائج غنى مادة البروبوليس بالمركبات الفينولية ويظهر هذا التفاوت في النسب نظرا لاختلاف طبيعة المناخ.

وفي المرحلة الثانية قمنا بدراسة الفعالية المضادة للأكسدة للمستخلصات الفينولية وتم ذلك بواسطة أربعة اختبارات هي اختبار (DPPH)، اختبار الموليبيدات (TAC)، تقنية (CV) وتقنية (SWV)، وتبين لنا أن جميع المستخلصات تملك فعالية معتبرة وخاصة مستخلص بومرداس وغرداية، حيث تم إجراء مقارنة النتائج المتحصل عليها بمركبات قياسية هي حمض الأسكوربيك (AA) وحمض الغاليك (GA).

تمت مقارنة نتائج الاختبارين (DPPH) واختبار الموليبيدات (TAC) بنتائج الطريقة (CV) وتقنية (SWV) ووجد أن هناك شبه تطابق في ترتيب المستخلصات إذ احتل بروبوليس بومرداس الصدارة يليه غرداية ثم بجاية ومستغانم، أما فيما يخص قيم (كمية) المواد المضادة للأكسدة (LMWA) فهناك اختلاف واضح يعكس خصائص كل طريقة إلا أننا وجدنا أن طريقة (CV) وتقنية (SWV) تعطي نتائج متقاربة من حيث القيم فقد استعملنا في هذه الطريقة مركبين قياسيين (AA) و (GA) ذو وسط حمضي (pH=2)، رغم هذا فقد جاءت النتائج متقاربة مما يعطي انطباع أن هذه الطريقتين أكثر دقة، و من أجل الخروج بنتائج مقنعة من حيث اعتماد الطريقة (CV) وتقنية (SWV) كطريقة لتقييم الفعالية المضادة للأكسدة تمت المقارنة وذلك بناء على مدى الترابط بين هاتين الطريقتين. حيث وجد إن أكبر ترابط بين الطريقة (CV) واختبار الموليبيدات (TAC) في حالة اخذ (GA) كأساس مرجعي ($R_2=0,999$)، أما علاقة الترابط بين الطريقة (CV) و اختبار (DPPH) فقد كانت أقل ما يمكن في حالة الاعتماد على المنحنى القياسي لـ (AA) بدلالة كثافة التيار حيث بلغ ($R_2=0,118$).

كنتيجة أكيدة لهذا العمل الذي يقوم على تجربة دقيقة ونتائج مؤكدة، نستطيع أن نقول أن طريقة (CV) وتقنية (SWV) هي طرق ذات كفاءة عالية لتقدير الفعالية المضادة للأكسدة (LMWA) للمواد الطبيعية، فتحضير العينة للدراسة بواسطة (CV) وتقنية (SWV) بسيط وسريع ولا يتطلب إجراءات معقدة، كما إن منحنى (CV) وتقنية (SWV) يمكننا من استنتاج اختبار للعينة الكلية دون الحاجة لتقييم كل مركب من مركباتها على حده، هذا ما يسهل علينا إجراء دراسات موسعة تشمل العديد من المستخلصات والمركبات حيث لا يطرح في هذه الطريقة الزمن ولا التكلفة ولا الوسط ولا طبيعة العينة أي مشكلة.

ومما سبق ذكره فإننا نأمل أن هذه الدراسة لا تنتهي عند إستخلاص المركبات الفينولية الخام وفعاليتها المضادة للأكسدة، بل يجب أن تتعداها إلى معرفة الصيغ الكيميائية المسؤولة عن هذه الفاعلية . وفي الأخير وكنتيجة أكيدة لهذا العمل لا يسعني إلا أن أقول إن تثمين مادة البروبوليس واستغلالها،

وعليه فإننا نوصي كل من الباحثين والمهتمين بإجراء المزيد من الدراسات حول إستخدام البروبوليس وغيره من منتجات النحل، والتي يمكن إستخلاص مكوناتها ودراسة خواصها وقيمتها الغذائية لتمكين الصناعات في بلادنا من التطور والإزدهار، كذلك تكثيف أبحاثهم في هذا المحور والمتعلق بتقدير مضادات الأكسدة بالطرق الكهروكيميائية لعدة اعتبارات أهمها أن هناك توجه عالمي غير اعتيادي لهذه الدراسات خاصة على مستوى الدول: روسيا، الولايات المتحدة الأمريكية والكيان الإسرائيلي هذا الأخير الذي له حصة الأسد من هاته الأبحاث، ذكرت هذا لأهمية الموضوع وسعة المجالات التي يمكن إن يستخدم فيها.

الكلمات المفتاحية: البروبوليس ، محتوى الكلي للمركبات الفينولية، الفلافونويدات، ، الفعالية المضادة للتأكسد، الفولتاممري حلقي (CV) ، الفولتأمبيرومترى الموجه المربعه (SWV).

Abstract

The honey products the focus of human attention since ancient times, so as to contain natural active compounds differ in structure and biological effects as well as the influence mechanisms, and is considered CR phenol, especially flavonoids and phenolic acids with Mazihh effects of free radicals and anti-oxidant.

The standard compounds effective anti-oxidant high for being a phenolic compounds, which in turn is responsible for the inhibition of free radicals, which are considered responsible for the effectiveness of anti-oxidation.

Through this study we hope to achieve some of the goals for the valuation rule of propolis on its ability therapeutic, pharmaceutical and food through the role of CR phenol to know propolis with the highest antioxidant effect.

We focused this study on samples of propolis and that meant the study of extracts methanolic where the cares of this work to conduct a comparative study on the hierarchical levels are quantitative content of effective materials, which represent phenolic compounds and effective antioxidant, which represents the ability to inhibit free radicals on the one hand, on the other hand focused on this study also experience new ways to assess the effectiveness of anti-oxidation depends on the technical ring Alfoltaomberomitrih (CV) and Alfoltaomberomitri (SWV).

As a first stage in this study we have extracted phenolic compounds from propolis samples in accordance with the method of soaking in methanol to give the largest possible payoff (choose how to draw with the choice of an appropriate solvent).

After extracting propolis method selected was estimated amount of total phenols depending on the method of Singleton-Rossi (1956) by Folin-Ciocalteu reagent test extracts methanolic of propolis where we note that they contain very large amounts of phenols, reaching the maximum amount recorded Boumerdes reached 262,338 mg / g as well as flavonoids, which amounted 210.884 mg / g The rest of the extracts, namely Ghardaia and Mostaganem was 185.074 mg / g Kamithma of phenols and 85.827 mg / g of flavonoids and mg / g 86.213 of phenols and 14.718 mg / g of flavonoids in a row, the lowest result Vsgelha propolis Bejaia where she 81.141 mg / g of phenols and 23.972 mg / g of Alflavanuedat, is evident through the results indispensable material propolis

phenolic compounds shows this disparity in rates because of the different nature of the climate.

In the second phase we studied the effectiveness of anti-oxidant extracts phenolic was done by four tests are testing (DPPH), test Almoulibat (TAC), technology (CV) and technology (SWV), we show that all extracts have effective, considering especially Boumerdes extract and Ghardaia, where The comparison results obtained by standard compounds are ascorbic (AA acid) and Algalick acid (GA).

Were compared with the results of the two tests (DPPH) and Test Almoulibat (TAC) the results of the method (CV) and technology (SWV) and found that there is a near match in the order of extracts as propolis Boumerdes taken the lead, followed by Ghardaia then Bejaia, Mostaganem, As for values) amount (antioxidants (LMWA) there is a clear difference reflects the characteristics of each method, but we found that the method (CV) and technology (SWV) give comparable results in terms of values have we used in this method is two-component indices (AA) and (GA) is acidic (pH = 2) despite this, the results are similar, which gives the impression that these two roads more accurate, and pour out convincing the results in terms of the adoption of the way (CV) and technology (SWV) as a way to evaluate the effectiveness of anti-oxidation were compared and that based on the degree of interdependence between these circumstances the results. where found that the greatest correlation between the way (CV) and test Almoulibat (TAC) in the case of taking (GA) as a reference ($R^2 = 0,999$), the correlation between the way the relationship (CV) and test (DPPH) was as little as possible in the case of dependence on for standard curve (AA) in terms of current density reaching ($R^2 = 0,118$).

As a result uncertain for this work which is based on accurate experience confirmed, we can say that the method (CV) and the technique and the results (SWV) are efficient ways high to estimate the effectiveness of anti-oxidation (LMWA) of natural materials, Vthouder sample of the study by (CV) and technology (SWV) simple and fast and does not require complicated procedures, and the curve (CV) and technology (SWV) we can infer test total sample without the need to assess each compound of compounds separately, this is what we facilitates extensive studies include many of the extracts and compounds where shall not be put in this the way time and cost is not the center nor the nature of the sample any problem.

And the foregoing, we hope that this study does not end when the extraction of crude phenolic compounds and antioxidant effectiveness, but must also their knowledge of chemical formulas responsible for this efficiency. In the latter, and as a result certain of this work, I can only say that valuing substance propolis and exploitation, and therefore we recommend both researchers and those interested in further studies on the use of propolis and other bee products, which can be extracted components and study their properties and food value to enable the industries in our country from development and prosperity, as well as to intensify their research in this axis and on the assessment of antioxidants ways electrochemical for several reasons most notably that there is a global trend unusual for this particular at the level of countries: Russia, the United States this latest Israeli entity which has the lion's share of these circumstances research studies, said this of the importance of Thread capacity and areas that can be used.

Keywords: propolis, Total phenolic content, flavonoids, Antioxidant activity, Cyclic voltammetry (CV), voltammetry (SWV).

بالأجنبية	:	بالعربية	:	الرمز
Percent	:	نسبة مئوية	:	%
The wavelength	:	طول الموجة	:	λ
Microlitre	:	ميكرو لتر	:	μ l
Optical absorbance	:	الامتصاصية الضوئية	:	A
2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid	:		:	ABTS
Ascorbic acid equivalents antioxidant capacity	:	الفعالية المضادة للأكسدة المكافئة لحمض الأسكوربيك	:	AEAC
Alpha - Tocopherol, Beta - Carotene Cancer Prevention Study	:	ألفا توكوفيرول بيتا كاروتين	:	ATBC
Butylated hydroxyanisole	:	بوتيل هيدروكسي الأنيسول	:	BHA
Butylated hydroxytoluene	:		:	BHT
2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol	:		:	
Hexafluorophosphate	:		:	Bu ₄ NPF ₆
Degree Celcius	:	م درجة مئوية	:	°C
Cellular antioxidant activity	:	نشاط مضادات الأكسدة الخلوية	:	CAA
Catechin	:	كتيشين مكافئ	:	CE
N,N-diméthyleformamide	:		:	DMF
2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl	:		:	DPPH
Dry weight	:	الوزن الجاف	:	dw
The ferric reducing ability of plasma	:	قدرة إرجاع الحديد في البلازما	:	FRAP
Gram	:	الغرام	:	g
Gallic acid equivalents	:	حمض الغاليك مكافئ	:	GAE
The percentage of inhibition	:	النسبة المئوية للتثبيط	:	I%
The concentration (mg/l) of the extract that inhibited the formation of radical by 50%.	:	التركيز الذي يثبط من تشكل الجذر	:	IC ₅₀
Anodic current	:	التيار الأنودي	:	Ipa
Molar	:	مولار	:	M
Milligram	:	ملغرام	:	mg

Millilitre	:	مللتر	:	ml
Millimole	:	ملي مول	:	m mol
Refractive index	:	قرينة الانكسار	:	η_D^{20}
Nanometre	:	نانومتر	:	nm
Nano mole	:	نانو مول	:	n mol
Anion superoxyde Superoxide radical	:	أنيون فوق أكسيد	:	O_2^-
The oxygen radical absorbance capacity	:	قدرة امتصاص جذر الأوكسجين	:	ORAC
Photochemiluminescence	:		:	PCL
phosphomolybdenum	:	مولبيدات الفوسفات	:	PM
One part per million	:	جزء في المليون	:	Ppm
Free Radical	:	جذر حر	:	R [·]
Rutin Equivalents	:	الروتين المكافئ	:	RE
active oxygen species	:	أصناف الأوكسجين الفعالة	:	ROS
The reducing power	:	إرجاعية للحديد	:	RP
Saturated calomel electrode	:	القطب كالوميل المشبع	:	SCE
Thiobarbituric acid	:		:	TBA
Tert-Butylhydroquinone	:		:	TBHQ
Trolox equivalent antioxidant capacity	:	الفعالية المضادة للأكسدة المكافئة لترولكس	:	TEAC
The total peroxy radical-trapping potential	:	مجموع peroxy المحتملة للاحتباس جذرية	:	TRAP
Oxyradical scavenging capacity	:	قدرة مسح جذر أوكسجين	:	TOSC
6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman- 2-carboxylic acid	:		:	Trolox
Spectrophotométri e UV-Vi sible	:	مطيافية ما فوق البنفسجي و المرئي	:	UV

الصفحة	المحتوى
I	إهداء.....
Ii	تشكرات.....
Iii	ملخص.....
Iv	الرموز.....
V	فهرس المحتويات.....
Vi	قائمة الجداول.....
Vii	قائمة الأشكال.....
1	مقدمة عامة.....
4	المراجع.....

الباب الأول: عموميات حول البروبوليس و المركبات الفعالة في البروبوليس

الجزء النظري

الفصل الأول: عموميات حول البروبوليس

5	1.1. مقدمة.....
6	2.1. نظرة تاريخية.....
7	3.1. أصل كلمة بروبوليس.....
8	4.1. تعريف البروبوليس.....
8	5.1. مصدر البروبوليس.....
8	6.1. جني البروبوليس.....
12	7.1. التخزين.....
13	8.1. الامتصاص والإخراج لمادة البروبوليس.....
13	9.1. الخواص الفيزيائية والكيميائية (الظاهرية).....
17	10.1. استخدام البروبوليس.....
21	11.1. طرق استخدام البروبوليس.....
29	1.1. مقدمة.....
29	2.1. تعريف المركبات الفينولية الطبيعية.....
29	3.1. تصنيف المركبات الفينولية الطبيعية.....
33	4.1. عديدات الفينول وفعاليتها الحيوية (مصدرها).....
34	5.1. الاصطناع الحيوي الأولى لمركبات الفينولية (مصدر المركبات الفينولية).....
34	6.1. دراسة تصنيف المركبات الفينولية الطبيعية (أقسامها).....
35	7.1. أهمية الفينولات و الفلافونويدات.....

- 8.II. العلاقات بين البنى الالكترونية و الخواص الكيمائية للفينولات..... 48
- 9.II. استخلاص المركبات الفينولية..... 49

الجزء التجريبي

الفصل الثالث: المواد و طرق العمل

- III. مواد وطرق الدراسة..... 52
- 1.III. تمهيد..... 52
- 2.III. تحضير العينات..... 52
- 3.III. الأجهزة والأدوات والمواد المستعملة..... 53
- 1.3.III. حني العينات..... 53
- 2.3.III. استخلاص المركبات الفينولية من البروبوليس..... 54
- 3.3.III. الدراسة الفيتوكيمائية والكهروكيمائية للعينات المستخلصة..... 54
- 1.3.3.III. الدراسة الفيتوكيمائية..... 57
- 2.3.3.III. التقدير الكمي للمركبات الفينولية الطبيعية..... 57
- 3.3.III. الدراسة الكهروكيمائية..... 57
- 3.3.III. دراسة السلوك الكهروكيميائي..... 60
- 3.4.III. المذيب المستعمل في الدراسة الكهروكيمائية..... 62
- 3.4.III. الدراسة الكهروكيمائية للكهروليت المساعد..... 62

الفصل الرابع: النتائج و المناقشة

- 1.IV. مقارنة التقدير الكمي لمستخلصات البروبوليس..... 140
- 2.IV. نتائج الدراسة الفيتوكيمائية والكهروكيمائية..... 140
- 1.2.IV. نتائج الدراسة الفيتوكيمائية..... 142
- 2.2.IV. نتائج الدراسة الكهروكيمائية..... 142

الباب الثاني: دراسة الخواص المضادة للأكسدة

الجزء النظري

الفصل الخامس: الجذور الحرة و مضادات الأكسدة

- V. الجذور الحرة و مضادات الأكسدة..... 151
- 1.V. الجذور الحرة..... 152
- 2.V. الأكسدة التلقائية..... 154
- 3.V. مضادات الأكسدة..... 155
- 1.3.V. تعريف مضادات الأكسدة..... 155
- 2.3.V. تصنيف مضادات التأكسد..... 155

155 حسب مصدرها. 1.2.3.V
159 حسب آلية التفاعل. 2.2.3.V
160 آلية عمل مضادات الأكسدة. 3.3.V
161 الآثار الضارة من المواد المضادة للاكسدة. 4.3.V

الفصل السادس: طرق تقييم فعالية المضادات الأكسدة

165 طرق تقييم فعالية مضادات الأكسدة. VI
165 1.VI اختبارات الأسر الجذري
165 1.1.VI اختبار الـDPPH
167 2.1.VI اختبار الـABTS
169 3.1.VI اختبار الـOH
171 2.VI اختبار القدرة الإرجاعية للحديد
171 3.VI اختبار مولبيدات الفوسفات
172 4.VI الطريقة الفولطامتري حلقى

الجزء التجريبي

الفصل السابع: مواد وطرق الدراسة

173 VII مواد وطرق الدراسة
173 1.VII المواد الكيميائية
173 2.VII اختبارات الأسر الجذري
174 1.3.VII اختبار الـDPPH
174 2.3.VII اختبار مولبيدات الأمونيوم
183 4.VII اختبار الفولطامتري حلقى
184 1.4.VII المذيب المستعمل في الدراسة الكهروكيميائية
184 2.4.VII الدراسة الكهروكيميائية للكهروليت المساعد
185 3.4.VII تقدير الفاعلية المضادة للأكسدة بأخذ حمض الأسكروبيك كمركب قياسي
185 1.3.4.VII الدراسة الكهروكيميائية لحمض الأسكروبيك
188 4.4.VII تقدير الفاعلية المضادة للأكسدة بأخذ حمض الغاليك كمركب قياسي
131 1.4.4.VII الدراسة الكهروكيميائية لحمض الغاليك
191 4.4.VII المنحنيات الفولطامبيرومترية الحلقية والمنحنيات الموجة المربعة
194 5.VII الفولطامتري للأكسجين
195 2.5.VII دراسة السلوك الكهروكيميائي في وسط عضوي
196 3.5.VII تحضير المحاليل وطريقة العمل

197 دراسة الفعالية المضادة للأكسدة للمحاليل القياسية في النظام المغلق و المفتوح .4.5.VII
197 1.4.5.VII دراسة فعالية حمض الغاليك
201 3.4.5. 5.VII دراسة فعالية الكريستين
203 2.4.II دراسة فعالية حمض الاسكروبيك
204 4.4.5.VII دراسة فعالية الروتين
206 5.4.5.VII دراسة فعالية الطوكوفيرول
208 5.5.VII دراسة الفعالية المضادة للأكسدة للعينات في النظام المغلق والمفتوح
208 1.5.5.VII دراسة فعالية عينات البروبوليس

الفصل الثامن: النتائج و المناقشة

210VIII.النتائج والمناقشة.
2111.VIII.الدراسة الكهروكيميائية للمستخلصات:
2111.1.VIII. تقدير الفاعلية المضادة للأكسدة للمستخلصات بأخذ حمض الأسكروبيك كمركب قياسي
2142.1.VIII. تقدير الفاعلية المضادة للأكسدة للمستخلصات بأخذ حمض الغاليك كمركب قياسي
2193.1.VIII. الفولطامتري للأكسجين بوجود المستخلصات البروبوليس
2192.VIII. تحديد اجمالي الفعالية المضادة للأكسدة بحساب المقدار TAC
221المراجع
226الخلاصة العامة.
230ملحق

الصفحة	المحتوى
	الباب الأول
	الفصل الأول
	يمثل عينة من البروبوليس بألوان متباينة الشكل (1.1)
	عاملة تجمع البروبوليس من الراتنج النباتي الذي يمثل المصدر الخارجي الشكل (2.1)
	عملية جني المواد الصمغية من براعم و جروح الأشجار الشكل (3.1)
	بروبوليس تم جنيه من طرف النحال الشكل (4.1)
	بروبوليس تم تخزينه الشكل (5.1)
	استخدامات النحل للبروبوليس الشكل (6.1)
	استخدامات البروبوليس في صناعة مستحضرات التجميل الشكل (7.1)
	استخدامات البروبوليس في التغذية الشكل (8.1)
	استخدامات البروبوليس في الصناعة الشكل (9.1)
	الشكل السائل والشكل الطري للبروبوليس الشكل (10.1)
	الفصل الثاني
	نموذجين لمركبين غير فينولين الشكل (1.11)
	بعض مصادر المركبات الفينولية الطبيعية الشكل (2.11)
	تصنيع الفينولات إنطلاقا من عديد الأسيتات الشكل (3.11)
	تصنيع الفينولات إنطلاقا من حمض شيكيميكا الشكل (4.11)
	المركبات الفينولية من الشكل C6-C1 , C6-C2 , C6-C2 الشكل (5.11)
	نماذج للمركبات الفينولية من الشكل C6-C3 , C6-C4 الشكل (6.11)
	بعض النماذج للفينولات من الشكل : C6-C1-C6 , C6-C2-C6 الشكل (7.11)
	بنية بعض الفينولات البسيطة. الشكل (8.11)
	نماذج لأحماض البنزويك الشكل (9.11)

- الشكل (10.ii) أمثلة لأحماض السيناميك
- الشكل (11.ii) تشكّل الكومارينات
- الشكل (12.ii) بعض نماذج الكومارينات
- الشكل (13.ii) صيغ بعض الكومارينات
- الشكل (14.ii) الهيكل الأساسي للفلافونويدات
- الشكل (15.ii) A: حمض الغاليك, B: حمض الايلاجيك.
- الشكل (16.ii) وحدة التانينات المتحللة
- الشكل (17.ii) وحدة التانينات المتراكمة

الفصل الثالث

الفصل الرابع

الباب الثاني

الفصل الخامس

الفصل السابع

- الشكل 1.VII. السلسلة العيارية لـ Trolox. 125
- الشكل 2.VII. السلسلة العيارية لحمض الأسكوربيك بطريقتة ال-OH. 126

- الشكل.3.VII. السلسلة العيارية لحمض الأسكوريك
بطريقة القدرة الإرجاعية للحديد.
128
- الشكل.4.VII. السلسلة العيارية لحمض الأسكوريك
بطريقة موليبيدات الفوسفات (MP).
130

الفصل الثامن

الصفحة	المحتوى
	الباب الأول
	الفصل الأول
7	الجدول 1.I. يمثل المكونات الأساسية للبروبوليس
	الفصل الثاني
	الجدول (1.II) الهيكل الكربوني لبعض أصناف المركبات الفينولية
	الجدول (2.II) الأحماض الفينولية المشتقة من حامض البنزويك
	الجدول (3.II) الأحماض الفينولية المشتقة من حامض السيناميك
	الجدول (4.II) تصنيف الفلافونويدات
	الجدول (5.II) بعض المركبات الفينولية المستعملة في الطب و الصيدلة
	الجدول (6.II) مركبات الفلافانويدات المستعملة في الصناعة الدوائية
	الفصل الثالث
	الجدول (1.IV) إحدائيات مناطق جني البروبوليس
	الجدول (2.IV) تاريخ جني وترميز عينات البروبوليس
	الجدول (3.IV) الصفات الفيزيائية لعينات البروبوليس المدروسة
	الجدول (4.IV) الامتصاصية الضوئية لكل من مستخلصات الميثانولية
	الجدول (5.IV) قيم الامتصاصية الضوئية لكل من مستخلصات العينة
	الجدول (6.IV) قيم الامتصاصية الضوئية
	الجدول (7.IV) قيم الامتصاصية الضوئية لكل من مستخلصات العينة
	الجدول (1.V) نتائج مردود المادة المستخلصة
	الجدول (2.V) يوضح التقدير الكمي للفينولات الكلية في المستخلصات الميثانولية
	الجدول (3.V) يوضح التقدير الكمي للفلافونويدات في المستخلصات
	الجدول (4.V) يوضح التقدير الكمي للفلافونول في المستخلصات
	الجدول (5.V) نتائج اختبار DPPH لكل من مستخلصات البروبوليس ولحمض الأسكوربيك
	الجدول (6.V) يوضح التقدير فعالية المضادات الأوكسدة في المستخلصات

- الجدول (7.V) جدول لنتائج تقدير الفعالية المضادة للأوكسدة بأخذ المنحني القياسي لحمض الأسكروبيك بدلالة كثافة التيار بتطبيق تقنية (CV)
- الجدول (8.V) جدول لنتائج تقدير الفعالية المضادة للأوكسدة بأخذ المنحني القياسي لحمض الأسكروبيك بدلالة كثافة التيار بتطبيق تقنية (SWV)
- الجدول (9.V) جدول لنتائج تقدير الفعالية المضادة للأوكسدة بأخذ المنحني القياسي لحمض الغاليك بدلالة كثافة التيار بتطبيق تقنية (CV)
- الجدول (10.V) جدول لنتائج تقدير الفعالية المضادة للأوكسدة بأخذ المنحني القياسي لحمض الغاليك بدلالة كثافة التيار بتطبيق تقنية (SWV).

الفصل الرابع

الباب الثاني

الفصل السابع

الفصل الثامن

مقدمة عامة

عندما خلق الله عز وجل الخلق في هذه الدنيا جعل فيها سننا كان من أروعها انه ابتلاه بالداء وانزل له الدواء, فما خلق بحكمته داء إلا وجعل برحمته له من دواء ولهذا سيظل الإنسان في البحث والتنقيب للحصول عليه للاستفادة منه خاصة عن ما يتوافر فيه عنصرا الغذاء والدواء معا, ولم يكن هناك جدير بهذه الصفة سوى عسل النحل ومنتجاته.

وما زال العلم يسطع نوره على هذا الغذاء الرباني ليكشف لنا كل ما هو جديد وبهذا قاموا العلماء الباحثين بدراسة هذه المنتجات التي فاض الحديث عنها لما لها من أهمية علاجية^[1], حيث استفادت الأبحاث الطبية في إثبات وجود أنواع مختلفة من الفوائد الصحية لتناول العسل في معالجة الكثير من الأمراض، خاصة المرتبطة بالميكروبات، وقد استحوذت منتجات مختلفة متمثلة في حبوب اللقاح (*pollen*) والهلام الملكي (*royal jelly*) وسم النحل (*bee venom*) وشمع النحل (*beeswax*) والبروبوليس (*propolis*) كذلك على جانب متنوع من الدراسات الطبية التي تم البحث فيها في مدى الجدوى الصحية لكل مادة من تلك المنتجات التي يقدمها النحل، في علاج حالات مرضية مختلفة^[2].

لا يزال البحث العلمي يحاول بشكل مثير للدهشة دراسة ومعرفة تأثيرات الصحية لهذه المنتجات، فالنحل حشرة صغيرة ومحدودة القوة في القدرات الدفاعية التقليدية، ويعيش في بيئة مليئة بالأعداء وبالظروف المناخية والطبيعية التي ربما تؤذي وتدمر مستعمراته ومنتجاته، ولا بد له من البحث عن الوسائل التي توفر له شيئا من الحماية ضد ما قد يضره، وما هو واضح أن إحدى وسائل حماية النحل هو إنتاجه لمادة (البروبوليس)^[3]. وهو مادة تنتجها شغالات النحل حيث تجمعها من فلق الأشجار وتضيف عليه لعابها وتستخدمه داخل الخلية في تطهيرها... وغيرها^[4].

وقد اقترح هؤلاء الباحثون كذلك انه ربما تكون لهذه المادة القدرة على حث وتعديل استجابة الجهاز المناعي للجسم تجاه الخلايا السرطانية بحيث يبدأ في مهاجمتها, وذكروا أيضا أن هذه المركبات ربما تساعد على تقليل مجموعات الأكسجين الحرة الضارة (ROS)^[5].

إن إنتاج الأنواع الأكسجينية النشطة (ROS), مرتبطة بتفاعلات الأكسدة والإرجاع لوظائف الجسم, ويشتمل هذا المصطلح على الجذور الأكسجينية وبعض الأنواع غير الجذرية، فالتوازن بين إنتاج

هذه الجزيئات والتخلص منها يضمن الحفاظ على الوظائف الفيزيولوجية للجسم (Ozgen وآخرون, 2006)^[6].

إلا أن الإفراط في إنتاجها يؤدي إلى أضرار على مستوى الجزيئات البيولوجية أهمها البروتينات والليبيدات والأحماض النووية، متسببا بذلك في تضرر الأنسجة وحدث العديد من الأمراض مثل الالتهاب والأمراض الوعائية القلبية والسرطان وأمراض الجهاز العصبي (Galvez وآخرون, 2005)^[7].

يمكن حماية الجسم من أضرار هذه الجزيئات عن طريق مضادات الأكسدة والتي تستعمل بكثرة كإضافات في الأغذية لحمايتها من أضرار الأكسدة (Djeridane وآخرون, 2006)، وتؤثر مضادات الأكسدة من خلال تثبيط الانزيمات المتدخلة في الأكسدة أو عن طريق إزاحة الجذور الحرة، أو التقاط المعادن أو تحفيز الأنظمة الانزيمية المضادة للأكسدة مؤدية بذلك إلى التخفيض من الأضرار الناتجة، هذا ما أدى في السنوات الأخيرة إلى تزايد اللجوء لاستعمال المركبات الطبيعية خاصة تلك المستخلصة من النباتات، إذ أنها تمثل مصدرا مهما للمعالجة سواء على شكل مستحضرات تقليدية أو مواد فعالة نقية، وذلك لعلاج الأمراض الناتجة عن الإجهاد التأكسدي وتمتاز عن الأدوية الكيميائية بانخفاض تكلفتها وقلة تأثيراتها الجانبية، بالإضافة إلى كونها طبيعية وذات فعالية علاجية عالية^[8].

يعود التأثير الايجابي لمادة البروبوليس ولو جزئيا إلى غناها بالمركبات الفينولية (الأحماض الفينولية والفلافونويدات والدباغ). تمثل عديدات الفينول المستقلبات الثانوية الأكثر انتشارا وتنوعا في المملكة النباتية وتملك نشاطية بيولوجية وصيدلانية واسعة (Bravo, 1998)^[9].

والهدف من دراستنا هذه هو تقدير المحتوى الفينولي والفعالية المضادة للأكسدة والمزيجة للجذور الحرة لمستخلصات ميثانولية للبروبوليس.

حيث اقترحت طرق عديدة لتقييم الفعالية المضادة للأكسدة، وهذا بالاعتماد على عدد من التقنيات نذكر منها على سبيل المثال: اختبار (DPPH)، اختبار (FRAP)، اختبار (ABTS)، اختبار (ORAC)، اختبار (TRAP) واختبار القدرة الإرجاعية (PR)، هذه الطرق تعتمد على التلوين ونزع التلوين في طول موجي معين وهي طرق طيفية (Spectrophotométrie)، لكن بالرغم من الاعتماد على هذه الطرق والتقنيات التقديرية المذكورة، فإن احد لا ينكر أن لكل طريقة ايجابياتها وسلبياتها، وقد أصبح واضحا للدارسين والباحثين أن هاته التقنيات لم تعد كافية في ظل هذا الانتشار الواسع للأبحاث والدراسات

المطروحة في هذا المجال, حيث تثبت الإحصائيات أن عدد الأبحاث بلغ حتى عام 1996 أكثر من 16080 بحث منشور, وزادت هاته النسبة بين سنتي 1997 و2006 بـ 345 % حيث وصلت إلى 55493 بحث منشور^[10], وبسبب الاكتشافات التي توصلت إلى أن الجذور الحرة والمتمثلة في أنواع الأوكسجين النشط (ROS) هي المسؤولة عن تلف المواد الغذائية وغيرها...^[11] مما تطلب البحث عن طرق تحليلية جديدة دقيقة وسهلة للتقدير السريع لمضادات الأوكسدة.

وفي هذا الصدد ارتأينا أن نساهم في دراسة بعض من مستخلصات البروبوليس من مناطق مختلفة في الجزائر، ومعرفة مدى وجود المركبات الفينولية، وتقدير فعاليتها المضادة للأوكسدة بطرق دقيقة وحديثة وفق سلوك كهر وكيميائي يعرف بطريقة الفولطأمبيرومترى الحلقى والموجة المربعة، وذلك حسب سلم فعالية المواد المضادة للأوكسدة.

وتم اختيار هذا الموضوع لعدة اعتبارات أهمها:

- ✓ تميز الطرق الكهروكيميائية بالعديد من المزايا جعلتها تنصدر طرق التحليل الكيميائي سواء الكيفي أو الكمي و تكون طريقة مقترحة كبديل للطرق التقليدية لتقدير مضادات الأوكسدة.
- ✓ اختيار البروبوليس للدراسة جاء بناء على الاهتمام المتزايد بهذه المادة في المجال الطبي، فارتأينا دراستها وتثمينها خاصة مع بداية انتشار تربية النحل في الجنوب الجزائري.
- ✓ نظرا لعدم وجود أي مشروع دراسة أو بحث من هذا النوع فيما عدا بعض البدايات لتثمين مادة البروبوليس^[12].

المراجع:

المراجع بالعربية:

- [1] محمد السيد عطية- سر عسل النحل غذاء وشفاء- دار الغد الجديد القاهرة- المنصورة الطبعة الأولى 1430م-2009 م ص 1.
- [2] د.حسن محمد صندوق العكبر "شمع العسل" فوائد وعلاج للإمراض العدد 11693, (2010).
- [4] د. حسان شمسي باشا "في العكبر اسرار واعجاز" رابطة ادباء الشام (2007)
- [5] د. عبد الباسط محمد السيد -موسوعة النحل تربية-إعجاز-شفاء- ألفا للنشر و التوزيع- مصر-الطبعة الاولى 1432هـ-2011م-ص55.
- [12] م.خ. بلفار، بوليفينولات البروبوليس (دراسة- فصل- تحليل)، مذكرة مهندس دولة 2004، جامعة قاصدي مرباح بورقلة.

المراجع بالإنجليزية:

- [3] M. P. Jean, Le guide pratique d'apiculture, Eds. Edisud. France (1999).
- [6] Afzal, M., Al-Hadidi, D., Menon, M., Pesek, J., Dhami, M.S.(2001) Ginger: an ethnomedical, chemical and pharmacological review. Drug Metab Interact. 18: 159-190.
- [7] Ames, B.N., Cathcart, R., Schwiers, E., Hochstein, P. (1981) Uric acid provides an antioxidant defence in humans against oxidant and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. Proc Natl Acad Sci USA. 78: 6858-6862.
- [8] Amié, D., Davidovie-Ami, D., Beslo, D., Trinajstić, N. (2003) Structure-Radical Scavenging Activity Relationships of Flavonoids. Croat Chem Acta. 76(1): 55-61.
- [9] Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunete, C., Dine, T., Vasseur, J., Gazin, J. C., Pinkas, M., Luycky, M., Gazin, M. (1996) Oxygen species scavenging activity of phenolic extract from Hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation. Arzneim Forsch/Drug Res. 1-6.
- [10] L.M. Magalhaes, M.A. Segundo, S. Reis, J.L.F.C. Lima, Anal. Chim. Acta. 613(2008)1-19.
- [11] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M.T.D. Cronin, M. Mazur, J. Telser, Int. J. Biochem. Cell Biol. 39(2007)44.





الفصل الأول

عموميات حول البروبوليس

I. عموميات حول البروبوليس:

1.I مقدمة:

من المؤكد أن هناك العديد من المواد الراتنجية تنتج حول البراعم أو الأوراق الجديدة، هذه المواد تقي من الابتلال بالماء، كما أنها تحمي من التعفن والتخمر والفطريات والحشرات والأعداء الأخرى لا يمكن تجاهل هذه المواد نظراً لأهميتها كمادة خام التي تنمو يوم بعد يوم خاصة في مجال الطب، وغالباً ما يجمع نحل العسل هذه المواد ويستخدمها بعد معالجتها بإفرازاته داخل الخلية حيث تكسب خلية النحل حماية مثل التي تحمي بها النبات، هذه هي مادة البروبوليس^[1]، حيث يتم في الخلية إضافة إفرازات لعابية مختلفة إلى هذا الصمغ (حبوب لقاح وشرائح الشمع...) [2][3]، حيث أن هذا الأخير يتميز بالصلابة والالتصاق في درجات الحرارة العادية ولبليونتتها ومرونتها في درجات الحرارة المرتفعة^[4].

مادة البروبوليس تلعب دوراً مهماً في مجال الطب. وأثاره للفعالية المضادة ضد البكتيريا عديدة ومختلفة، وخصوصاً ضد مسببات الأمراض [5][6][7][8][9]، مضاد للالتهابات^[10]، مبيدات الفطريات^[11]، مضاد للسرطان^[12]، وخاصة الأدوية المضادة للفيروسات^[13;14].

وهنا يطرح السؤال ما هو البروبوليس - صفات البروبوليس - مكونات البروبوليس - خواص البروبوليس العلاجية - فوائد البروبوليس - جمع البروبوليس - طرق استخدام البروبوليس و معرفة مدى فعاليتها المضادة... الخ^[1].

2.1 نظرة تاريخية:

يقول الخبراء أن البروبوليس موجود منذ أكثر من 45 مليون عام، وأنه استخدم من قبل الإنسان لآلاف السنين^[15]. لكن معرفة البروبوليس أقل قدماً من معرفة العسل^[16]. عرف المصريون القدماء خصائص البروبوليس حيث استخدموه في تطيب وتعطير وتحنيط الموتى. هذا الفن الذي برعوا فيه وأتقنوه إلى أقصى حد. وفي القرون الوسطى شاع استخدامه في دك سرة الأطفال حديثي الولادة^[17].

واستعمل أبوقراط البروبوليس كمرهم في علاج الجروح والقروح. وبعد أربعة قرون كتب الطبيب الروماني الشهير "ليني" عن فوائده في شفاء القروح وتخفيف التورمات وتطرية المناطق القاسية^[15].

كما ذكر في كتاب "قانون علم الطب" لابن سينا أن البروبوليس وضع كعلاج الجروح التي يحدثها رؤوس السهام، إضافة إلى مؤلفات الطب في جورجيا "يعود إلى القرن الثامن عشر" استخدم هذا المركب في علاج مرض السل وكان يطلق عليه آنذ "نفث الدم"^[18]. وخلال حرب البوير في جنوب إفريقيا في نهاية القرن السابق شاع استخدام البروبوليس مختلطاً بالفازلين في علاج الحروق^[16]. وفي الحروب الإنجليزية استعمل على نطاق واسع في الطلاء وفي العطورات وكذلك استخدم في تحضير مواد التجميل^[19].

الكثير من المعارض الأخرى احتوت أثراً وقطعاً لخلايا نحل تعود لآلاف سنين مضت، لأن الأساطير القديمة والصحاف والرسومات بالكهوف كلها توضح أن البروبوليس كان مستعملاً منذ ما قبل التاريخ^[20].

في الثلاثينات قام العالم فيليب بعرض نظرية أخرى عن المصدر المزدوج للبروبوليس وأكد على وجود نوعين من البروبوليس في الخلية^[20].

وفي السنوات الأخيرة اتجه العلماء والأطباء لإجراء البحوث العلمية حول هذه المادة فوجدوا أن لها تأثير نافعا على جسم الإنسان وليس له أي آثار جانبية معروفة. واستهوى فكر الباحثين بسبب اكتشاف خواصه الفعالة المضادة لبعض الأمراض. وقد نشرت في السنتين الأخيرة عشرات الدراسات العلمية في مجلات علمية محكمة، حيث أن خلال الثلاثين سنة الأخيرة أجريت بحوثاً تحليلية وصيدلية وطبية لهذه المادة في كل أنحاء العالم، واستطاعوا أن يحصروا الأهمية الكبرى للبروبوليس في مركبات كيميائية

متعددة الفينول^[15]. وقد نجح العلماء في تحديد التركيب الكيميائي لهذه الفينولات المتعددة (وهذا حسب مصادر جنيه) وعزل المواد الفعالة المسؤولة عن نشاطه العلاجي^[21].

حيث تم نشر أكثر من 500 بحث عن البروبوليس حول العالم منذ عام 1980، وكانت اغلب تلك الدراسات على مستوى المختبر *in vitro*^[15].

3.I أصل كلمة بروبوليس:

أثبتت المصادر العلمية أن الفيلسوف أرسطو أول من كتب علمياً عن البروبوليس في كتابه "تاريخ الحيوان" حيث أفرد أبحاثاً عن النحل ومنتجاته، وميّز بين نوعين من البروبوليس: الغباري *Conisis* يستعمله النحل لإغلاق الثقوب والشقوق في الخلية، والنوع الآخر هو الحبيبي *Mitys* وهو داكن يستعمله النحل لتصغير مدخل الخلية^[20].

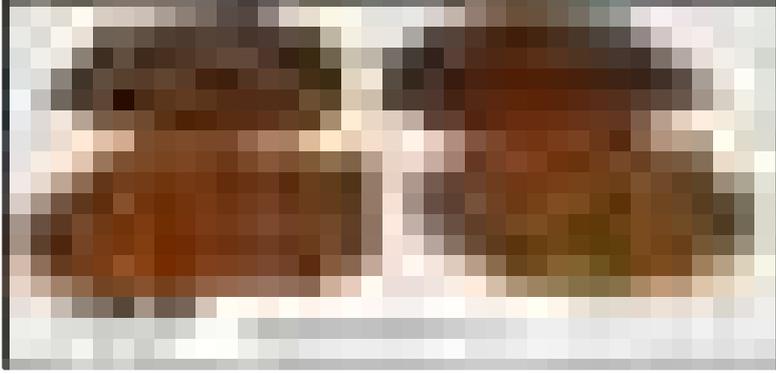
وتعود أصل كلمة بروبوليس *propolis* للفيلسوف نفسه، وهو يتكون من كلمتين يونانيتين الأولى وهي *pro* وتعني (قبل) والثانية *polis* وتعني (مدينة) أي أن البروبوليس بمثابة الجهاز المناعي الفطري لخلية النحل لذا كلمة بروبوليس تعني النظام الدفاعي للمدينة^[15]، حيث استخدم النحل البروبوليس لسد فتحات أو ثقوب قد تنشأ في الخلية، لمنع دخول القادمين الغير مرغوب فيهم لداخل العريش^[22].

4.I تعريف البروبوليس:

لقد ساد الاعتقاد خلال حقبة من الزمن أن البروبوليس ضمن إفرازات النحل الثلاثة المعروفة ألا وهي الشمع، سم النحل والغذاء الملكي^[22]، بمعنى انه نتاج الهضم الأول لحبوب اللقاح^[17].

بعد ذلك ثبت أن البروبوليس هو نتاج نشاط النحلة حيث تجمعها بنفس الطريقة التي يتم بها جمع الرحيق وحبوب اللقاح^[17]، وهو عبارة عن صموغ ومواد راتنجية بلسمية *Gums and resins* يجمعها النحل من القشور والبراعم الزهرية لمختلف الأشجار وأصماغ الأشجار^[23]، رائحته مميزة كخليط من البراعم والعسل والشمع والفانيليا^[24]. وفي الخلية يقوم النحل بإضافة إفرازات لعابية مختلفة إلى هذا الصمغ كحمض الكافريك وغيرها من تركيبات كيميائية طبيعية، كما تضيف إليها شوائب من الشمع بنسبة 40:60%^[25].

حيث تتدرج ألوانه المتباينة ما بين الأحمر الفاتح, الأسود الغامق, الأسود المحمر, البني المحمر, البني المسود والبني المخضر وذلك بحسب قدمه ومصادر جمعه^[26]. كما يعرف البروبوليس بأسماء مختلفة منها: العكبر, غذاء النحل, سذاب النحل, مخلفات النحل والصمغ الشمعي^[27].



الشكل (1.I): يمثل عينة من البروبوليس بألوان متباينة.

5.I مصدر البروبوليس:

لقد بقي أصل البروبوليس مجهولاً لفترة طويلة من الزمن, وطرحت عدة آراء حول هذا الموضوع, ولم تكتشف المميزات العلاجية المثيرة لهذا النتاج إلا في وقت قريب, تلك المميزات التي منحته أهمية خاصة وعندها فقط بدأ مربو النحل يطرحون أسئلتهم حول أصل البروبوليس ومصدره^[18].

لقد ساد الاعتقاد قديماً أن البروبوليس مصدره داخلي بحت, إلى أن اكتشف بأن له مصدر خارجي كذلك, نظراً إلى أن المصدر الداخلي للبروبوليس لم يصمد طويلاً لمعرفة أن الغلاف الغني بالمواد العطرية ينفصل عن حبة الطلع^[28], ولذا ينشأ البروبوليس من مصدرين أساسيين:

1.5.I المصدر الداخلي للبروبوليس:

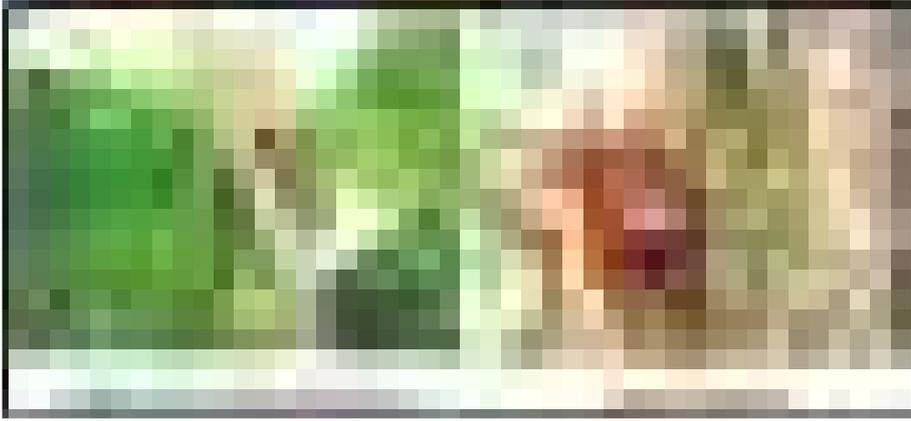
ينتج البروبوليس كمخلف صمغي نتيجة الهضم الأولي لحبوب الطلع داخل العضو الواقع بين العسل والمعدة الهاضمة للنحلة. ويستعمل النحل هذا النوع في صقل وتطهير العيون السداسية المعدة لوضع البيض بها, وتعد إطارات الشمع التي تضع ملكة النحل البيض بها أكثر تعقيماً من أحدث المستشفيات^[29].

يعتمد تركيبه على نوع النبات, واختلاف لونه ورائحته وخصائصه الطبية تبعاً للمصدر وفصل

الجنبي^[30].

2.5.I المصدر الخارجي للبروبوليس:

تنتج العديد من النباتات صموغ ومواد راتنجية في أماكن الجروح أو حول البراعم أو الأوراق الجديدة، منها أشجار البلوط والهور والصنوبر وغيرها وهذه المواد تحمي هذه الأماكن من مهاجمة البكتريا والفطريات والحشرات والأعداء الأخرى. وغالباً ما يجمع نحل العسل هذه المواد ويستخدمها داخل الخلية حيث تكسب خلايا النحل حمايةً مثل التي تحمي بها النباتات^[31].



الشكل (2.I): يمثل المصدر الخارجي للبروبوليس.

6.I جني البروبوليس:

1.6.I جني البروبوليس من قبل النحل:

تقوم بعض الشغالات الحقلية التي من وظائفها جمع الرحيق وجمع البروبوليس^[23] (هذه الأخيرة متخصصة في هذه المهمة ولا تقوم بغيرها حيث أن الشغالات المتخصصة في جمع البروبوليس تكون دائماً قلة)^[22]، ثم تقوم الشغالات المنزلية التي من وظائفها تهوية الخلية ونظافتها باستقبال الرحيق وحبوب اللقاح والتي تأتي به إلى الخلية الشغالات الحقلية فتقوم الشغالات المنزلية باستلام الصمغ وتجري له عملية تعدد من أفضل العمليات التي تسهل من تشكيل الصمغ حتى يتم تطريته جيداً أو إعداده للاستعمال^[23]. حيث يتراوح متوسط كمية البروبوليس الذي يجنى من الخلية سنوياً بين 100g – 150g، وكمية ضئيلة جداً وهذا ما يفسر ارتفاع سعره^[18]. ذكر العالم Roch عام 1975م بأن النحل يستغرق وقتاً طويلاً يصل من 1-7 ساعات لجني البروبوليس^[23].

1.1.6.I العوامل اللازمة لعملية جني البروبوليس:

عملية الجني مرتبطة بعدة عوامل وقوانين ثابتة يمكننا على إثرها استخلاص نتائج مهمة هي:

1. **موقع الخلية:** ويتوقف ذلك على مدى بعد أو قرب الخلية من الأشجار حيث الخلايا الموجودة في المناطق الغابية تنتج البروبوليس باستمرار أكثر من الخلايا الموجودة في المناطق السهلية^[16].
2. **طبيعة المناخ:** يزيد جمع النحل لمادة البروبوليس في الأجواء الساخنة حيث يزداد هذا الإنتاج كلما ارتفعت درجة الحرارة خاصة ما بين الساعة 12-15 سا. هذا لأن المواد الصمغية تكون لينة وسهلة الجمع في الطقس الحار^[18].
3. **نوع النحل:** الأنواع القوقازية من النحل هي الأكثر كفاءة وأنشطها في جمع البروبوليس^[32].
4. **عمر النحل:** الحد الأدنى لعمر النحل ثمانية عشر يوماً^[33].

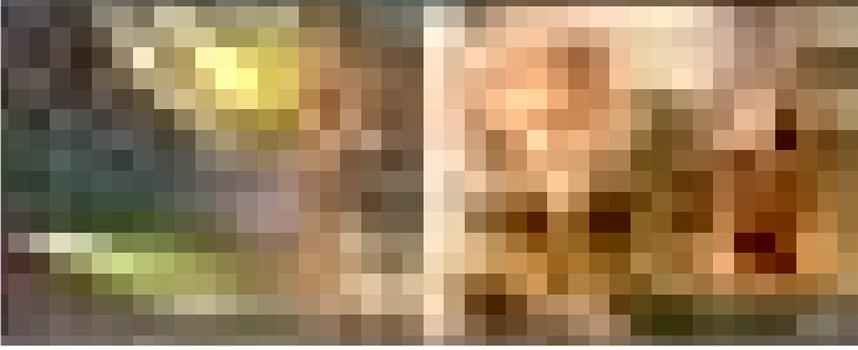
5. **العامل الموسمي:** يجمع النحل مادة البروبوليس في وقت مبكر جداً، في بداية موسم الربيع وذلك في الوقت الذي يجمع فيه حبوب الطلع، ويعود إلى جمعه ثانية في آخر الموسم بعد انتهاء موسم جمع العسل وذلك عند حلول فصل الخريف وبدء النحل في تهيئة المستوطنة لفصل الشتاء^[34]. تختلف خواص البروبوليس الطبيعية والكيميائية والعلاجية وفقاً لنوعية الأشجار التي يتم استخلاص البروبوليس منها، ولا شك في أن مصلحة الإنسان أن تتنوع هذه المصادر^[35].

2.1.6.I طريقة الجني من قبل النحل:

تستخدم النحلة فكها السفلي في اقتطاع جزء من براعم الأشجار وتنقله بأرجلها الأمامية والوسطى داخل سلة حبوب اللقاح (السلال الطلعية) المتواجدة على زوج الأرجل الخلفية^[18]. وتستمر النحلة في تكوين الراتنج حتى تصبح الحمولة مناسبة لتعود إثر ذلك إلى الخلية^[17].

كثيراً ما تكون عملية تفريغ حمولة السلة (خاصة في الجو البارد) شاقة بالنسبة للنحلة حيث يكون من الواجب عليها الانتظار لحين تطرية الحمولة (التي تتم تحت ظروف درجة حرارة مرتفعة داخل الخلية) حتى تمتلك القدرة على استخراج محتويات السلة المحبوسة بداخلها^[36].

تعمل الشغالة على تمريرها بإفرازاتها اللعابية الغنية بالخمائر, كما تضيف إليه شرائح من الشمع الذي يصنعه النحل بنسبة من 40 إلى 60% شمع، فيخرج مزيج خاص من صنع النحل تستخدمه في طريقتين: الأولى في تثبيت خلية النحل, والثانية كمادة حامية لخلية النحل, عندها تكون فترة جمع العسل نشطة و المحصول كبيرا فإن النحل يقلل من جمع البروبوليس لأن جميع شغالات الخلية ستكون مهياة لجمع الرحيق [32].



الشكل (3.I): عملية جني المواد الصمغية من براعم و جروح الأشجار.

2.6.I جني البروبوليس من قبل النحال:

يجمع مربو النحل البروبوليس بحك الإطارات, ويجب القيام بهذه العملية في الأوقات الباردة, حيث يصبح البروبوليس هشاً ويتفتت بسرعة مما يسهل عملية فصله عن حوامله أما الطقس الحار فيزيد من التصاقه بالإطارات وسيكون هناك خطر في تشويه الإطارات أثناء حكها بأداة تستعمل خصيصاً لهذا الغرض [37] (أداة الكشط البراويز التي تتضمن العيون السداسية إلى أقصى درجة ممكنة) وهذا ما يجعل العملية دقيقة جداً [38].

وتحدثت بعض المصادر على أن أفضل نوعية للبروبوليس المجني مباشرة بعد فصل الإزهار مباشرة، أي في فصل الصيف [24].

1.2.6.I الخطوات المتوجب إتباعها النحالون لجمع البروبوليس:

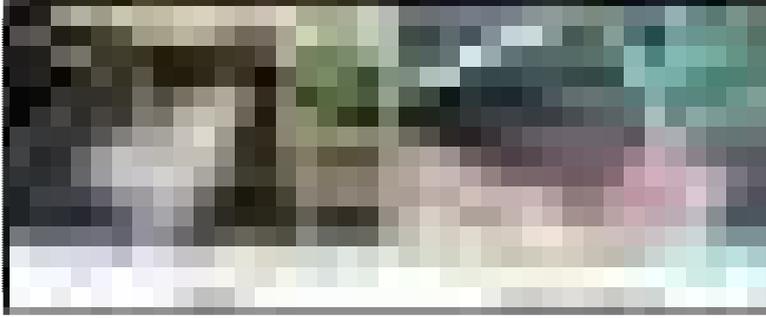
1. يرفع الغطاء الداخلي من إحدى الجوانب 3-4 مم باستخدام قطعة خشبية صغيرة توضع أسفل الغطاء الداخلي, مما يدفع النحل للقيام بسد الفراغ الحاصل بمادة البروبوليس. بعد ذلك يقوم النحال بكشط البروبوليس وإعادة الغطاء الداخلي لوضعه الطبيعي، ثم يخزن البروبوليس في البراد.

2. توسيع باب الخلية: حيث يقوم النحل بتضييقه باستعمال البروبوليس. فيقوم النحال بعد ذلك بجمع البروبوليس و حفظه.

3. يمكن كشط البروبوليس من جوانب الإطارات العلوية أو من أسفل الغطاء الداخلي، لكون النحل يتثبت أجزاء الخلية مع بعضها باستعمال البروبوليس^{[17][18]}.

2.2.6.I الاحتياطات الواجب مراعاتها أثناء إنتاج البروبوليس:

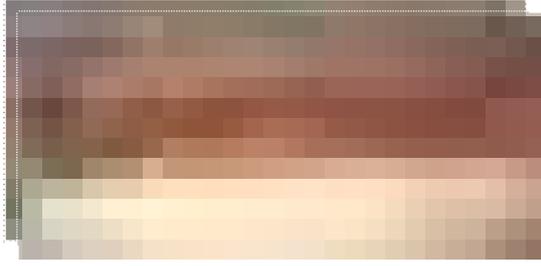
1. أن تكون الخلية المعدة لإنتاج البروبوليس قوية (10 إطارات حضنة وأكثر).
2. أن يتوفر في منطقة المنحل أشجار راتنجية مثل الحور والصنوبر والصفصاف....
3. أن يتوفر في منطقة المنحل مراعي للنحل تؤمن الغذاء الكربوهيدراتي (رحيق) والبروتيني (غبار طلع) وإلا فيجب القيام بالتغذية الاصطناعية.
4. أن يتم وضع المصائد بالتناوب لكل خلية أي بعد إزالتها يفضل أن تترك الخلية 7-10 أيام للراحة^[18].



الشكل (4.I): بروبوليس تم جنيه من طرف النحال.

7.I التخزين:

مادة البروبوليس يتم تخزينها بسهولة بدون أي شروط خاصة لمعظم أشكالها، ولكن يستحسن أن تخزن في أواني تمنع مرور الضوء، ومحكمة الإغلاق وبعيدة عن الحرارة (بعض أشكالها تستلزم هذه الشروط من أجل عملية حفظ جيدة مثل المرهم). بعض التجارب أثبتت أن تخزين هذه المادة لفترة طويلة لا ينقص من كمية المركبات الكيميائية المكونة لها ولا من فعاليتها ضد البكتيريا^[24].



الشكل (5.I): بروبوليس تم تخزينه.

ويجدر بالذكر في الأخير أن الإجتفاف للبروبوليس الحاصل بواسطة التجميد العنيف في درجة حرارة منخفضة متبوع بتصعيد تحت الفراغ يسمح بالحصول على بودرة مسامية والتي تخزن إلى أمد طويل تحت الفراغ. هذه العملية تسمح لهذه المادة بأن تحتفظ بفاعليتها ضد الميكروب وهذا ما يجعل هذه الطريقة جد هامة يجب التقيد بها أثناء استعمال هذه المادة على أعلى مستوى من الأبحاث^[24].

8.I الامتصاص والإخراج لمادة البروبوليس:

البروبوليس سريع الامتصاص من الغشاء المخاطي للجهاز الهضمي للقم والمعدة والأمعاء كما انه قابل للامتصاص عبر الجلد.... أما الإخراج فيتم إخرجه عن طريق الكبد والكليتين ولم يثبت أن له أي آثار جانبية أو أي أثر متبقي ضار (لذا يعتبر البروبوليس هدية نفسية من الله سبحانه وتعالى إلى الإنسان لأنه يعتبر مادة واعدة في العلاج والطب بفضل ما تحتويه من تركيب ومواد فعالة)^[39].

9.I الخواص الفيزيائية والكيميائية (الظاهرية):

البروبوليس هو مادة مختلفة في طبيعته, حيث تختلف نوعية البروبوليس من حيث خصائصه الفيزيائية والكيميائية باختلاف مصدره وبتباين نوعية الأشجار التي أنتجته وطبيعة اللون والرائحة, أنه يمثل حدود المعالجة بالمواد الراتنجية وسيكون من المفيد على الصعيد العلاجي, استخدام البروبوليس متعدد المصادر غني بخواص متكاملة^[18].

1.9.I الخصائص الفيزيائية للبروبوليس:

1.1.9.I الخصائص الحسية:

1. اللون:

يأخذ البروبوليس لونا بنيا مع كل تدريجات الألوان الممكنة بين الأصفر والأسود^[17], ويختلط أحيانا بألوان ضاربة إلى الاحمرار أو الاخضرار وأن الاختلاف في اللون هو انعكاس لمدى التباين في مصادر جمع البروبوليس^[18].

2. الذوق:

طعم البروبوليس مميز وعند مضغه يجب خلطه جيدا باللعاب, لتطريته وتليينه وتحقيق التجانس بين مكوناته, وبعد فترة يصير له قوام اللبان, وعادة ما يصاحب عملية المضغ بعض الصعوبات حيث يلتصق البروبوليس بالأسنان^[16], كما يبدو الطعم قويا (لاذع) في بداية الأمر لكنه يتلاشى تدريجيا أثناء المضغ^[33], وبعد مرور نصف ساعة يبدأ الإحساس بالتخدير والتنميل في اللسان^[18].

3. الرائحة:

تتميز رائحة البروبوليس بأنها عطرية قوية تجمع بين الروائح المميزة لكل من الراتنج والشمع والعسل والفانيليا, حيث يأخذ بروبوليس الحور رائحة واضحة ومميزة جدا تماثل رائحة براعم هذه الأشجار^[17]. إذا تم حرقه تفوح منه رائحة البخور وهي حساسة للغاية فيما يتعلق بالراتنجات العطرية التي يحتوي عليها^[18].

2.1.9.I الصلابة:

البروبوليس هو عبارة عن مادة متفاوتة الصلابة تبعا لدرجة الحرارة حيث^[16]:

☞ عند 15°C يكون البروبوليس صلب وقابل للتفتت^[17].

☞ عند 30°C يكون البروبوليس طريا حيث يصبح لزجا لينا سهل الالتصاق^[18].

☞ عند 60°C - 70°C ينصهر البروبوليس ويصبح سائل حيث درجة انصهاره 100°C أو أكثر^[33].

3.1.9.I الذوبانية:

البروبوليس لا يذوب في الماء و لكنه يذوب في الكحول الأثير، الأسيتون والكلوروفورم والبنزين وثلاثي كلور الإيثيلين ... الخ^[33], وباستخدام خليط من المذيبات المختلفة تتحلل تقريبا جميع مكوناته^[17].

2.9.I المكونات الكيميائية للبروبوليس الخام:

يعتبر البروبوليس مادة طبيعية ذات مصدر نباتي وبالتالي كانت مثلها مثل النباتات الطبية حيث خضعت لدراسات من قبل الكيميائيين النباتيين والصيدلة والبيولوجيين، فمن غير الخطأ إذا اعتقدنا أن السر في القدرة الشفائية التي يمتلكها البروبوليس يكمن في تنوعه والتناسق المثالي بين المواد الفعالة الموجودة به فالأبحاث العديدة التي وصلت إلى أكثر من 600 بحث تبحث في تركيب وخواص البروبوليس وهناك حالات رائعة نجح فيها العلاج بالبروبوليس حيث فشلت جميع برامج الطب التقليدي^[40].

يعتمد تركيب البروبوليس على الخصائص الجغرافية والمناخية للموقع، هذه الحقيقة تفسر التنوع الكبير لتركيبه وخاصة في المنطقة الاستوائية^[24], ومع ذلك نجد أن المكونات الكيميائية للبروبوليس ما زالت مبهمة وغير معروفة على وجه الدقة حيث بدأ الاهتمام بدراسة البروبوليس مؤخر^{[17][18]}.

لقد ذكر (Walker & Crane 1987) بأن البروبوليس يتكون من عدد كبير من المركبات، منها الفلافونويد والتي تمثل القسم الأعظم من مكونات البروبوليس، كذلك نحو 14 من مشتقات حامض السناميك و 12 من مشتقات حامض البنزويك، أما المركبات الأخرى فهي التربين وبعض الكربوهيدرات^[15].

ولقد أمكن عزل حوالي 20 مركب باستخدام مذيبات مناسبة, حيث أمكن معرفة النسب التالية^[26] :

الجدول (1.I): يمثل المكونات الأساسية للبروبوليس.

المرجع	مجموعة المركبات	المكونات الأساسية
[40]	45 – 55%: الفلافانويدات, الأحماض الفينولية, الأسترات	مواد راتنجية
[40]	25 – 35%: شمع النحل ومواد من أصل نباتي	شمع النحل
[16]	10%: مادة متطايرة	الزيوت العطرية
[33]	5%: بروتينات من غبار الطلع, حموض أمينية حرة, 16 حمض أميني, أكثر من 45.8% أرجنين وبرولين.	حبوب اللقاح (حبوب الطلع)
[24]	5%: معادن يشكل الحديد والزنك معظمها, إضافة لـ Au,Ag, Cs,Sb كيتونات, لاكتونات, حمض البنزويك, فيتامينات وسكريات	مركبات عضوية ومعدنية

و المخطط التالي يمثل نسب مكونات البروبوليس:



المنحنى (1.I): يمثل نسب مكونات الأساسية للبروبوليس.

3.9.I مكونات البروبوليس المستخلصة:

إن تركيب الكيميائي للبروبوليس معقد جدا (كباقي منتجات النحل التي يعجز العلم عن تحديد كافة مكوناتها)، لم تستطع التجارب المخبرية حتى الآن معرفته^[39]، كما لاحظ العلماء أن المواد المؤلفة للبروبوليس تختلف من خلية نحل إلى أخرى^[15]، حيث شوهد أنه في كل تحليل هناك مركبات جديدة مكتشفة وذلك حسب مصادر الراتنج التي يجمع منها النحل البروبوليس. لقد تم تحديد أكثر من 300 مركب اكتشف حتى الآن، كما تم دراسة تأثيرات هذه المركبات ومدى فعاليتها^[16]. ومن أهم المركبات التي اكتشفت هي:

البولي فينول، والفينول ألدهايد، والكينين، والكومارين، والأحماض الأمينية وغيرها. كما أظهرت التحاليل الإضافية قائمة هائلة من المكونات منها السيناميك أسيد ومركبات السيناميل والفنيلين والكريسين والفالانجين والاكاسيتين والكامبيغريد والرامنوسيتيرين والبينوستوربين وحامض الكافيينك والتيتوكريسين و الايزالين والبنيسيمبرين وحامض الفيرونيك واسكلبتول، سكوبوليتول^{[32][33]}.

المواد المعدنية:

(المنيوم - فضة - باريومكروم - كوبالت - نحاس - حديد - مغنسيوم - منغنيز - موليبديوم - فانديوم - زنك - الباريوم - الكالسيوم - الكروم - الكبريت - النيك - الرصاص - السليسيوم - السترونشيوم - الفاناديوم -

البورون -الرصاص والسيلينيوم) وكلها مواد تلعب دوراً رئيسياً في الحياة للعديد من التحولات الغذائية الخلوية^[32].

كما وجد (Haydak و plamer عام 1942م) أن البروبوليس يحتوي على فيتامينات C, B, B₂, B₁, A, E، وحمض النيكوتينك، وحمض البتوسينيك كما يحتوي على أحماض أمينية مثل البرولين^[39].

كما فيتامينات كاروتين مولد فيتامين أو بعض فيتامينات مجموعة ب وخاصة B₃.

كما مكونات مختلفة أخرى زانثوريول - بتروثلين - لاكتونات - سكريات معقدة - أحماض أمينية^[39].

كما وقد وجدت المكونات التالية: استرات الأحماض الفولوية 72.2% - والأحماض الفينولية 1.1% - والأحماض الأليفاتية 2.4% - والهيدروكالكونون 6.5% والكولكونات 1.7% والفلافونونات 1.9% والفلانونات 4.6% ومشتقات الترايهدروفيوران 0.7%^[15].

ونظراً لوجود العديد من الأساسيات النشطة في البروبوليس المستخلص من النباتات التي أفرزت، فإن مفعول ومجالات استعماله الطبية واسعة جداً، فمثلاً المتعدد الفينولات وأهم تأثير له قدرته المضادة للأكسدة^[39]. ومن المؤكد أن المركبات الكثيرة التي تم عزلها من البروبوليس لا تمثل إلا القليل من الكثير وتحتاج إلى جهود كثيرة لمعرفة المزيد عنها.

10.I استخدام البروبوليس:

1.10.I استخدام النحل للعكبر:

السؤال الذي يطرح نفسه هو، كيف يمكن لهذا العدد الكبير من الأفراد (يبلغ وسطياً عدد طائفة النحل 50000 نحلة) أن يعيش في هذا الازدحام ويعمل باستمرار دون أن يصاب بمرض أو عدوى؟ وذلك ضمن بيئة تصل حرارتها إلى 35°C ورطوبة تصل إلى 90% وهي أفضل بيئة لتطور كل أنواع البكتريا والفطور والتعفنات ومع ذلك يبقى جو الخلية خالٍ من هذه الميكروبات كيف يستطيع النحل الحفاظ على العسل لسنوات دون أن يفسد؟ الجواب هو البروبوليس^[15]. يستخدم النحل البروبوليس في عدة وجوه نلخصها فيما يلي:

كـ سد الشقوق ورأب التصدعات التي قد تحدث في الخلية لإعادة أحكام بنيتها^[18].

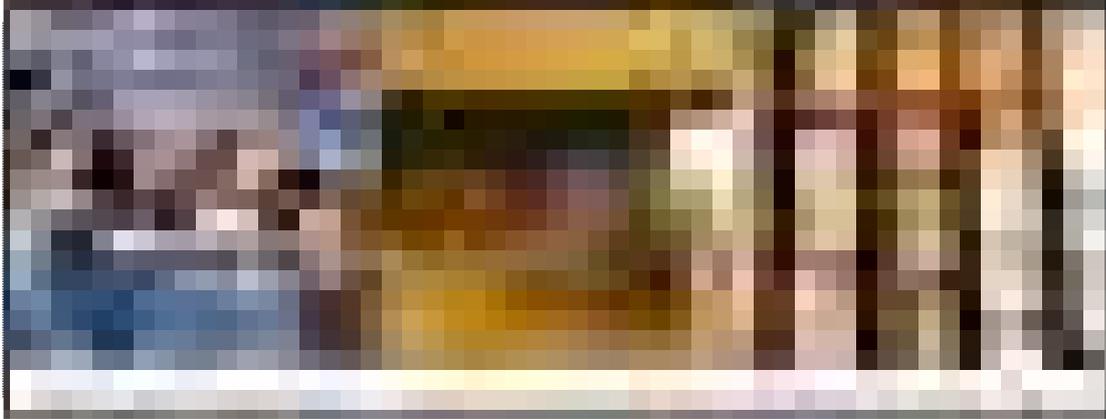
كـ طلاء العيون السداسية بطبقة رقيقة لتضع الملكة بيوضا فيها^[15].

كـ لصق البراويز بأحكام. هذا يسبب إزعاجا كبيرا لمربي النحل عند استخلاص محصول العسل وغيره من المنتجات^[17].

كـ عند حلول فصل الشتاء يقوم النحل بتضييق فتحة الدخول والخروج لتجنب الهواء البارد ولضمان تنظيم الحرارة داخل الخلية^[16].

كـ يبني النحل بالاستعانة بالبروبوليس حصنا حقيقيا خلف فتحة الطيران بمسافة قليلة، بغرض صد هجمات الحيوانات غير المرغوب فيها مثل الفئران والضفادع^[18].

كـ يستعملها حشرات كبيرة الحجم التي يقتلها داخل خليتها، ويصعب عليه إخراجها لكبر حجمها، فيقدم على تغليفها بالكامل بالبروبوليس، منعا لتحللها وصدور روائح كريهة داخل الخلية^[41].



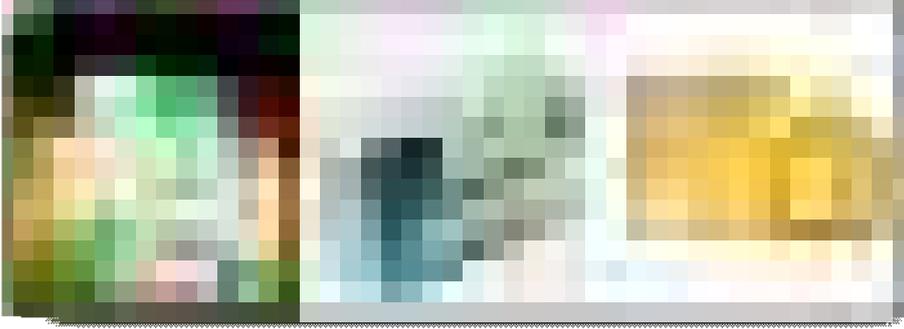
الشكل (6.1): استخدامات النحل للبروبوليس.

2.10.I استخدام البروبوليس من قبل النحال:

ويستخدم على نطاق واسع في العديد من المجالات مثل:

1.2.10.I مجال التجميل:

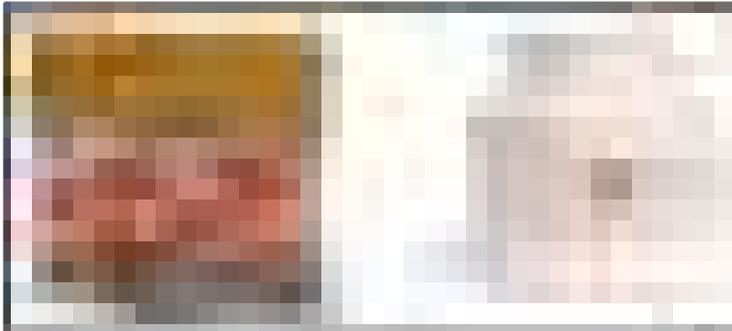
يستخدم البروبوليس بشكل واسع في صناعة مستحضرات التجميل كما تساعد آثاره على تجديد الأنسجة الجلدية مثال على مستحضر تجميلي: يصنع منه سائل حليبي lotion لتنظيف البشرة^[33].



الشكل (7.I): استخدامات للبروبوليس في صناعة مستحضرات التجميل

2.2.10.I التغذية:

يستخدم البروبوليس كعامل منكه مفضل في الطعام ويمكن أن يضاف إلى المواد الغذائية نظرا للرائحة والنكهة الذي يتمتع بها وخير مثال على ذلك الحلويات والمشروبات، كما يستعمل في برامج الحماية الغذائية^[24]، وكذلك يعتبر كمادة حافظة في مواد معلبة والتعليق الغذائي^[33].

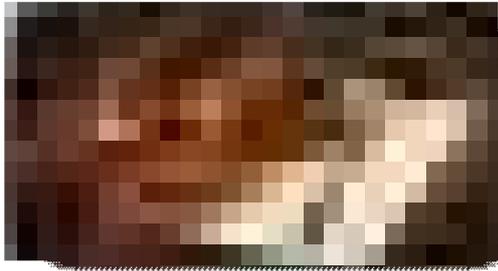


الشكل (8.I): استخدامات للبروبوليس في التغذية

3.2.10.I الصناعة:

في القرون الماضية استخدم المستخلص الكحولي للبروبوليس لحفظ بريق أوراق الذهب التي يتم بها التماثيل والزخارف المعمارية والحلي، ليظل هذا البريق دوماً لأزمنة طويلة، وغالبا ما أضيف البروبوليس المذاب في الكحول والتراتينين، للفضة المصهورة والسبائك لتعطي لها المظهر البراق الجلي، والمعروف أيضا أن الجلد المعامل بالبروبوليس دائما ما يغطيه بريقا أعظم، وقد سجل أن الخشب المعامل بخليط من البروبوليس المخفف مع الزيت والتراتينين يصبح مقاوما لأصعب حالات الجليد والبرد وما زال البروبوليس هذا كثير الطلب^[22].

كما أن البروبوليس ولوقت طويل، يعتبر هو المادة الخام المفضلة التي منحت آلات الكمان التي كان يصنعها Stradivarius سمعة لا مثيل لها نظرا لما كانت تتمتع به من نوعية، حيث كان يصنع بنفسه ورنيش البروبوليس لدهان وتلميع آلاته الموسيقية.



الشكل (9.I): استخدامات للبروبوليس في الصناعة

11.I طرق استخدام البروبوليس:

1.11.I الاستخدام الداخلي:

1. البروبوليس الخام الطبيعي: يستخدم على صورة حبيبات أو بودره أو كبسولات ذات وزن 1g. حيث أن الدكتور ملاديتون ينصح بهذا النوع من الاستخدام في حالة القرحة، الحموضة، القولون والأورام. 1g البروبوليس خام 3 مرات باليوم وقبل الطعام بساعتين^[15].

2. خلاصة كحولية للبروبوليس: تركيز 10-20-30% وطريقة الاستخدام : 30 قطرة في كوب من الحليب أو الزهورات، شاي، 3 مرات باليوم وقبل الطعام بساعتين^[32].

3. معجون البروبوليس: يتركب من البروبوليس والعسل والسمن البقري أو النباتي تركيز 10-15-30% يمكن تناوله مع الخبز المحمص، ثلاث مرات باليوم وقبل الطعام بساعتين^[25].

2.11.I الاستخدام الخارجي:

تستخدم المراهم الرطبة أو الجافة وأيضاً الكمادات من خلاصات كحولية للبروبوليس مع الماء. ويستخدم البروبوليس بطريقة البخاخ^[32].

12.I الأشكال الصيدلانية للبروبوليس :

1.12.I الشكل السائل للبروبوليس:

☞ خلاصه كحوليه (البروبوليس الخام مع كحول ايثيلي 95%).

☞ بروبوليس مائي (الطبقة الطينية الناتجة من الخلاصة الكحولية مع الماء) يمزج ثم ينقع ويرشح ويبخر المذيب الكحولي.

☞ مستحلب كحولي (خلاصة كحولية للبروبوليس 35% مع الماء).

☞ مستحلب دهني (خلاصه كحوليه للبروبوليس 35% مع سمن نباتي أو فيتامين (A)).

☞ خلاصه مائيه للبروبوليس 35 g (عكبر خام قطع صغيرة مع 355 ml ماء) توضع ضمن وعاء محكم الإغلاق في حمام مائي بدرجة 55 C° لمدة 45 min، يترك ليبرد ثم يُجمع الشمع، وتكرر العملية مرة ثانية^[32].

2.12.I الشكل الطري للبروبوليس:

☞ استخدام المركبات من البروبوليس (مركبات برطوبة 5% و مركبات برطوبة 25%).

☞ معاجين من البروبوليس (بروبوليس مطحون مع عسل وسمن نباتي أو بقري).

☞ مرهم البروبوليس مع حمض الساليسيليك^[25].

الشكل الصلب للبروبوليس:

☞ الاستخدام الداخلي: (بروبوليس خام ثلاث مرات باليوم الكمية المقترحة 50-200 mg).

☞ الاستخدام الخارجي: (يستخدم البروبوليس الخام على شكل رقائق دافئة توضع على المنطقة

المريضة) [18].



الشكل (10.I): الشكل السائل والشكل الطري للبروبوليس.

13.I البروبوليس مصدر واعد للشفاء (فوائده الطبية):

يمتلك البروبوليس الكثير من الخصائص البيولوجية الحيوية والصيدلانية العلاجية, واتسع خلال السنوات القليلة الماضية نطاق دراسة آليات في المختبرات وعلى الخلايا الحية. وعلى الرغم من هذا الاهتمام العلمي للبحث في مركباته الكيميائية, فإننا نفتقر إلى الدراسات الإكلينيكية للبحث في تأثيراته على البشر أنفسهم. وبالمراجعة لمجمل الأبحاث العلمية التي تم نشرها حول البروبوليس, نلاحظ أن له خصائص علاجية في غاية الأهمية. وما نحن بحاجة إليه هو تقييم التأثيرات الصحية الواعدة للبروبوليس على البشر الأصحاء والمرضى [40], وهو ما يجب على شركات الأدوية الاهتمام به, حيث بعد تلك الأبحاث العلمية التي أجريت على صموغ النحل اكتشف أنه يعالج الكثير من الأمراض بكفاءة عالية نذكر منها ما يلي [22][23][27]:

- | | | |
|----------------------------|-------------------------|--------------------------|
| ☞ مصاد للأكسدة. | ☞ علاج الأوعية الدموية. | ☞ علاج الأمراض الجلدية. |
| ☞ علاج آلام الأذن والحنجرة | ☞ علاج مرض الجدري. | ☞ علاج الدمامل و الجروح. |
| ☞ تقوية جهاز المناعة. | ☞ علاج أنواع السرطانات. | ☞ علاج فقر الدم. |

علاج أمراض الصدر.	مضاد للفيروسات الكبدية.	علاج الصداع.
علاج قرحة المعدة.	علاج الكلى والمثانة.	تجدد الأنسجة في الجروح.
علاج القولون	مضاد للبكتيريا و النزيف.	علاج أمراض اللثة.
علاج آثار الإشعاعات.	علاج التهابات اللوزتين.	علاج تصلب الأنسجة.
علاج بحة الصوت.	علاج الالتهاب المراري.	علاج ضعف الدورة الدموية.
علاج الثآليل.	مقو عام لجسم الإنسان.	مضاد للحموضة.
مانع للتعفن- مطهر.	علاج التهابات العين.	علاج أنواع الالتهابات.
التهاب المفاصل.	علاج حب الشباب.	

لقد كانت كل برامج البحوث وما فيها من حالات شفاء المتعددة وثيقة الصلة تماما باستخدام مادة البروبوليس وحدها، وقد شملت هذه البحوث آلاف الحالات، وكانت ذات غرض رئيسي واحد فقط والحصول على مادة طبيعية ذات تأثير عظيم ضد أعداد كبيرة من الأمراض المذكورة سلفاً^[22]، وبصفة عامة نحن نرى أن أعداد الأشخاص اللذين يستعملون البروبوليس في زيادة مستمرة يوماً بعد يوم.

المراجع

المراجع العربية:

- [4]. جميل الدرياشي- المرشد في تربية النحل- برنامج تدريب النساء الفقيرات في قرى الخليل على تربية النحل-المركز الفلسطيني للاتصالات والسياسات التنموية-2011 ص10.
- [15]. د. حسان شمسي باشا وفي العكبر أسرار وإعجاز رابطة أدباء الشام (255). ص 1-10.
- [17]. مهندس زراعي، أيمن الشريبي-عسل النحل السائل الذهبي و إكسير الحياة-مكتبة ابن سينا القاهرة ص 42-49.
- [18]. عارف سالم حمزة- تربية النحل ومنتجات الخلية في الغذاء و المعالجة (العسل-الرحيق-الشمع-حبوب الطلع-غذاء الملكة-العكبر(البروبوليس)-سم النحل)-منشورات علاء الدين-دمشق الطبعة الأولى 1990م ص 207-215.
- [19]. قسم وقاية النبات و الحجز الزراعي- تربية النحل- هيئة العامة لشؤون الزراعة و الثروة السمكية للإرشاد الزراعي 1408-1986م.
- [20]. المهندس الزراعي ماهر الطباع عضو الرابطة الدولية لبحوث النحل- المضاد الحيوي الطبيعي / الدواء الشافي الطبيعي-سلسة كتيبات تثقيفية لشركة معجزة الشفاء(2012).
- [22]. أ.د. عثمان مصطفى عسل أستاذ الحشرات بكلية الزراعة جامعة المنوفية- النحلأمة!!!!!!-الدار العالمية للنشر و التوزيع-محطة مصر- الإسكندرية- الطبعة الأولى 1428هـ-2008م ص 272-280.
- [23]. محمد السيد عطية- سر عسل النحل غذاء وشفاء- دار الغد الجديد القاهرة- المنصورة الطبعة الأولى 1430م-2009م ص 97-98.
- [24]. ربيعي عبدالكريم- المساهمة في دراسة الفعالية المضادة للأوكسدة لمستخلصات بروبوليس جنوب الجزائر بالطرق الكيميائية و الكهروكيميائية-رسالة ماجستير جامعة قاصدي مرباح و رقلة (2009).
- [25]. د. عبد الله حاطوم " العلاج بمنتجات النحل – العكبر مستحضر دوائي " دمشق (2008).
- [26]. هيام رزق. معصومة علامة- أسرار العسل العجينة- دار الهدى -حارة حريك, خلف مستشفى الساحل, قرب مدرسة المصطفى بناية بدير ص 52-54.
- [27]. منصور عبد الحكيم- التداوي و الشفاء بعسل النحل- دار الكتاب العربي. دمشق-القاهرة- الطبعة الأولى 2008م ص 113-115.
- [28]. نيكولا برادبير-تربية النحل كإحدى الطرق المستدامة لتوفير سبل العيش- قسم نظم الدعم الزراعي منظمة الأغذية و الزراعة للأمم المتحدة –روما (2004) ص 33.
- [29]. د. محمد عباس عبد اللطيف-عالم النحل- جامعة الإسكندرية (1994).
- [30]. د. عبد الله حاطوم " العلاج بمنتجات النحل – العكبر مستحضر دوائي.

[32]. د. عبد الباسط محمد السيد -موسوعة النحل تربية-إعجاز-شفاء- ألفا للنشر و التوزيع- مصر-الطبعة الاولى1432هـ-2011م-ص603-621.

[37]. د.علي المصري مملكة العسل ومنتجاته دار الاوراسية للنشر و التوزيع 2012

[39]. د.صبحي إبراهيم قاسم احمد " النحلة طبيبتنا" إيداع برقم 19815, (2004).

المراجع الاجنبية:

[1]. Fenge Li.; Suresh Awwale.; Yasuhiro Tezuka et Shigetoshi Kadota. 2008. Cytotoxic constituents from brazilian red prrpolis and their structure- acivity relationship .*Biorganique et Medicinal chemistry* 16.

[2]. Docteur Yves Donadieu, les produit de la ruche3 .ième Edition 1981.

[3]. Pierre Jean prost.; Pierre Medori Raul. 1984. Apiculture .*Ed J. B. Baillière*.

[5]. Erkmén O.; Özcan MM. 2008. Antimicrobial effects of Turkish propolis, pollen and laurel on spoilage and pathogenic food-related microorganisms .*J Med Food* 11: 92-587.

[6]. Liu CF, Lin CC, Lin MH, et al. (2002) Cytoprotection by propolis ethanol extract of acute absolute ethanol-induced gastric mucosal lesions .*Am J Chin Med* 30: 245-255.

[7]. Pavilonis A, Baranauskas A, Puidokaite L, et al. (2008) Antimicrobial activity of soft and purified propolis extracts .*Medicina (Kaunas)* 44.

[8]. Esin Basim .; Huseyin Basim b.; Musa Ozcan. 2006. Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens .*Journal of Food Engineering* . 77

[9] Sibel Silici.; Mehmet Unlu.; Gülhan Vardar-Ünlü. 2007. Antibacterial activity and phytochemical evidence for the plant origin of Turkish propolis from different regions .*World J Microbiol Biotechnol* (2007) 23.

[10]. Eun-Hee Park.; Sun-Hee Kim et Soo-Sun Park. 1996. Anti-inflammatory Activity of Propolis .*Arch. Pharm. Res. VoL19, No.5, pp. 337-341*.

[11]. Marcucci, M.; 1995. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity .*Apidologie*, 26, 83.99.

[12]. M. Amorós.; F. Sauvager. ; L. Girre. ; M. Cormier. 1992. In vitro antiviral activity of propolis .*Apidologie*. 23.

- [13]. Feng Li.; Suresch Awale.; Yasuhiro Tezuka et Shigetoshi Kadota .2008 .Cytotoxic constituent from brazilian red propolis and their structure-activity relationship .*Bioorganic et medicinal Chemistry* 16.
- [14]. Arjun H. Banskota.; Yasuhiro Tezuka.; Jeevan K. Prasain.; Katsumichi Matsushige;. Ikuo Saiki et Shigetoshi Kadota. 2004. Chemical Constituents of Brazilian Propolis and Their Cytotoxic Activities .*J. Agric. Food Chem.*, 52.
- [16] MOUDIR Naima; Les polyphénols de la propolis algérienne En vue de l'obtention du Diplôme de: Magister en Chimie. Université Mohamed Boudiaf, M'sila (2004).
- [21]. Wulf and C. Nagel, J. Chromatogr., 116 (1976) 271.
- [31]. Akopyan, Z.M.; Shakaryan, G.A. and Danielyan, S.G. (1970): Sensitivity of microorganism to propolis in some districts of the Armenian S.S.R. *Biol. Zh. Armeniya*, 23(9): 70-74.
- [33]. FERHOUM Fatiha- Analyses physico chimiques de la propolis locale selon les étages bioclimatiques et les deux races d'abeille locales (*Apis mellifica intermissa* et *Apis mellifica sahariensis*) MEMOIRE DE MAGISTER Option : Technologie Alimentaire- Université M'HAMED BOUGARA Boumerdès- (2009-2010).
- [34]. Segueni Narimane- Contribution à l'étude de la composition chimique et des Propriétés biologiques de la propolis -le diplôme de Doctorat en Science-En Pharmacochimie Option :Chimie pharmaceutique-Université Mentouri de Constantine -(2011).
- [35]. FARRÉ R, FRASQUET I, SÁNCHEZ A- Propolis and human health-Dpto. de Medicina Preventiva y Salud Pública, Bromatología, Toxicología y Medicina Legal. Facultad de Farmacia de la Universidad de Valencia. *Avgda*-(2004) p 1-23.
- [36]. Michael Simone-Finstrom, Marla Spivak-Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees-Article published by EDP Sciences-Apidologie 41 (2010) 295–311-c_ INRA/DIB-AGIB/EDP Sciences, 2010 p 1-17.
- [38]. Santana perez E. Lugones Botell M; Vaginal parasites and acute. Cervicitis: local tretment with propolis. [Article en espagnol, résumé en anglais]. 1995 Jan-Jun.
- [40]. Le Traité Rustica de l'apiculture de Henri Clément, Yves le contre, jean. Marie Barbancon et Bernard Vaissière. Rustica éditions (26 Aout 2011) p: 373-374.
- [41]. Walker, Matt (23 July 2009). "Honeybees sterilise their hives". *BBC News*. Retrieved 2009-07-24.

الفصل الثاني

المركبات الفعالة للبروبوليس

II. المركبات الفينولية الطبيعية:

1. II مقدمة:

لابد وانك سمعت عن مانعات التأكسد في تكوين حميتك الصحية, لكن هل سمعت عن عديدات الفينولات^[1]؟ حيث أن مما لا شك فيه أن الإنسان قد عرف المواد المستخلصة من النباتات والحيوانات منذ زمن، وعلى الرغم من أن منفعة هذه المستخلصات لا تقدر بثمن للإنسان على مر العصور، إلا أنه لم تكن لديه الخبرة الجيدة في طرق استخلاص هذه المواد بدرجة تمكنه من الحصول على مواد نقية^[2].

ولذلك فإن ما عرفه كان قليلاً في عدده. وتشكل هذه المستخلصات في الوقت الراهن حقلاً دراسياً شاسع المناهج من ناحية تعددها، وتباين استخدامها، الأمر الذي يستدعي دراستها في مراجع متخصصة على هيئة مجموعات وفقاً لهذه الهياكل^[3]. ومن ناحية تعدد النقاط التي يتطرق إليها الدارس بصددتها، وذلك بفضل الله ثم بفضل الإنسان الذي وفر لنفسه وسائل التحليل المختلفة التي تمكنه من اكتشاف العديد منها^[4].

نجد القياس الأول للمواد المستخلصة من النباتات، المواد الأيضية الثانوية وتستعمل خاصة في العلاج، نجد منها القلويدات، التربينات وعديدات الفينولات^[5]، وتعتبر هذه الأخيرة موضوع دراستنا في هذا المحور.

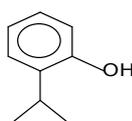
2. II تعريف المركبات الفينولية الطبيعية:

تمثل عديدات الفينول قسماً واسعاً من المركبات النباتية الكيميائية (Phytochemical) حيث تشكل هذه الأخيرة مجموعة كبيرة من المتحولات الغذائية (الأبيض) الثانوية، وهي واسعة الانتشار في المملكة النباتية وذات تراكيب متعددة حيث أنها تشكل مجموعة من العائلات يصعب تفكيكها إلى مركبات بسيطة^[6].

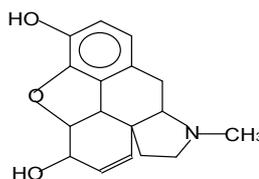
تشارك المركبات الفينولية في الدفاع ضد أي اعتداء خارجي^[7]، من أجل هذا فإن نسبة % 80 من هذه المركبات توجد على مستوى أنسجة القشرة للفواكه. وعموماً يرجع لون النبات والثمار إلى صبغات هذه المركبات وهي المسؤولة عن ظهور الألوان (أصفر، أخضر، برتقالي، أحمر) في النبات^[8].

العنصر الأساسي في تشكيل هذه المركبات هو وجود على الأقل نواة بنزينية واحدة (حلقة عطرية) مرتبطة بمجموعة هيدروكسيل حرة أو مستبدلة مع مجموعات أخرى (إيثر، أستر، سكر)^[12]. غير أن تعريفًا كيميائيًا صرفًا للفينولات بهذه الطريقة يعد غير كافي لتشخيص المركبات الفينولية النباتية إذ أن هناك منتجات أيضًا ثانوية أخرى تشمل هذا التعريف أيضًا ولكنها تنتمي إلى مجموعات فيتو كيميائية مختلفة مثل بعض القلويدات كالمورفين وبعض التربينات كالتيمول والتي تضم في بنائها حلقة بنزينية ومجموعة هيدروكسيل فينولية، مما يستوجب إدخال شرط الاصطناع الحيوي لحصر حدود هذه المجموعة وعليه ليكون تعريف المركبات الفينولية أكثر دقة يجب أن يكون على النحو التالي^[9]:

مشتق غير أزوتي حاوي على حلقة بنزين أو أكثر تحمل مجموعة هيدروكسيل حرة أو مرتبطة بوظيفة أخرى تكونت حلقاتها العطرية إما من أيض حمض شيكيميك acide shikimique أو عديد الأستات polyacetates (Mursu و آخرون 2007)^{[10][11]}.



Thymol



Morphie

الشكل (1.II): نموذجين لمركبين غير فينولين.

حيث تختلف أقسام عديدات الفينولات حسب درجة تشبعها و أكسدتها (وجود الأكسجين) في الحلقة الوسطى^[12]. تشترك جميعها في وجود حلقة عطرية أو أكثر (O'Connell و Foxa, 2001)^[13].

3.II تصنيف المركبات الفينولية الطبيعية:

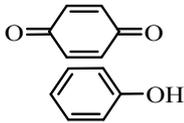
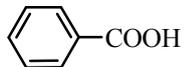
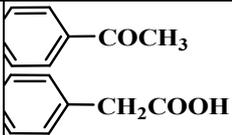
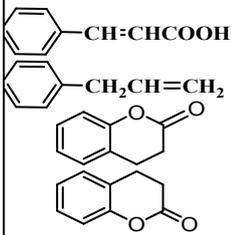
إن تصنيف المركبات الفينولية الطبيعية مقترحة من طرف العالم HARBORNE عام 1989 والعالم Macheix 1990 حيث وجدوا أن قسم المركبات الفينولية تضم حوالي 8000 مركب مقسمة إلى عدة أصناف و أهم هذه المركبات هي:

☞ الأحماض الفينولية: الأحماض الهيدروبنزويك, الأحماض الهيدروسيناميك.

☞ الفلافانويدات.

كما التانينات, اللقنينات. بالإضافة إلى المركبات الأقل كثافة: الكومارينات, الستلبيينات[14].
 لن يتم وصفها بالتفصيل هنا, والجدول التالي يوضح البنى الأساسية لأهم المركبات الفينولية الطبيعية[14][15]:

الجدول(1.II): الهيكل الكربوني لبعض أصناف المركبات الفينولية.

رقم C	الهيكل الأساسي	الصف	البنية الأساسية	المصدر
6	C ₆	الفينولات البسيطة البنزوكينونات		العديد من أنواع النباتات
7	C ₆ - C ₁	الأحماض الفينولية الهيدروكسينز ويك		التوابل- الفاولة- الفجل-البصل
8	C ₆ - C ₂	اسيتوفينون- أحماض الفينيلاسيتيك		/
9	C ₆ - C ₃	أحماض السيناميك فينيلروبان, الكومارينات ازوكومارينات		أشجار الحمضيات البطاطا, التفاح, العنب, لكيوي, الخوخ, الكرز, التفاح

الجوز		النافتوكينون	$C_6 - C_4$	10
/		لكسانثون	$C_6 - C_1 - C_6$	13
الكرمة		الستلبيينات الانتراكينون	$C_6 - C_2 - C_6$	14
الفواكه-الخضر- الزهور- الروائح- الفواكه الحمراء-		الفلافونويدات الايزوفلافونويدات	$C_6 - C_3 - C_6$	15
الصنوبر		اللقتين	$(C_6 - C_3)_2$	18
/		بي فلافونويدات	$(C_6 - C_3 - C_6)_2$	30
الخشب, نوى الفاكهة		اللقتين الكاتيشولمقنين	$(C_6 - C_3)_n$ $(C_6)_n$	n
العنب الأحمر- المانغو- الفواكهة الحمراء-	/	التاينينات	$(C_{15})_n$ $(C_6 - C_3 - C_6)_n$	n

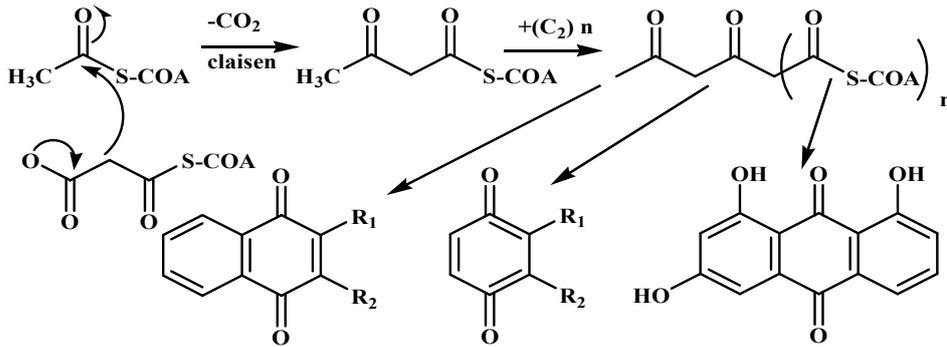
4.II عديدات الفينول وفعاليتها الحيوية (مصدرها):

توجد عديدات الفينول في العديد من الأطعمة ذات المصدر النباتي وتحديداً : الفواكه, حيث يمكن أن تصل إلى 100-500mg في بعض الفواكه مثل : العنب، الكرز، المشروبات (القهوة، النبيذ) والشوكولاتة, بينما توجد بصورة أقل في الخضر والحبوب، حيث تحتوي الخضر على ما يقارب 100-25mg/g^[16], كما توجد أيضاً في التوت البري والكاكاو, نجد أيضاً أن الباقوليات والمكسرات تحتوي على عديدات الفينول^[17].

بالإضافة إلى أن المركبات الفينولية الطبيعية متواجدة في جذور وسيقان الأزهار و أوراق النباتات, كما تعد الفواكه الغير الناضجة غنية جداً بالأحماض الفينولية مثل (les flavanols) يمكن الحصول عليها من البصل و التفاح, نجد كذلك (les flavanones) في الحمضيات و (isoflavanes) في الشاي^[18].

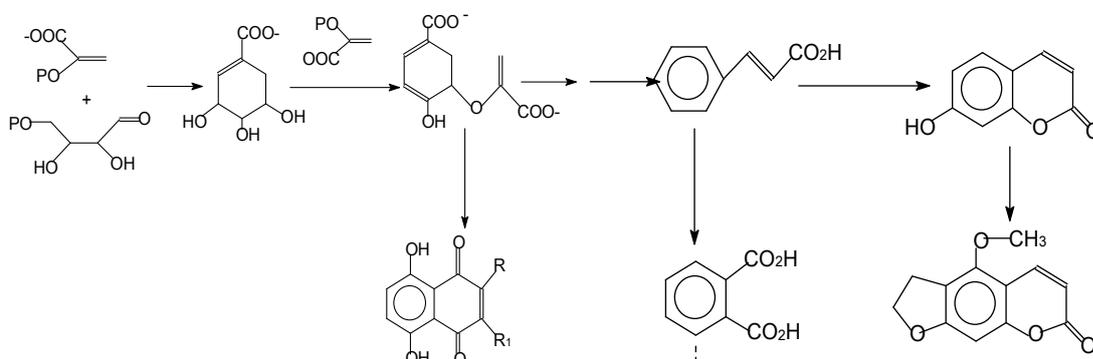
5.II الاصطناع الحيوي الأولى لمركبات الفينولية (مصدر المركبات الفينولية):

1.5.II الاصطناع انطلاقاً من عديد الأسيتات^[17]:



الشكل (2.II): تصنيع الفينولات انطلاقاً من عديد الأسيتات.

2.5.II الاصطناع انطلاقا من حمض شيكيميك: كما هو موضح في الشكل (3.II)^[17]:



الشكل (3.II): تصنيع الفينولات انطلاقا من حمض شيكيميك.

6.II دراسة تصنيف المركبات الفينولية الطبيعية (أقسامها):

تعتبر المكونات الكيميائية الفعالة الناتجة من الأيض الثانوية ذات فاعلية علاجية لكثير من الأمراض وسرعة شفاؤها وإزالة أعراضها لذلك تسمى هذه المنتجات بالمواد الفعالة كما ذكرنا سابقا أن أهم هذه المواد هي^[19]: الأحماض الفينولية، الفلافونويدات والتانينات. ويمكن تقسيم المركبات الفينولية تبعا لتواجدها وتعقيدها حسب Harborne (1964) إلى^[18]:

- ☒ عائلة المركبات الفينولية النباتية قليلة الانتشار.
- ☒ عائلة المركبات الفينولية النباتية كثيرة الانتشار.
- ☒ المركبات الفينولية النباتية المتواجدة في الطبيعة على صورة بوليميرات.

1.6.II عائلة المركبات الفينولية قليلة الانتشار:

1.1.6.II المركبات الفينولية من الشكل C_6 , C_6-C_1 , C_6-C_2 :

وهي مركبات ذات هياكل بسيطة قليلة الانتشار في الطبيعة الشكل (4.II)، وتعد في معظم الأحيان مكونات للزيوت الطيارة وهي في الغالب كحولات، ألدهيدات، كيتونات^[20].

2.6.II عائلة المركبات الفينولية الواسعة الانتشار (الفينولات المونوميرية):

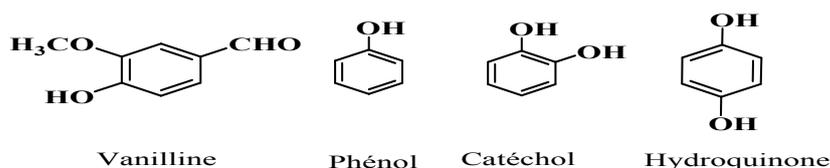
1.2.6.II الأحماض الفينولية:

إن كلمة حمض فينولي توافق المركبات العضوية التي تحتوي على وظيفة كربوكسيلية ووظيفة هيدروكسية في الكيمياء النباتية^[23]، حيث هذه التسمية تخصص فقط أحماض فينولية بسيطة و أحماض مشتقة من حمض البنزويك و أحماض فينولية مشتقة من حمض السيناميك^[24]، حيث الأحماض الفينولية هي مركبات قابلة للذوبان في المذيبات العضوية القطبية^[25]، مع أن هذه المركبات تملك الخاصية الفاعلية المضادة للأكسدة^[26].



1.1.2.6.II الأحماض الفينولية البسيطة:

يعتبر هذا القسم نادرا ما عدا مركبات Hydroquinone التي توجد في العديد من العائلات النباتية، حيث المركبات ذات الهيكل (C₆) والتي تحوي حلقة بنزين مرتبطة بواحدة أو أكثر من مجموعات الهيدروكسيل ومن ضمنها الفينول نفسه، ومركبات أخرى قليلة الانتشار في الطبيعة منها ما يلي^[27]:

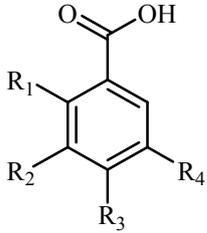


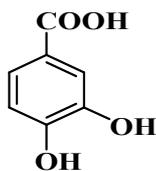
الشكل (7.II): بنية بعض الفينولات البسيطة.

2.1.2.6.II الأحماض الفينولية المشتقة من حمض البنزويك:

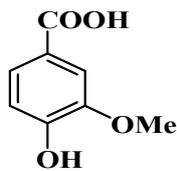
تمتلك الأحماض الفينولية الهيكل (C₆-C₁) والمشتقات الهيدروكسيلية لحمض البنزويك تعد واسعة الانتشار سواء مرتبطة أو حرة أو في حالة سكريات أو أسترات (حمض الغاليك)^[28].

الجدول(2.II): الأحماض الفينولية المشتقة من حامض البنزويك.

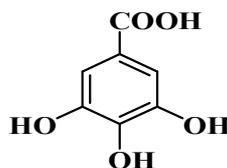
الأحماض الفينولية	R ₄	R ₂	الهيكل الأساسية
Acide benzoïque	H	H	
Acide p-hydroxybenzoïque	H	H	
Acide protocatechique	H	OH	
Acide vanillique	H	OCH ₃	
Acide gallique	OH	OH	
Acide syringique	OCH ₃	OCH ₃	
Acide salicylique	H	H	
Acide gentisique	OH	H	



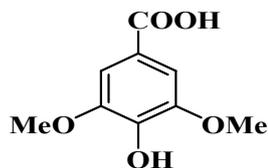
Acide protocatéchique



Acide Vanillique



Acide gallique



Acide Syringique

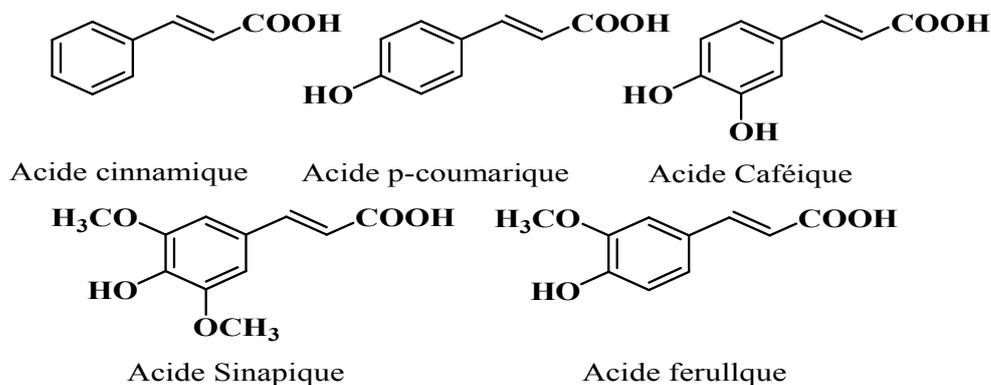
الشكل (8.II): بعض النماذج لأحماض البنزويك.

3.1.2.6.II الأحماض الفينولية المشتقة من حمض السيناميك:

أغلبية الأحماض الفينولية من الهيكل (C₆-C₃) حيث تنتشر الأحماض المشتقة من حمض السيناميك بكثرة ويعتبر حمض ferulic وحمض caffeic الأنواع الرئيسية الأكثر انتشارا لها يتواجد هذا الأخير بكثرة في القهوة، أما حمض ferulic فيتواجد في الأغذية الغنية بالحبوب^[29]. أما بقية الأحماض الأخرى مثل (acide 2-coumarique) تعد الأقل تكرار ونادرا ما تكون حرة، وهي في أغلب الأحيان أسترات مصنعة^[30].

الجدول(3.II): الأحماض الفينولية المشتقة من حامض السيناميك.

الأحماض الفينولية	R ₃	R ₂	R ₁	الهيكل الأساسية
Acide cinnamique	COOH	H	H	
Acide p coumarique	COOH	OH	H	
Acide caféique	COOH	OH	OH	
Acide féruilique	COOH	OH	OCH ₃	
Acide sinapique	COOH	OCH ₃	OH	



الشكل(9.II): بعض النماذج لأحماض السيناميك.

4.1.2.6.II الخصائص الفيزيائية والكيميائية للأحماض الفينولية الطبيعية:

الفينولات تتحلل أساسا في المذيبات العضوية القطبية، وتذوب كذلك في محاليل هيدروكسيد الصوديوم و كربونات الصوديوم. كما أنها تذوب بواسطة كربونات الهيدروجين، وتستخلص بمذيبات

عضوية في وسط حمضي مخفف. كذلك كل الصيغ المستبدلة (hétérosidiques) للمركبات الفينولية تذوب في الماء وتعد مركبات غير ثابتة^[31].

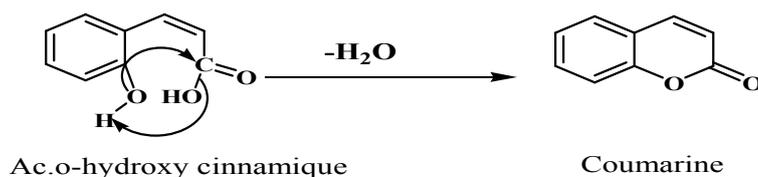
عندما يتأكسد حمض السناميك في الوضع أورثو للسلسلة الجانبية له وتكوين حلقة اللاكتون مع نزع جزيء من الماء سوف يؤدي ذلك لتكوين الكومارين الذي يعتبر فسيولوجيا أنشط الفينولات فهو المسئول عن تثبيط نمو الكائنات الدقيقة التي قد تهاجم النبات^[30].

2.2.6.II الكومارينات:

أخذ إسم الكومارينات من اللفظة (coumarou) حيث تم عزل الكومارينات في عام 1820 وتوصلوا سنة 1996 إلى اكتشاف حوالي 1300 كومارين ، وهي عبارة عن مواد فينولية مشكلة من نواة بنزينية وحلقة سداسية بها ذرة اكسجين^[32]. للكومارينات تأثيرات ونشاط بيولوجي حيث تؤدي دور مضاد للاحتراق، من أجل هذا فإن الكثير من الدراسات الأولية أجريت على الحيوانات ولم يتم تعميمها على الناس وهذا الذي حدد وحصر المنفعة للأدوية التي تحتوي على الكومارينات^[33].

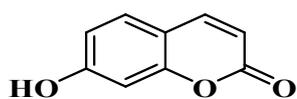
1.2.2.6.II بنية وتصنيف الكومارينات:

تتشكل حلقتين سداسيتين إحداهما عطرية والأخرى مغايرة ذات البنية C_6-C_3 حيث تشكل الكومارينات كما هو موضح بالشكل (10.II)^[32].

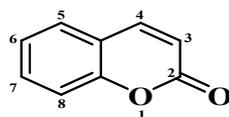


الشكل (10.II): يوضح تشكل الكومارينات.

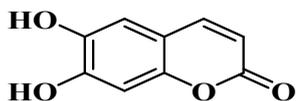
في العديد من الحالات كل الكومارينات يستبدل الموقع (7) بمجموعة هيدروكسيل، فيصبح 7-hydroxycoumarine والذي نسميه بالامبيليفيرون (ombelliférone) حيث يعد هو المركب البادئ للكومارينات 6,7-dihydroxycoumarine و 6,7,8-Trihydroxycoumarine^[30].



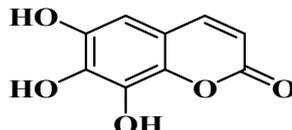
Ombelliférone
7-hydroxycoumarine



Coumarine



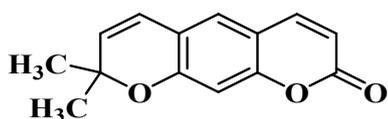
6,7-dihydroxycoumarin



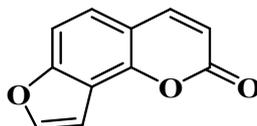
6,7,8-Trihydroxycoumarin.

الشكل (11.ii): بعض النماذج الكومارينات.

فيما يلي صيغ بعض الكومارينات:



Angélocin



Xanthylétine

الشكل (12.ii): صيغ بعض الكومارينات.

2.2.2.6.ii الخصائص الفيزيائية والكيميائية للكومارينات:

الكومارينات الحرة تذوب في الكحولات والمذيبات العضوية، كما هو الحال في مجموعات (dioxides d'éthyles) أو المذيبات المحتوية على الكلور [30].

الصيغ المستبدلة للكومارينات تنحل بسهولة في الماء. الفحص بالأشعة فوق البنفسجية أو كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM) للكومارينات يمثل ببقعة ملونة تزداد وضوحا بوجود الأمونياك [32].

3.2.6.II الفلافونويدات:

1.3.2.6.II تعريف:

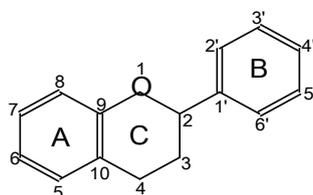
إن أول دراسة أجريت حول النشاط البيولوجي للفلافونويدات نشرت سنة 1936 من طرف Rusznyák و Szent-Gyorgyi اللذان اعتقدا أنها فيتامين وسميها بالفيتامين P, ثم تم التخلي عن هذه الفكرة بسبب عدم وجود أي صفات مشتركة بين الفلافونويدات وتعريف الفيتامينات، ومنذ ذلك الوقت والفلافونويدات تسترعي اهتمام الباحثين، بسبب تنوع تركيبها وخاصة بسبب منافعها الصحية [34].

ولقد أدخل مصطلح فلافونويدات Flavonoids سنة 1952 من طرف Geissman و Hinreiner لوصف (مماكب ل Flanones) والمشتق من الكلمة اللاتينية Flavus والتي تعني أصفر أي أصبغة صفراء [35].

تتدخل الفلافونويدات في نقل الإلكترونات خلال التركيب الضوئي وحماية النبات من الأشعة فوق البنفسجية وغيرها من الخواص، وتوجد الفلافونويدات في الفواكه، الخضار، الأزهار والمشروبات... الخ [36].

إلى حد الآن تم سرد 4000 فلافونويد في المملكة النباتية، وهي مركبات يتكون هيكلها من 15 ذرة كربون موزعة على حلقتين عطريتين A و B مرتبطين بحلقة C غير متجانسة تحتوي على ذرة أكسجين من الصيغة $C_6-C_3-C_6$ [37][38].

تقسم الفلافونويدات بنيويا إلى 15 عائلة أهمها ماييلي : الفلافون، الفلافونول، الفلافانول الأيزوفلافون، الشاكلون، الأورون، الأنثوسيان. ويمكن لهذه المركبات أن توجد بصورة حرة وتعرف بالأجليكونات وبصورة جليكوزيدات [39].



الشكل(13.II): الهيكل الأساسي للفلافونويدات

2.3.2.6.II الخصائص الفيزيائية والكيميائية للفلافونويدات:

الفلافونويدات مركبات ملونة، وهي تتواجد في جميع أجزاء النباتات الراقية حيث تتواجد بكثرة في الجزء الهوائي وخاصة الأوراق والأزهار إذ تسبب تلوين هذه الأخيرة^[6].

تتصف الفلافونويدات بخواص وصفات الفينولات، فهي مركبات ذات صفة حمضية ضعيفة ذوابة في القواعد القوية مثل هيدوكسيد الصوديوم وتتصف الفلافونويدات التي تحمل عددا كبيرا من مجموعات الهيدروكسيل الحرة أو التي تحوي على وحدات سكر بالصفة القطبية، وعليه فهي ذوابة في المذيبات القطبية مثل الميثانول والإيثانول^[40].

أما الفلافونويدات الأقل قطبية مثل الإيزوفلافونات وكذلك الفلافانونات، الفلافونات التي تحمل عددا من مجموعات الميثوكسيل فإنها تذوب في الكلوروفورم أو الإيثر. تمتلك الفلافونويدات عدة خصائص فعالة، من بينها الخصائص التالية^[41]:

☞ مضادات للأكسدة.

☞ مضادات للالتهاب.

☞ مضادات للفيروسات.

☞ مضادات لتسمم الكبد.

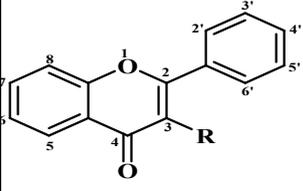
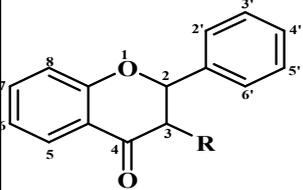
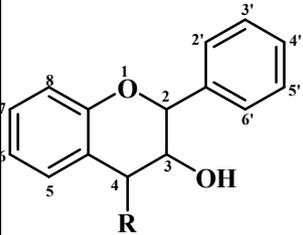
☞ مضادات للبكتيريا.

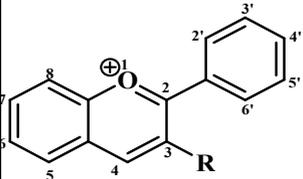
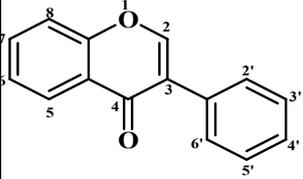
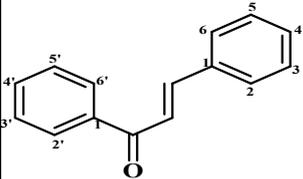
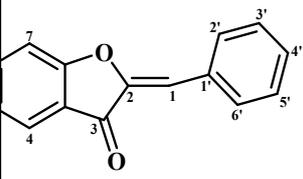
☞ يؤثر على قوة ونفاذية الأوعية الدموية.

3.3.2.6.II تصنيف الفلافونويدات:

بنويوا تنفرع إلى عدة أنواع تبعا لعدد، موضع وطبيعة المستبدلات والشكل (4.II) يوضح مختلف أقسام هذه المركبات^[42].

الجدول(4.II): تصنيف الفلافونويدات(Harbone,1999).

المشتقات	البنية	اسم العائلة	توزيع الOH	الاسم	
2-phenylchromone		R = H Flavone	5, 7, 4' 5, 7, 3', 4'	Apigenin Luteolin	
		R=OH Flavonol	5, 7, 4' 5, 7, 3', 4'	Kaempferol Quercetin	
		R = H Flavonone (dihydroflavone)	5, 7, 4' 7, 3', 4'	Naringenin Butin	
		R=OH Flavonol (dihydroflavonol)	7, 3', 4' 5, 7, 3', 4'	Fustin Taxifolin	
	2-phenylchromanes		R = H Catechin (flavonol-3)	5, 7, 3', 4', 5' 5, 7, 3', 4'	Gallocatechin Catechin
			R=OH Leucoanthocyanidin (flavandiols-3,4)	5, 7, 3', 4' 5, 7, 3', 4'	Leucoanthocyanidin Leucodelphinidin

				n
Flavyliums		R = H Flavylium (Anthocyanin)	5, 7, 4' 5, 7, 3', 4'	Apigenidin Luteolidin
		R=OH (Anthocyanidin)		Cyanidin Delphinidin
3-phenylchromone		Isoflavone	7, 4' 5, 7, 3', 4'	Daidzein Orobol
Chalcone		Chalcone	2', 4', 3, 4 2', 3', 4', 3, 4	Butein Okanin
Aurone		Aurone	6, 3', 4' 6, 7, 3', 4'	Sulphuretin Maritin

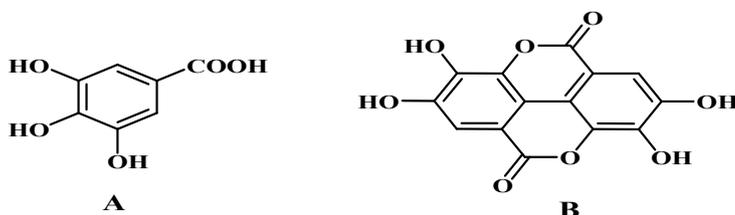
3.6.II عائلة المركبات الفينولية المتواجدة على صورة بوليميرات:

1.3.6.II التانينات:

هي مركبات ذات بنى معقدة وزنها الجزيئي من 500 إلى 3000 وحدة، تستعمل في الدباغة طعمها غير مستساغ ترسب الفلويديات والبروتينات وهي نوعان [43]:

1.1.3.6.II التانينات المتحللة : وهي عبارة عن جزيئات معقدة أسترات لسكر (عديد

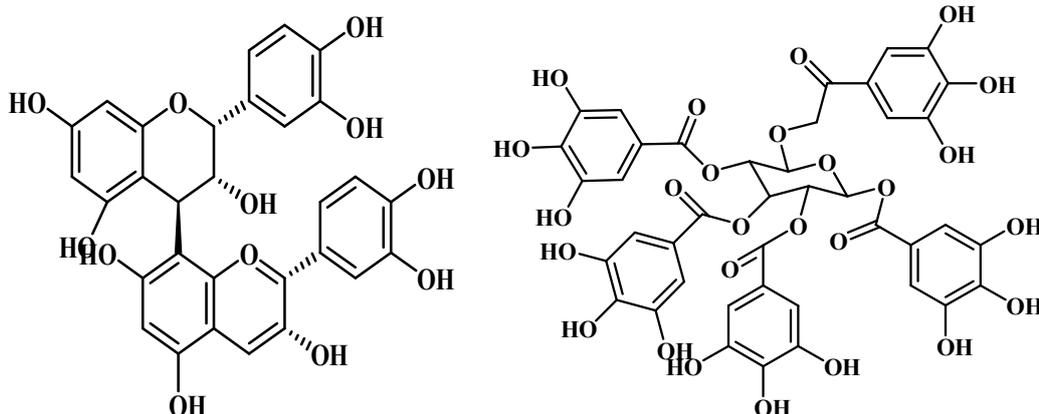
الهيدروكسي) وعدد متغير من جزيئات حمض الفينول، تطلقها ينتج شقا سكريا، أغلب الأحيان يكون الغلوكوز وشقا فينوليا مشكلا أساسا من حمض الغاليك أو حمض الايلاجيك وتتميز بالذوبانية في الماء [6].



الشكل (14.II): A: حمض الغاليك, B: حمض الايلاجيك.

2.1.3.6.II التانينات المترابطة :

لا تذوب في الماء وهي الأكثر انتشارا وهي ناتجة من البلمرة لجزيئات أولية تمتلك البنية العامة للفلافونويدات ويعد أ (flavan-3-ols) catechines أو (flavan-3,4-diols) coanhtocyanidine الأكثر أهمية، وترتبط فيما بينها بروابط كربونية وفي أغلب الأحيان تكون بين المواقع (4,8) أو (6,4) [44].



الشكل (15.II): وحدة التانينات المتحللة. الشكل (16.II): وحدة التانينات المترابطة.

7.II أهمية الفينولات والفلافونويدات:

1.7.II الفينولات:

بالرغم مما تقدمه المركبات المستخلصة من النباتات من فوائد عظيمة للإنسان، فإن دورها للنبات نفسه لم يكن معروفاً، فكثفت الأبحاث على زراعة الأنسجة النباتية داخلياً-التجارب التي تحدث على النبات وهو يقوم بجميع وظائفه (*in vivo*) -وإخارجياً-التجارب التي تتم داخل أنابيب الاختبار (*in vitro*) - أدت إلى معرفة الدور الفسيولوجي لمنتجات الأيض الثانوي^[45]، وقد لوحظ أيضاً أن الفينولات تلعب دوراً في وقاية النباتات من الأمراض التي تسببها البكتيريا والفطريات^[43].

1.1.7.II في المجال الاقتصادي: لها أهمية كبيرة في الصناعات الغذائية حيث تستعمل

كمضادات للتأكسد ومثبطات للإنزيمات. كما يتم استعمالها في صناعة مواد التجميل حيث تحمي البشرة الخارجية من الأشعة فوق البنفسجية^{[42][43]}.

2.1.7.II في المجال الطبي: تملك خصائص علاجية متنوعة إذ تؤدي دوراً كبيراً في ميدان

الطب والصيدلة لما لها من تأثيرات على الكائنات الحية عامة^[46]، وعلى الإنسان خاصة، منها مثبطة ومنها محفز للإنزيمات. تحتوي الفينولات على المجموعات الهيدروكسيلية (OH) فكلما كثر وجودها في المركب زادت في نشاط المضاد، تعد قناصات (مفخخة) للجذور الحرة فهي تمنح الهيدروجين ليقوم بعملية انتشار الجذور. ونبين بعض المركبات الفينولية التي تستعمل لعلاج العديد من الأمراض في الجدول

(5.II)^[46].

الجدول (5.II): بعض المركبات الفينولية المستعملة في الطب و الصيدلة.

الأمراض المعالجة		المركب الفينولي
مضادات للسرطان		ليقتان
حماية الأوعية الدموية مضاد للأمراض الجلدية (البهاق)		الكومارينات
مدرة للبول	مضادات للالتهاب	الفلافونويدات
مضادات للأكسدة	مضادات للسرطان	
مضادات للأكسدة		التانينات المتراكمة و المتحللة
مضادات للأكسدة	مضادات للبكتيريا	الأحماض الفينولية

2.7.II الفلافانويدات:

الدراسات المكثفة في المجال الطبي أظهرت الفعاليات المختلفة منها ما هي مضادة للسرطان^[47] حيث تعمل على تقوية الجهاز المناعي وزيادة في النشاط المضاد, هذه الميزات العلاجية أعطتها أهمية بالغة في الصناعة الصيدلانية و الجدول (6.II) يوضح بعض المركبات الفينولية المستعملة في الصناعة الدوائي^[42].

الجدول (6.II): بعض مركبات الفلافانويدات المستعملة في الصناعة الدوائية.

اسم الفلافانويد	الأمراض المعالجة
Cirsiliol	ضد الإسهال، مساعد للهضم ^[48]
3-Rutinosidekaempferol	معالج لأزمة البواسير و معالج الاضطرابات العرقية القلبية ^[49]
Quercetine	مضاد للملاريا ^[48]
Morine	معالج شلل الأطفال الفيروسي ^[48]
Rutinoside-7-Hesperetin	معالجة لارتفاع ضغط الدم ^[48]

عموما الفلافانويدات هي مركبات غير سامة، إن كمية 1g من المركبات الفلافانويدية المختلطة كافية من الناحية الصيدلانية لتفي احتياجات الأنسجة من هذه المواد وعدم الوقوع في الأمراض^[44].

8.II العلاقات بين البنى الالكترونية والخواص الكيميائية للفينولات:

1.8.II البنية الالكترونية والخاصية الحامضية للفينولات:

إن حامضية الوظائف الفينولية يمكن أن تتغير كثيرا تبعا للبنية العامة للجزيئية فعلى سبيل المثال: 2,4,6 trinitrophénol يعتبر حمضا قويا (pH=0.71) وهكذا نجد أن مجموعة الكربونيل (C=O) في المركبات (flavonol و Flovone) ذات تأثير ميزوميري ساحب (M-) لإلكترونات الحلقة البنزينية تزيد من استقطاب الرابطة O-H و بالتالي حركية H أي الخاصية الحامضية^{[51][52][53]}.

2.8.II الخواص الذاتية لمجموعة هيدروكسيل الفينولات:

1.2.8.II تشكيل الرابطة الهيدروجينية: الفينولات " شأنها شأن الكحولات " هي مواقع

لاتحاد بين الجزيئات بفضل الروابط الهيدروجينية، كما يمكن أن تتشكل روابط هيدروجينية داخل الجزيئية أيضا في الجزيئات الفينولية المعقدة. ومعروف عن الروابط الهيدروجينية أنها تغير الكثير من الخواص

الفيزيائية، درجات حرارة الإنصهار، الغليان، الذوبانية، أطيف الأشعة فوق البنفسجية UV و تحت الحمراء IR.

وتنشأ الرابطة الهيدروجينية عن اتصال الهيدروجين بأحد الذرات عالية الكهروسالبية كالأكسجين مثلاً فينشأ عنه استقطاب الرابطة O-H، ويفقد الهيدروجين جزئياً لإلكترونه، فيتجه نحو ذرة أكسجين لجزئية أخرى بكثافة الكترونية عالية. ويعمل وجود الروابط الهيدروجينية على التقليل من فعالية المجموعات الفينولية كالذوبانية في الوسط القلوي، وقابلية تشكيل الإستر والإيثر، وبالرغم من ذلك فإن الروابط الهيدروجينية تكون أقوى حالة تكوينها لحلقة سداسية (1.8-dihydroxy naphthalene) من حالة تكوينها لحلقة خماسية مثل (Catéchol)^[54].

II.2.2.8 تشكيل معقدات مع المعادن: لاحظ الباحثان Jurd et Geissman (1956) خلال

أبحاثهما على العديد من المركبات الفينولية الطبيعية الممتلكة لبعض المجموعات البنيوية قدرتها على تشكيل معقدات مع المعادن مثل (Al, Fe)، هذه الخاصية استفادا منها لاستظهار الكروماتوغرامات عند تحديد هذه الجزئيات^[55].

II.9 استخلاص المركبات الفينولية:

II.1.9 تعريف الاستخلاص: هو عزل المواد الطبيعية أو المواد المركبة من المادة الخام

باستعمال المذيبات العضوية، إن كانت المادة المراد فصلها سائلة فنطبق عليها استخلاص (سائل- سائل) وإن كانت صلبة فنطبق عليها استخلاص (صلب - سائل)^[55].

II.2.9 الاستخلاص صلب - سائل:

II.1.2.9 الاستخلاص على البارد (التنقيع Macération): تعتمد هذه التقنية على وضع

المادة الخام داخل إناء يحتوي على كمية محددة من المذيب، بحيث يكون مستوى السائل فوق المادة الخام في الظروف العادية (درجة الحرارة، ضغط الغرفة) وتحرك من حين إلى آخر، تترك مدة زمنية معينة، خلالها يتم انتقال المادة أو المواد المراد فصلها من المادة الخام إلى المذيب، ثم بعد ذلك نرشح لفصل الطور السائل عن المادة الصلبة وتستعمل هذه الطريقة للمواد التي تتأثر وتتفكك بالحرارة^[56].

2.2.9.II الاستخلاص على الساخن: هي تقنية سريعة نسبيا عن سابقتها حيث يتم غمس

المادة الخام في المذيب مع التسخين وهذه الطريقة تستعمل للمواد الصلبة التي لا تطلق عناصرها الفعالة إلا تحت تأثير درجة حرارة عالية وتطبق لفصل المواد المتبخرة (الطيارة) وغير القابلة للتبخر^[57].

المراجع

المراجع العربية

- [1]. بولوط حورية, النشاط المضاد للتاكسدوامكانية وقاية المستخلصين الميثانولي لنبتي *Centaurea incana* و *Matricaria pubescens* على السمية الكبدية, رسالة مقدمة لنيل شهادة الماجستير جامعة منتوري قسنطينة (2008/2009).
- [2]. د. بشرى البشير, التغذية والصحة, الإدارة العامة للتغذية بوزارة الصحة السعودية 2003.
- [3]. ربيعي عبد الكريم, المساهمة في دراسة الفعالية المضادة للأكسدة لمستخلصات بروليس جنوب الجزائر بالطرق الكيميائية والكهروكيميائية, رسالة ماجستير جامعة قاصدي مرباح ورقلة (2009).
- [7]. جبدل صليحة, تقدير المحتوى الفنولي و التأثير المضاد للأكسدة لمستخلصات بعض النباتات الطبية المستعملة تقليديا في علاج اضطرابات الجهاز الهضمي و ارتفاع ضغط الدم, رسالة ماجستير-جامعة فرحات عباس(2009).
- [13]. جرموني مريم, النشاطية المضادة للأكسدة لمستخلصات نبتة الخياطة *Teucrium polium*, رسالة ماجستير جامعة فرحات عباس(2009).
- [16]. لطرش عائشة, دراسة الدور الوقائي لكل من الفيتامين E و بعض مستخلصات النباتية اتجاه سمية المبيد كلوروبيريفوس, رسالة الماجستير جامعة منتوري قسنطينة (2010/2011).
- [19]. العابد ابراهيم, دراسة الفعالية المضادة للبكتيريا و المضادة للاكسدة لمستخلص القلويدات الخام لنبات الضمران *Tragnum nudatum*, رسالة الماجستير جامعة قاصدي مرباح ورقلة (2009).
- [23]. طارق بوديار, فصل و تحديد نواتج الأيض الثانوي و دراسة الفعالية المضادة للأكسدة لنبتة *Euphorbia guyoniana*, رسالة الماجستير جامعة منتوري قسنطينة (2008).
- [31]. سهيلة العقون, فصل و تحديد الأيض الثانوي الفلافونيدي لنبتة طبية تنتمي الى العائلة الشفوية (Iamiaceae) و دراسة التأثير المضاد للبكتيريا, مذكرة ماجستير, جامعة منتوري قسنطينة 2003.
- [37]. ن. فراش, استخلاص فصل و تحديد منتوج الأيض عند نبات *Centaurea lippii* الفعالية البيولوجية, رسالة ماجستير جامعة منتوري قسنطينة (2002).
- [38]. ص. عكال, البحث عن الفلافونويدات عند ثلاث انواع للجنس سانتوريا الجزائري *C.Fulfuracea*, *C.Pullata*, *C.Napifolia* الفعالية البيولوجية, رسالة دكتوراة جامعة منتوري قسنطينة (2001).
- [41]. علاوي مسعودة, مساهمة في دراسة بعض المركبات الفعالة في نبات الرمث (*Haloxylon Scoparium*), مذكرة ماجستير, جتمعة ورقلة, ماي 2003.
- [46]. د. م. هيكل, د.ع. عمر, "النباتات الطبية و العطرية," مركز الدلتا للطباعة, مصر الطبعة الثانية 1993 ص514.

المراجع الأجنبية

- [4]. Quettier-Deleu C. 2000, Phenolic compounds and antioxidant activities of buck Wheat Hulls and flour, journal of Ethnopharmacology, vol 72, p 35-42.
- [5]. Patrick TROUILLAS-Theoretical investigations of the antioxidant, optical and electronic properties of polyphenols-le grade de Docteur de l'Université de Limoges-UNIVERSITE DE LIMOGES ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTE(2011).
- [6]. J.B.Harborne, biochemistry of phenolic compounds, academic press, london and newyork.
- [8]. MOUDIR Naima; Les polyphénols de la propolis algérienne En vue de l'obtention du Diplôme de Magister en Chimie. UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF, M'SILA (2004).
- [9]. .B.H. Havsteen . Pharmacology & Therapeutics 96 (2002) 67–202.
- [10]. P.K. Stumpf, E. Conn (Eds.), The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise, vol. 7.Secondary Plant Products, Academic Press, New York, NY, USA, 1981.
- [11]. P.RIBEREAU GAYON, Les composés phénolique des végétaux. Imp. Samie, Bordeaux, France,1968.
- [12]. Ez-zohra NKHILI. Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxidant. Diplôme de Doctorat UNIVERSITÉ D'AVIGNON ET DES PAYS DE VAUCLUSE 2009 .
- [14]. Harborne J.B., 1980. Plant Phenolics: *Encyclopedia of Plant Physiology*, New series ,8, 329-402.
- [15]. K. Robards, M. Antolovich, J.Analyst.; 122,11–34(1997).
- [17]. J.BRUNATON, Pharmacognosie. 3eme edition, TEC. et DOC. , Paris, 1999.
- [18]. E. de Rijke P.Out, W.M.A. Niessen, F.Ariese, C.Gooijer, U.A.Th. Brinkman, J. Chromatogr. A 1112 (2006) 31–63.
- [20]. E.Grotewold, The Science of Flavonoids (1-123), 1ST ed , Columbus, Ohio, USA, Springer Science_Business Media, Inc, 2006.
- [21]. RIBEREAU GAYON P., 1968- Les composés phénolique des végétaux. Imp. Samie, Bordeaux, France.
- [22]. François Nsemi MUANDA, Identification de polyphenols, evaluation de leur activite antioxydane et etude leurs proprietes biologique, du grade de Docteur de l'Université Paul Verlaine-Metz-Ecole doctorale SESAMES (2010).

- [24]. Natella, F., Nardini, M., Di Felice, M., Scaccini, C. (1999). Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants : structure-activity relation. *J. Agric. Food Chem.*, 47, , 1453-1459.
- [25]. Terao ,J., Karasawa,H., Arai, H., Nagao, A., Suzuki, T., Takama, K. (1993). Peroxyl radical scavenging activity of caffeic acid and its related phenolics compounds in solution. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57 (7):1204-1205.
- [26]. Cuvelier, M.E., Richard. H., Berset. C. (1992). Comparison of the antioxidative activity of some acidphenols: structure-activity relationship. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56 (2): 324-325.
- [27]. DONATIEN KONE, Enquête ethnobotanique de six plantes médicinales maliennes, extraction; identification d'alcaloïdes, caractérisation, quantification de polyphénols: Etude de leur activité antioxydante, L'université Paul Verlaine de Metz, UPV, M (France) Docteur de L'Université de Bamako (2008/2009).
- [28]. Zeghad Nadia-Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne-le diplôme de magister (Ecole doctorale) UNIVERSITE MENTOURI DE CONSTANTINE (2008/2009).
- [29]. Beta, T. Nam, S. Dexter, L.E. Sapirstein, H.D. (2005). Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and roller-milled fractions. *Cereal. chem.* 82, 390-393.
- [30]. Jean Bruneton, pharmacognosie phytochimie plantes médicinales, 3eme edition Technique et Documentation, paris 1999.
- [32]. R. O'Kennedy, R.D. Thornes, *Coumarins- Biology, Applications and Mode of Action*, Eds. John Wiley et Sons Ltd, Chichester(1997) .
- [33]. J. R. S. Hoult, M. Paya , *J. Gen. Pharmacol.* ; 27, 713-722 (1996).
- [34]. Estany S ; Palacio, J R ; Barnadas, R ; Sabes, M ; Iborra ,A ; Martinez,P. (2007) Antioxidant activity of *N*-acetylcysteine, flavonoids and α -tocopherol on endometrial cells in culture. *Journal of Reproductive Immunology* 75 1-10.
- [35]. K.Rajnarayana, M. Sripalreddy, M.R. Chaluvadi, D.R. Krishna , *J. Indian of Pharmacology*;(33), 2-16(2001) .
- [36]. Hirota ,F; Masami, S; Satoru, M; Kohji, M.(2005). Cancer Prevention with Green Tea Polyphenols for the General Population, and for Patients Following Cancer Treatment. *Current Cancer Therapy Reviews*, 1, 109-114.

- [39]. Latifa,C. (2006). Acylation des flavonoïdes par les lipases de *Candida Antarctica* et de *Pseudomonas cepacia* : études cinétique, structurale et conformationnelle.
- [40] Satyajit, D.(2007). Chemistry for Pharmacy Students, John Wiley & Sons Ltd, England.
- [42]. E. de Rijke P.Out, W.M.A. Niessen, F.Ariese, C.Gooijer, U.A.Th. Brinkman, J. Chromatogr. A 1112 (2006) 31–63.
- [43]. E.Grotewold, The Science of Flavonoids (1-123), 1ST ed , Columbus, Ohio, USA, Springer Science_Business Media, Inc, 2006.
- [44]. E.MIDDLETON , The flavonoides trends pharmacol Science. Art. Sci. 5(1984)335-338.
- [45]. T.BAHORUV. Substances naturelles actives , la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle, Université de Maurice, 1896.
- [47]. E. Middleton et J.R.C. Kandaswami ., Ed Gauthier-Villarde.paris, 1992.
- [48]. N. Kacem .Contribution phytochimique à l'étude des composés flavoniques de la plante *Teucrium Flavum* (L) (Labiées). Thèse de Magister, Université Mentouri .Constantine .
- [49]. M.N. Kim., lescao-Bogert.L et Paris.M, , *Planta Med*, 58(1992) 285-286.
- [50]. L.C. Cardenas., J. Rodriguez., M.C.Villaverde, R.Rignera, R.Cadena, J.A.Otero, , *Planta Med*, 59(1993) 26-27.
- [51]. S. Jovanovic, S. Steenken, Y. Hara, M. Simic, *J. Chem. Soc. Perkin 2* (1996) 2497.
- [52]. S. V. Jovanovic; S.Steenken.; M.Tosic; B.Marjanovic; M.Simic, *J. Am.Chem. Soc.* 116 (1994) 4846.
- [53]. A. J.Blasco.; M. C. González.; A.Escarpa, *Anal. Chim. Acta* 511 (2004) 71.
- [54]. Quettier-Deleu C. 2000, Phenolic compounds and antioxidant activities of buck Wheat Hulls and flour, *journal of Ethnopharmacology*, vol 72, pp 35-42.
- [55]. S.MITRA, Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry, 162(37-223), 1ST ed , Hoboken, New Jersey., John Wiley & Sons, Inc, 2003.
- [56]. Bertand., J. Bordet., J.P. Bordet., P. Legoff., N. Midoux., M .N. Pons. D.Tondeur., Et J.Villermoux., « Génie des Procédés », Ed Techniques et Documentations La Voisier,1993.
- [57]. S.W. HOLLER., « Chimie Analytique », Ed DE BOECK et lacier,199



الفصل الثالث

مواد و طرق الدراسة

1.III. تمهيد:

معظم الأبحاث التي نشرت كانت تتعلق بالتركيب الكيميائي والقيمة الغذائية للبروبوليس, أما المعلومات عن التركيب الكيميائي للبروبوليس فكانت قليلة.

بعض الأعمال التي تتعلق بالتركيب الكيميائي للبروبوليس أظهرت تواجد مواد عفصية (تانينات) وسكريات، كما تم التعرف على بعض المكونات الأخرى كالبروتينات، القلويدات، الفيتامينات، وبعض المعادن مثل الصوديوم والكالسيوم كما أظهرت أيضا تواجد مركبات فينولية بكميات معتبرة بصدد هذه الدراسة سنقوم بدراسة التقدير الكمي للمركبات الفينولية الطبيعية ومدى فعالية المواد المضادة للأكسدة لمادة البروبوليس.

2.III. تحضير العينات:

1.2.III الأجهزة والأدوات والمواد المستعملة:

الأجهزة:

أثناء إنجازنا هذا العمل تم الاستعانة بالتجهيزات الموجودة على مستوى مخبري الكيمياء التحليلية، و مخبر ترقية و تثمين الموارد الصحراوية و المتمثلة في ما يلي:

☞ جهاز (UV-Visible) نوع (PRIM Advanced Spectrophotometers) بدقة ± 1 (nm صنع (SCHOTT Instruments GmbH).

☞ جهاز حوض الأمواج فوق الصوتية نوع (ULTRASONS-H) صنع (SELECTR).

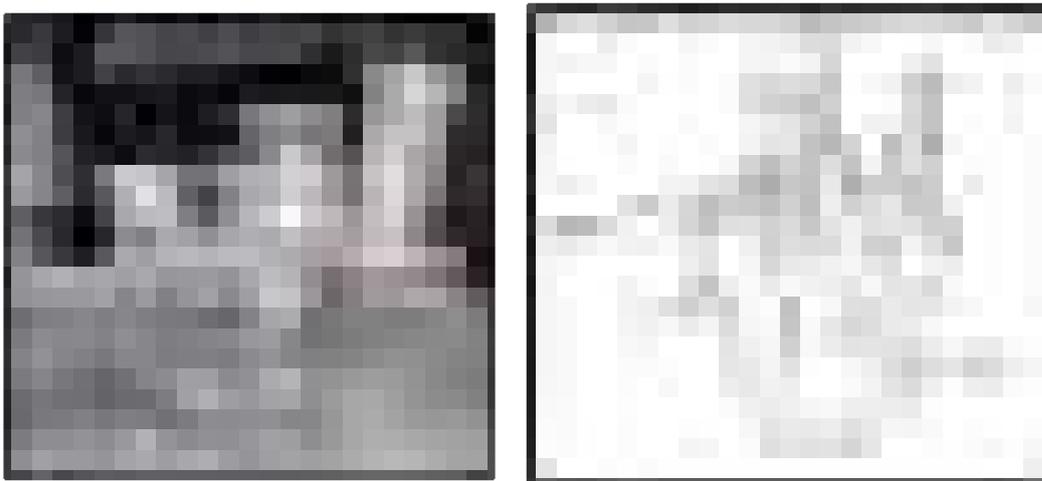
☞ الميزان التحليلي نوع (KERN) بدقة (Max $\times 220g - 0.1mg$) صنع (ALSZ20-AW).

☞ حمام مائي.

☞ أجريت الدراسة الكهروكيميائية للمستخلصات بواسطة التجهيز التالي:

☞ جهاز (VOLTALAP 40, 230 V) (PGZ 301 POTENTIOSTAT TYPE).

- صنع من طرف (Radiometer Analytical SAS) ، مرفق ببرنامج تشغيل (VoltaMaster (4 مبرمج في جهاز كمبيوتر متصل بالجهاز.
- رفق بخلية كهروكيميائية مصنوعة من الزجاج (انظر الشكل (1.IV)).
- مرفق بثلاث أقطاب (انظر الشكل (2.IV)).



الشكل (1.IV): الخلية الكهروكيميائية.

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.

☞

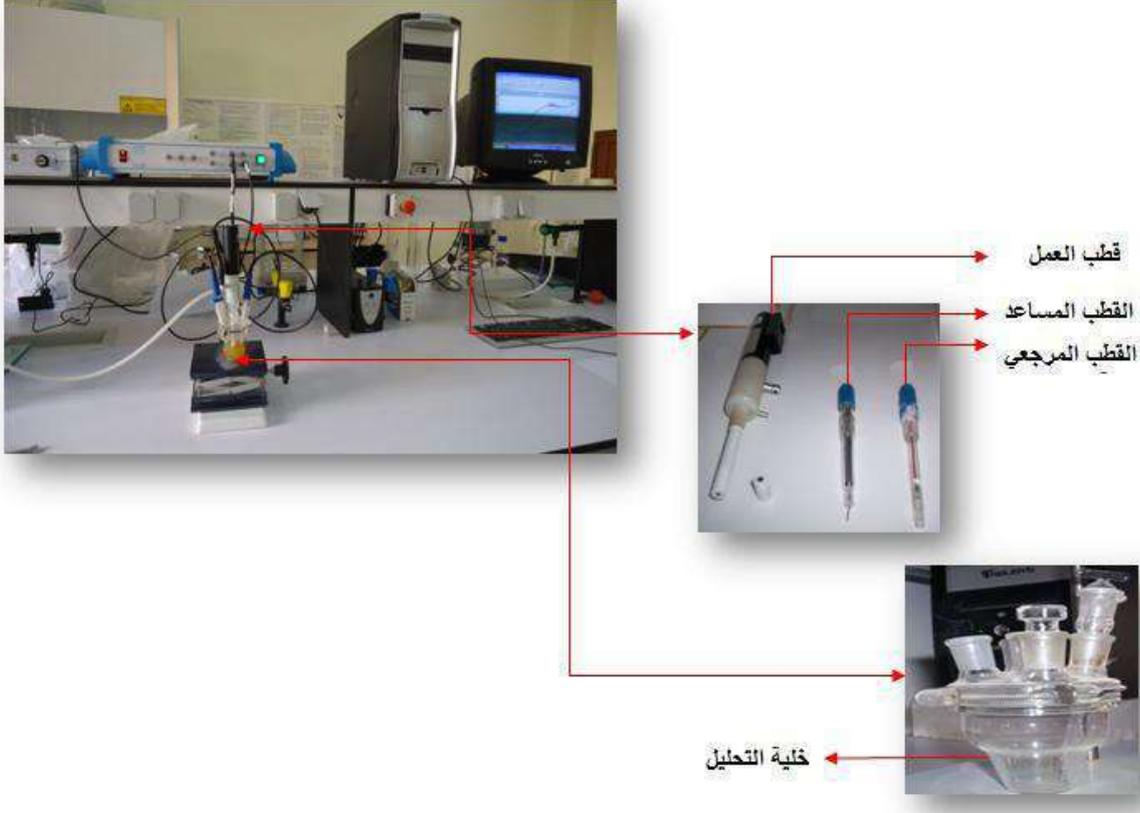


الشكل (2.IV): المساري على الترتيب (1) المسرى المرجعي (2) المسرى المساعد (3) مسرى العمل

(3.IV) و تم استخدام التركيب التجريبي الموضح في الشكل



الشكل (3.IV): التركيب التجريبي للأجهزة المستعملة في الفولطأمبيرومتر الحلقى.



الشكل (4.IV): الأجهزة المستعملة لجهاز (OLTALAB 40، PGZ 301).

1. الأدوات:

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

2. المواد الكيميائية المستعملة:

☞ ماء مكرر التقطير.

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

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

4.III. الدراسة الكهر وكيميائية :

تمت الدراسة حسب المخطط التوضيحي لسير العمل :



الشكل (2.III): خطوات الدراسة الكهروكيميائية لمتعدد الفينول وفاعلية التآزر بينها و المستخلصات الطبيعية المدروسة.

III. 3. الدراسة الكهروكيميائية لحمض الأسكوربيك (AA):

❖ تحضير المواد وطريقة العمل:

حضرنا تركيز (40 mM) من AA، في حجم (2.5ml) من محلول موقى (pH=2) و (2.5ml) من الإيثانول. كما حضرنا الخلية الكهروكيميائية التي تحتوي في البداية (12.5ml) على المحلول الموقى (pH = 2) و (12.5ml) الإيثانول و الكهر و لبيت المساعد.

❖ المذيب المستعمل في الدراسة الكهروكيميائية:

يتكون الوسط المدروس من مذيب (الإيثانول - محلول موقى (pH = 2)) ومذاب (متعدد الفينول) أما المذيب يجب ان تتوفر فيه مجموعة من الخصائص التي نذكر منها:

✓ الناقلية الجيدة في المجال المدروس.

✓ يمتلك حرارة ثابتة.

✓ يكون غير نشط كهربائياً في المجال المدروس.

✓ يذيب المواد النشطة كهربائياً.

❖ الكهر و لبيت المساعد :

من أجل الحصول على وسط ناقل للكهرباء، نضيف أملاح خاصة يصعب أكسدة شواردها السالبة وإرجاع شواردها الموجبة ، حيث استعملنا (KCl) ذات تركيز (0.1M) كمادة كهروليتيية ، وتمّ الاختيار على أساس الخصائص التالية:

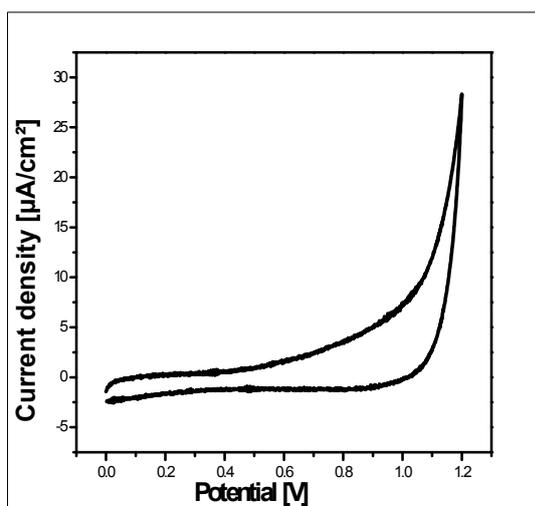
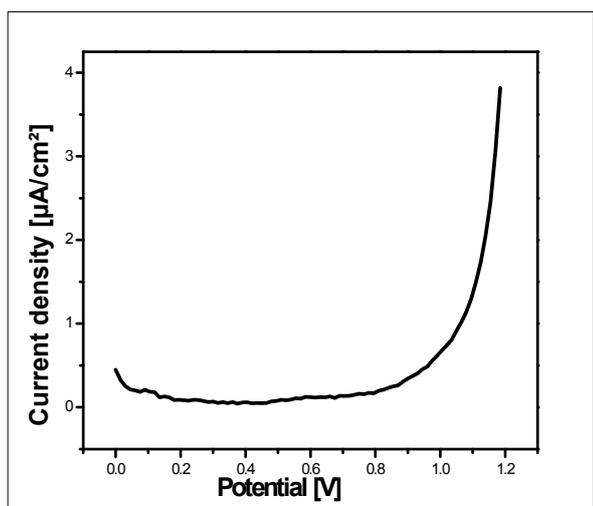
✓ ذوبانيته كبيرة في المذيبات المدروسة لضمان ناقلية كهربائية جيدة.

✓ يجب أن يكون تركيزه أكبر بـ 50 إلى 100 مرة من تركيز المواد الكهروفعالة المدروسة.

✓ يجب أن يكون محايداً كيميائياً عند درجة حرارة ثابتة.

✓ مجال الكهروفعالية للكهروليت المساعد يجب أن يكون واسعاً قدر الإمكان.

قبل مباشرة الدراسة، قمنا بتحديد مجال الكهروفعالية للكهروليت المساعد مع المذيب على مسري الكربون الزجاجي، لرسم منحنىي الفولتأمبيرومترية الحلقي والموجة المربعة الخاصين بهما، حيث حدد المجال من (0 إلى 1200 mV/ECS) في الجهة المصعدية ويعود من (1200 إلى 0 mV/ECS) ، سرعة المسح تساوي 100 mV/s. المنحنى (2.iii):



(1.iii المنحنى) : منحنى الموجة المربعة تحتوي (1.iii المنحنى) :
12.5 من محلول موقى 2 ml خلية التحليل على:
و الكهروليت EtOH من 12.5 ml , pH
KCl من 0.1 M المساعد

(1.iii المنحنى) : فولتأموغرام حلقي تحتوي (1.iii المنحنى) :
12.5 من محلول موقى 2 ml خلية التحليل على:
و الكهروليت EtOH من 12.5 ml , pH = 2
KCl من 0.1 M المساعد

❖ تتم إضافة محلول AA المحضر بحجوم مختلفة من 0.1 إلى 2 ml يتغير التركيز في الخلية عند كل إضافة ونرسم المنحنيات الفولتأمبيرومترية الحلقية (VC) والموجة المربعة (SV) على التوالي الخاصة بكل إضافة وفق بالشروط التالية:
✓ الكمون (E) من (0 إلى 600 mV) ويعود من (600 إلى 0 mV) .

✓ سرعة المسح 100 mV/s .

✓ درجة حرارة المخبر $\cong 37$.

حيث:

❖ تحضير محلول AA :

◆ حساب كتلة AA :

$$m_{AA} = M_{AA} * C * V * P$$

حيث:

M_{AA} : الكتلة المولية لـ AA (g/mol) .

C : التركيز المولي (mol/l) .

V : الحجم المراد تحضيره (l) .

P : درجة النقاوة (%) .

المعطيات:

M_{AA} : 176.12 g/mol .

C : 40 mM .

V : 5 ml .

P : 99% .

(ت ع)

$$m_{AA} = 176.12 * 5 * 10^{-3} * 4 * 10^{-2} * \frac{100}{99}$$

$$\Rightarrow m_{AA} = 0.0355 \text{ g}$$

♦ وتتم عملية حساب التركيز في الخلية كالاتي:

$$C_1 V_1 = C_T V_T$$

$$C_T = \frac{C_1 V_1}{V_T}$$

$$C_T = \frac{40 \times 0.1}{25.1}$$

$$\Rightarrow C_T = 0.1593 \text{ mol/l}$$

C_T = التركيز الكلي في الخلية.

C_1 = تركيز العينة المضافة.

V_T = الحجم الكلي في الخلية.

V_1 = حجم العينة المضافة.

✓ بنفس الطريقة تتم عملية حساب التركيز لكل حجم مضاف كما هو موضح في الجدول التالي:

الجدول (1.111) : تراكيز المحلول في الخلية بإضافة 0.1 إلى 2 ml من مركبات متعددة

الفينول.

$C(mol/l)$	$V(ml)$
0.1593	0.1
0.3174	0.2
0.4743	0.3
0.6299	0.4
:	:
:	:
:	:
2.9629	2

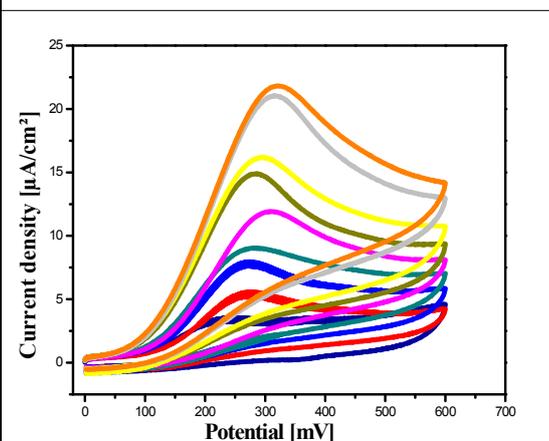
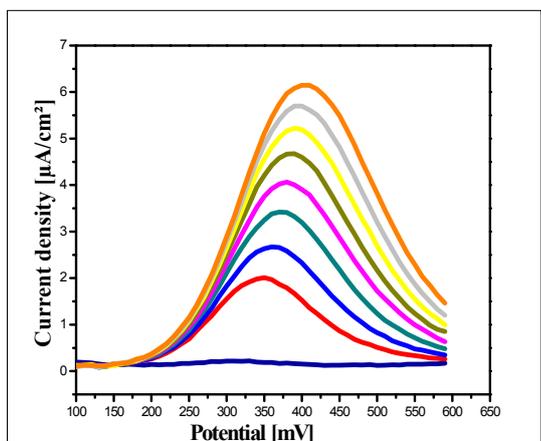
✓ وبنفس الطريقة تحضر مركبات متعدد الفينول المدروسة والمتمثلة في حمض الغاليك (AG) , BHA ,

BHT , الروتين (Rut) و الكرسيتين ($Quer$).

✓ تبدأ التجربة حسب الشروط المحددة فنحصل على الفولتاموغرام الخاص بـ (VC) و (SWV) على

التوالي لكل مركب.

✓



المنحنى (b2.iii): منحنيات الموجة المربعة المربعة لمجموعة تراكيز متدرجة لـ AA تحتوي خلية التحليل على 12.5ml من محلول مقي 2 = 12.5ml ,pH من EtOH و الكهروليت المساعد 0.1M من KCl .

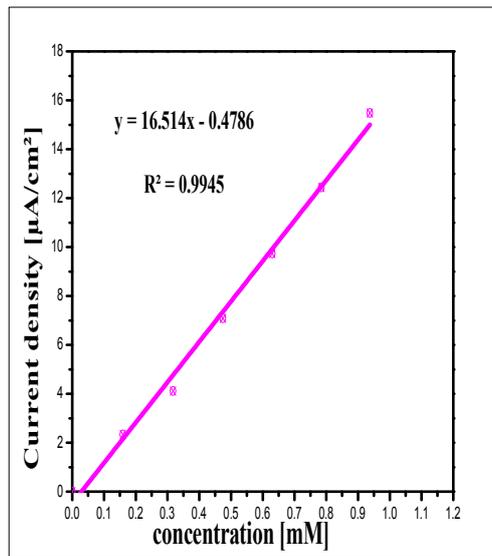
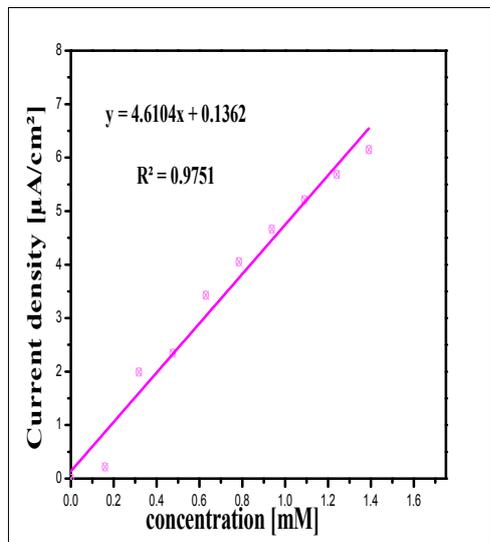
المنحنى (a2.iii): الفولتاموغرام الحلقي لمجموعة تراكيز متدرجة لـ AA تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول مقي 2 = 12.5ml ,pH من EtOH و الكهروليت المساعد 0.1M من KCl .

♦ عند رسم المنحنيات VC و SW لتراكيز المركبات القياسية من 0.1 إلى 2 ml, نقوم بتحديد

كثافة التيار المصعدية لكل فولتاموغرام لرسم منحنى AA بدلالة التركيز $i_p = f(C)$.

$$i_p = \text{كثافة التيار المصعدية } [\mu A/cm^2]$$

$$= f(C) \text{ تركيز AA } [mol/l]$$



المنحنى (b3.III) : المنحنى القياسي لـ AA الخاص بالموجة المربعة $i_p = f(C)$ تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول موقى pH = 2، 12.5ml من EtOH و الكهروليت المساعد 0.1M من KCl .

المنحنى (a3.III) : المنحنى القياسي لـ AA الخاص بالفولتأ أمبيرومترى الحلقى $i_p = f(C)$ تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول موقى pH = 2، 12.5ml من EtOH و الكهروليت المساعد 0.1M من KCl .

III. 3. 1. الدراسة الكهر وكيميائية لحمض الغاليك (AG):

❖ تحضير المواد وطريقة العمل:

حضرنا (40 mM) من GA، في حجم (2.5ml) من محلول موقى (pH=2) و (2.5ml) من الايثانول. كما حضرنا الخلية الكهر وكيميائية التي تحتوي في البداية (12.5ml) على المحلول الموقى

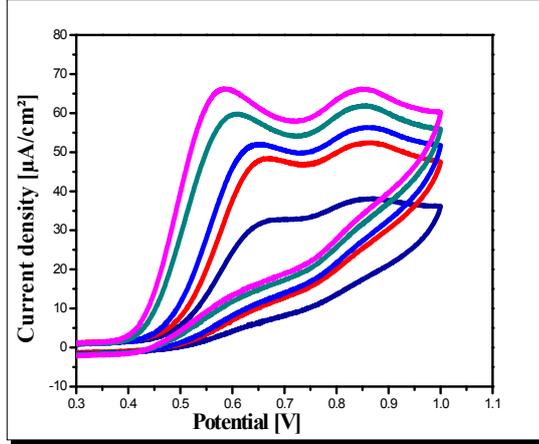
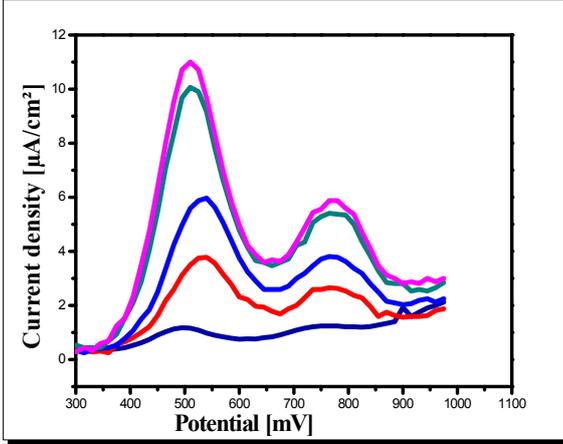
(pH = 2) و (12.5ml) من الإيثانول و الكهر وليت المساعد. ، نحضر الخلية الكهر و كيميائية التي تحتوي في البداية على المحلول الموقى (pH = 2) و الكهر وليت المساعد.

ثم نبدأ برسم المنحنيات VC و SWV الخاصين بـ GA ، حيث يتم الرسم وفق تراكيز متدرجة و بالشروط التالية:

◆ سرعة المسح 100 mV/s.

◆ الكمون (E) من (300 إلى 1000 mV).

فتم الحصول على المنحنيين التاليين:

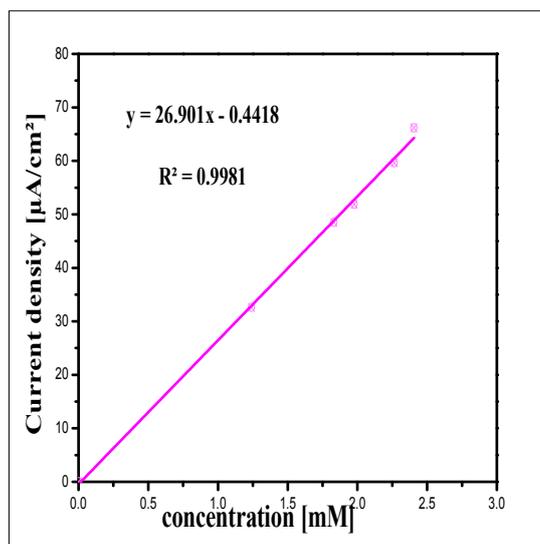
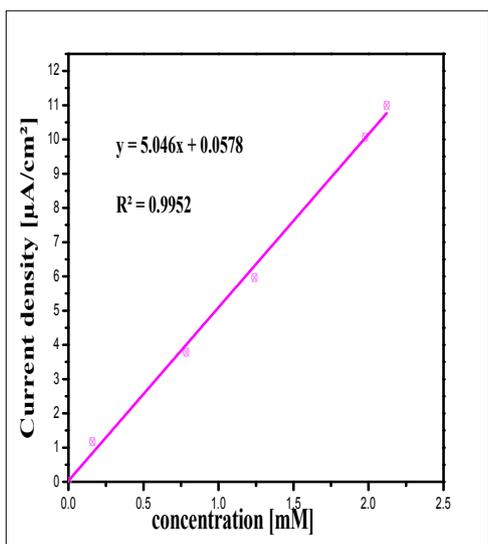


المنحنى (b4.III) : منحنيات الموجة المربعة لمجموعة تراكيز متدرجة لـ GA تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول موفي $\text{pH} = 2$, 12.5ml من EtOH والكهروليت المساعد M 0.1 من KCl .

المنحنى (a4.III) : الفولتامتوغرام الحلقي لمجموعة تراكيز متدرجة لـ GA تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول موفي $\text{pH} = 2$, 12.5ml من EtOH والكهروليت المساعد 0.1M من KCl .

♦ وينفس طريقة الـ AA نرسم المنحنيات VC و SWV الخاصة بـ GA لتراكيز المركبات

القياسية من 0.1 إلى 2 ml, نقوم بتحديد كثافة التيار المصعدية لكل فولتامتوغرام لرسم منحنى AG بدلالة التركيز $i_p = f(C)$.



المنحنى (b5.III) : المنحنى القياسي لـ GA

الخاص بالموجة المربعة $i_p = f(C)$

تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من

محلول موقى pH = 2 , 12.5ml من

EtOH والكهروليت المساعد 0.1M من

.KCl

المنحنى (a5.III): المنحنى القياسي لـ GA

الخاص بالفولتأميرومترى الحلقى

$i_p = f(C)$ تحتوي خلية التحليل على:

12.5ml من محلول موقى pH = 2 , 12.5ml من

من EtOH و الكهروليت المساعد 0.1M من

.KCl

III. 2.3. الدراسة الكهر وكيميائية للروتين (*Rut*):

❖ تحضير المواد وطريقة العمل:

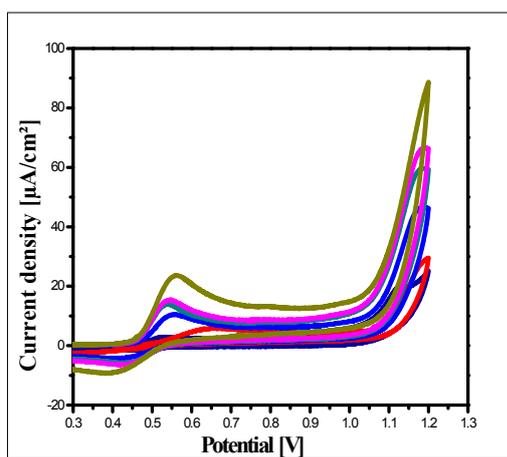
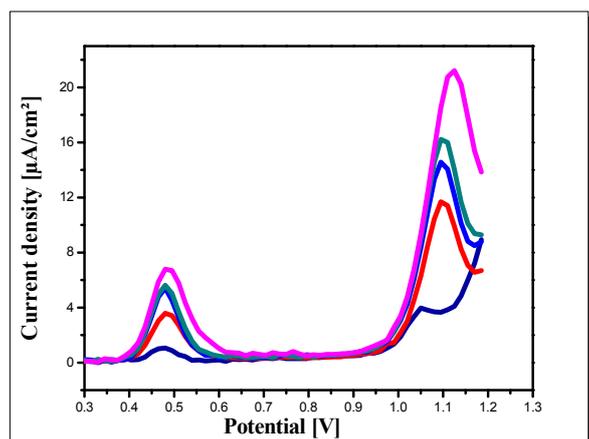
حضرنا (35.2 mM) من *Rut*، في حجم (2.5 ml) من محلول موقى ($\text{pH}=2$) و (2.5 ml) من الايثانول. كما حضرنا الخلية الكهر وكيميائية التي تحتوي في البداية (12.5 ml) على المحلول الموقى ($\text{pH} = 2$) و (12.5 ml) من الإيثانول و الكهر وليت المساعد. ، نحضر الخلية الكهر وكيميائية التي تحتوي في البداية على المحلول الموقى ($\text{pH} = 2$) و الكهر وليت المساعد.

ثم نبدأ برسم المنحنيات VC و SWV الخاصين ب*Rut* ، حيث يتم الرسم وفق تراكيز متدرجة و بالشروط التالية:

◆ سرعة المسح 100 mV/s .

◆ الكمون (E) من (300 إلى 1200 mV).

فتم الحصول على المنحنيات التالية:



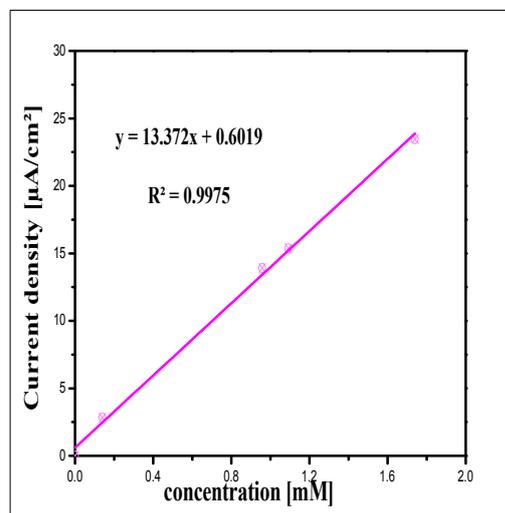
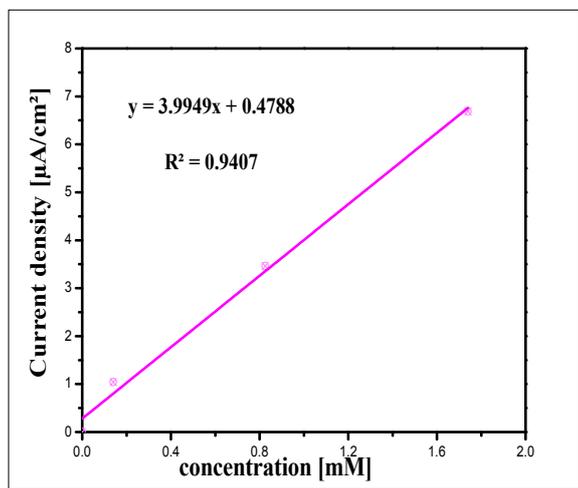
المنحنى (b6.III) : منحنيات الموجة المربعة لمجموعة تراكيز متدرجة لـ *Rut* تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول موقى $\text{pH} = 2$ ، 12.5ml من EtOH و الكهروليت المساعد M من 0.1 KCl .

المنحنى (a6.III) : الفولتاموغرام الحلقي لمجموعة تراكيز متدرجة لـ *Rut* تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول موقى $\text{pH} = 2$ ، 12.5ml من EtOH و الكهروليت المساعد 0.1M من KCl .

♦ وينفس طريقة الـ AA نرسم المنحنيات VC و SWV الخاصة بـ *Rut* لتراكيز المركبات

القياسية من 0.1 إلى 2 ml، نقوم بتحديد كثافة التيار المصعدية لكل فولتاموغرام لرسم منحنى *Rut*

بدلالة التركيز $i_p = f(C)$.



<p>المنحنى (b7.III): المنحنى القياسي لـ Rut الخاص بالموجة المربعة $i_p = f(C)$ تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول موقى $pH = 2$, 12.5ml من $EtOH$ و الكهروليت المساعد $0.1M$ من KCl.</p>	<p>المنحنى (a7.III): المنحنى القياسي لـ Rut الخاص بالفولتأ أمبيرومترى الحلقى $i_p = f(C)$ تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول موقى $pH = 2$, 12.5ml من $EtOH$ و الكهروليت المساعد $0.1M$ من KCl.</p>
--	---

III. 3.3. الدراسة الكهر وكيميائية للكريستين (Quer):

❖ تحضير المواد وطريقة العمل:

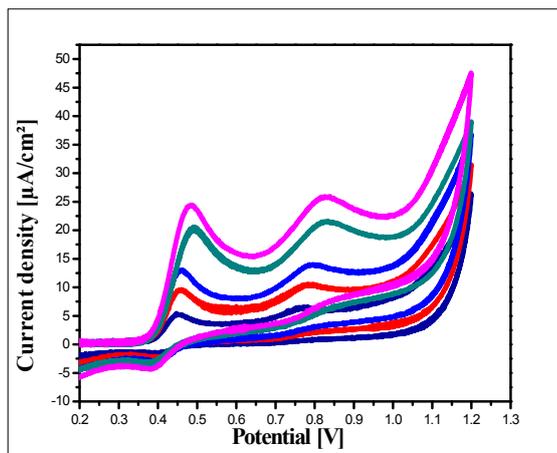
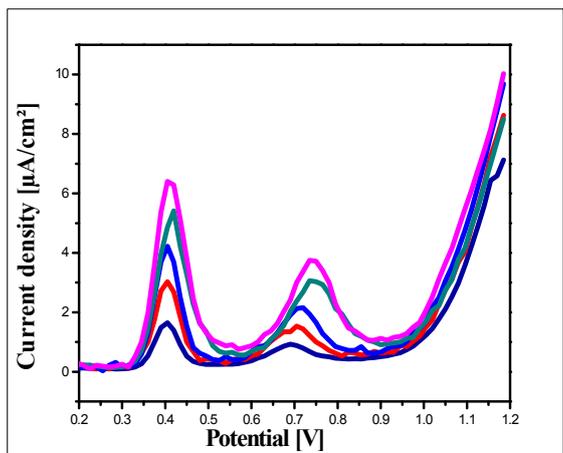
حضرنا (10 mM) من Quer، في حجم (2.5ml) من محلول موقى ($pH=2$) و (2.5ml) من الايثانول. كما حضرنا الخلية الكهر وكيميائية التي تحتوي في البداية (12.5ml) على المحلول الموقى ($pH = 2$) و (12.5ml) من الإيثانول و الكهر وليت المساعد، نحضر الخلية الكهر وكيميائية التي تحتوي في البداية على المحلول الموقى ($pH = 2$) و الكهر وليت المساعد.

ثم نبدأ برسم المنحنيات VC و SWV الخاصين بـ Quer، حيث يتم الرسم وفق تراكيز متدرجة و بالشروط التالية:

♦ سرعة المسح 100 mV/s .

♦ الكمون (E) من (200 إلى 1200 mV).

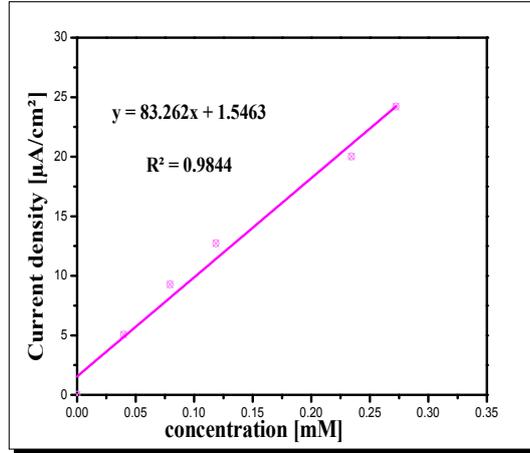
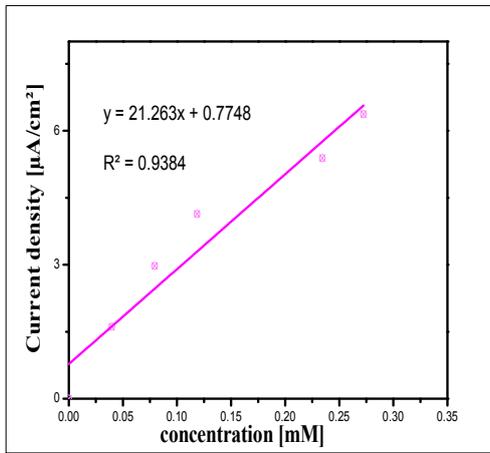
فتم الحصول على المنحنيات التالية:



المنحنى (b8.iii): منحنيات الموجة المربعة
لمجموعة تراكيز متدرجة لـ *Quer* تحتوي خلية
التحليل على: 12.5ml من محلول موفي 2 =
12.5ml ,pH من EtOH والكهروليت المساعد
0.1M من KCl .

المنحنى (a8.iii) : الفولتاموغرام الحلقي لمجموعة
تراكيز متدرجة لـ *Quer* تحتوي خلية التحليل على:
12.5ml من محلول موفي 2 ,pH = 12.5ml
من EtOH و الكهروليت المساعد 0.1M من
KCl .

♦ وينفس طريقة الـ AA نرسم المنحنيات *VC* و *SWV* الخاصة بـ *Quer* لتراكيز المركبات
القياسية من 0.1 إلى 2ml, نقوم بتحديد كثافة التيار المصعدية لكل فولتاموغرام لرسم منحنى *Quer*
بدلالة التركيز $i_p = f(C)$.



المنحنى (b.9.III): المنحنى القياسي لـ *Quet* الخاص بالموجة المربعة $i_p = f(C)$ تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول موقى pH = 2، 12.5ml من EtOH و الكهروليت المساعد 0.1M من KCl .

المنحنى (a.9.III): المنحنى القياسي لـ *Quer* الخاص بالفولتأمبيرومترى الحلقى $i_p = f(C)$ تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول موقى pH = 2، 12.5ml من EtOH و الكهروليت المساعد 0.1M من KCl .

III . 3 . 4. الدراسة الكهر وكيميائية BHA:

❖ تحضير المواد وطريقة العمل:

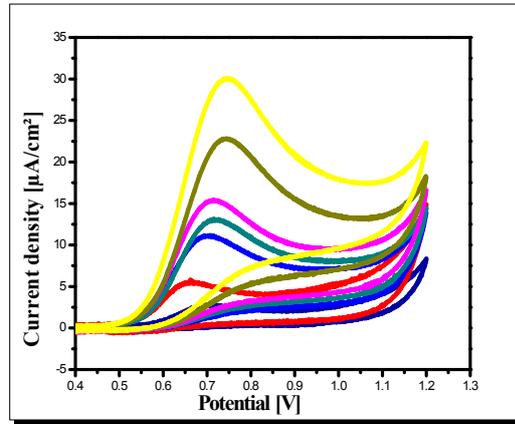
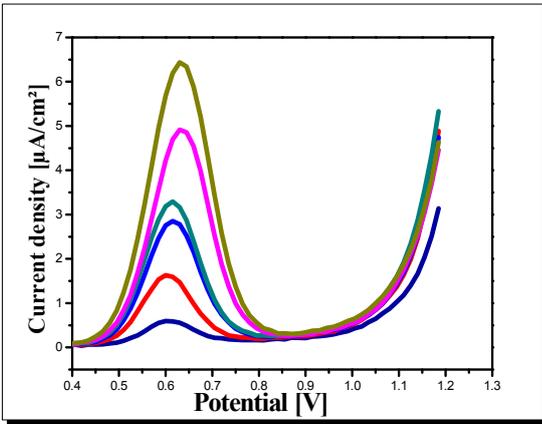
حضرنا (40 mM) من *BHA*، في حجم (2.5ml) من محلول موقى (pH=2) و (2.5ml) من الايثانول. كما حضرنا الخلية الكهر وكيميائية التي تحتوي في البداية (12.5ml) على المحلول الموقى (pH = 2) و (12.5ml) من الإيثانول و الكهر وليت المساعد، نحضر الخلية الكهر وكيميائية التي تحتوي في البداية على المحلول الموقى (pH = 2) و الكهر وليت المساعد.

ثم نبدأ برسم المنحنيات الفولطاً أمبيرومتريّة الحلقية والموجة المربعة الخاصين بـ *BHA* ، حيث يتم الرسم وفق تراكيز متدرجة و بالشروط التالية:

◆ سرعة المسح 100 mV/s .

◆ الكمون (E) من (400 إلى 1200 mV) .

فتم الحصول على المنحنيات التالية:



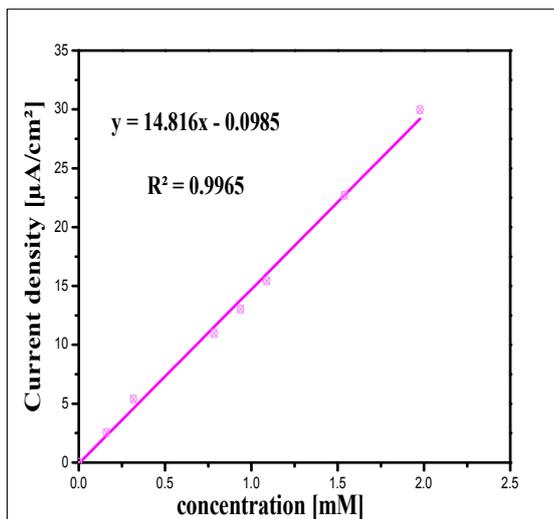
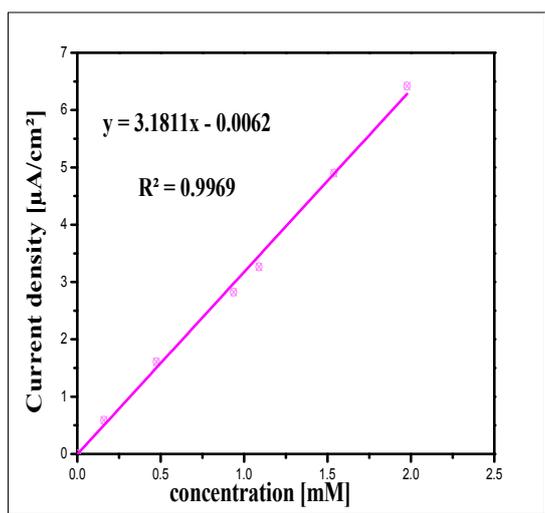
المنحنى (b10.iii): منحنيات الموجة المربعة لمجموعة تراكيز متدرجة لـ *BHA* تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول موقى = 2 pH ، 12.5ml من EtOH و الكهروليت المساعد 0.1M من KCl .

المنحنى (a10.iii) : الفولتأموغرام الحلقي لمجموعة تراكيز متدرجة لـ *BHA* تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول موقى = 2 pH ، 12.5ml من EtOH و الكهروليت المساعد 0.1M من KCl .

♦ وينفس طريقة الـ AA نرسم المنحنيات VC و SWV الخاصة بـ BHA لتراكيز المركبات

القياسية من 0.1 إلى 2 ml, نقوم بتحديد كثافة التيار المصعدية لكل فولتاموغرام لرسم منحني BHA

بدلالة التركيز $i_p = f(C)$.



المنحني (b11.iii): المنحني القياسي لـ BHA

الخاص بالموجة المربعة $i_p = f(C)$.

تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول

موقى pH = 2, 12.5ml من EtOH و

الكهروليت المساعد 0.1M من KCl.

المنحني (a11.iii): المنحني القياسي لـ BHA

الخاص بالفولتأميرومترى الحلقي $i_p = f(C)$

تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول

موقى pH = 2, 12.5ml من EtOH و

الكهروليت المساعد 0.1M من KCl.

III. 3. 5. الدراسة الكهر وكيميائية BHT:

❖ تحضير المواد وطريقة العمل:

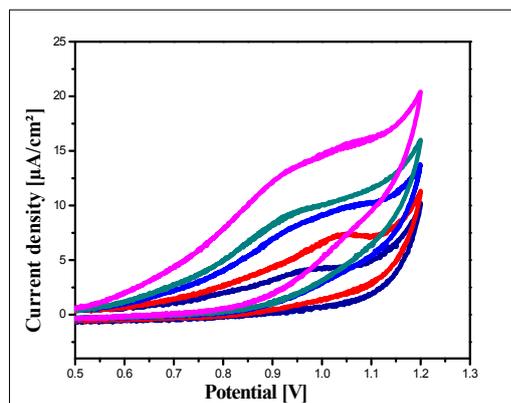
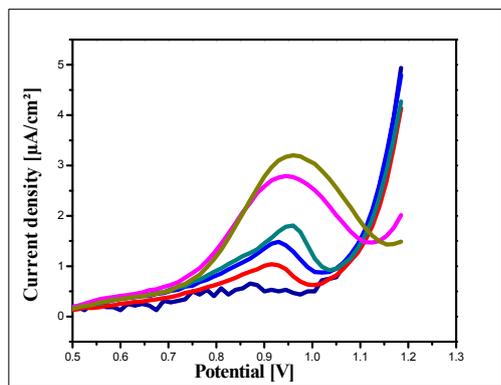
نقوم بتحضر (40 mM) من BHT في الايثانول، كما حضرنا الخلية الكهر وكيميائية التي تحتوي في البداية (12.5ml) على المحلول الموقى (pH = 2) و (12.5ml) من الإيثانول و الكهر وليت المساعد. ، نحضر الخلية الكهر وكيميائية التي تحتوي في البداية على المحلول الموقى (pH = 2) و الكهر وليت المساعد.

ثم نبدأ برسم المنحنيات الفولطاً أمبيرومتريّة الحلقية الخاصة بـ BHT، حيث يتم الرسم وفق تراكيز متدرجة و بالشروط التالية:

◆ سرعة المسح 100 mV/s.

◆ الكمون (E) من (500 إلى 1200 mV).

فتم الحصول على المنحنيات التالية:



المنحنى (b12.iii): منحنيات الموجة المربعة

لمجموعة تراكيز متدرجة لـ BHT تحتوي خلية

المنحنى (a12.iii) الفولتاموغرام الحلقي لمجموعة

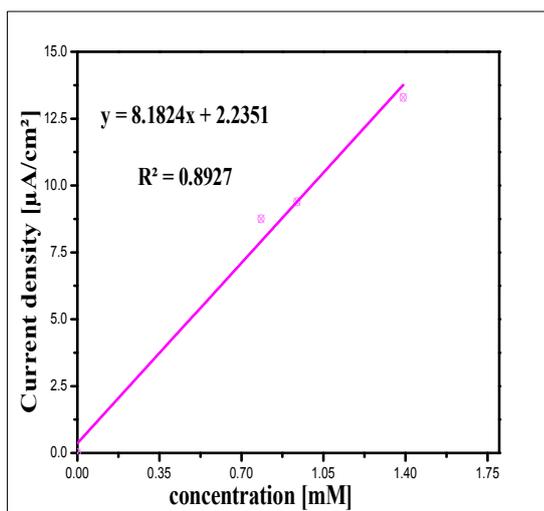
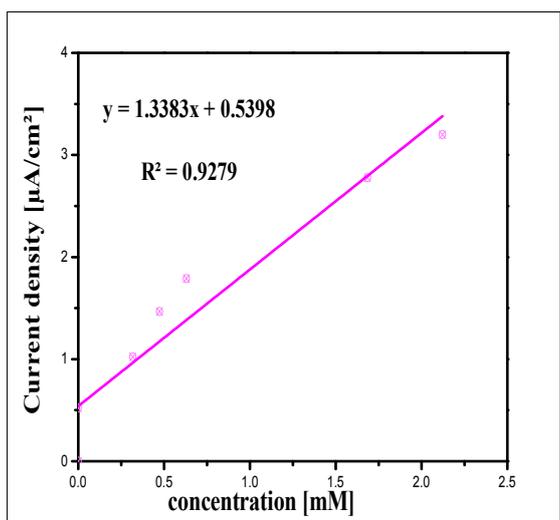
تراكيز متدرجة لـ BHT تحتوي خلية التحليل على:

التحليل على: 12.5ml من محلول موقى 2 =
12.5ml ,pH من EtOH و الكهروليت
المساعد 0.1M من KCl .

12.5ml من محلول موقى 2 ,pH =
من EtOH و الكهروليت المساعد 0.1M
.KCl

◆ وينفس طريقة الـ AA نرسم المنحنيات VC و SWV الخاصة بـ BHT لتراكيز المركبات

القياسية من 0.1 إلى 2 ml, نقوم بتحديد كثافة التيار المصعدية لكل فولتاموغرام لرسم منحنى BHT بدلالة التركيز $i_p = f(C)$.



المنحنى (b13.III): المنحنى القياسي BHT

الخاص بالموجة المربعة $i_p = f(C)$.

تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول

موقى 2 ,pH = 2 من EtOH و

المنحنى (a13.III): المنحنى القياسي BHT

الخاص بالفولتامبيرومترى الحلقى $i_p = f(C)$

تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول

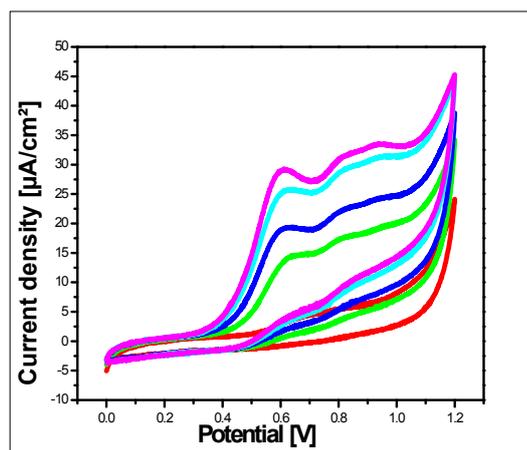
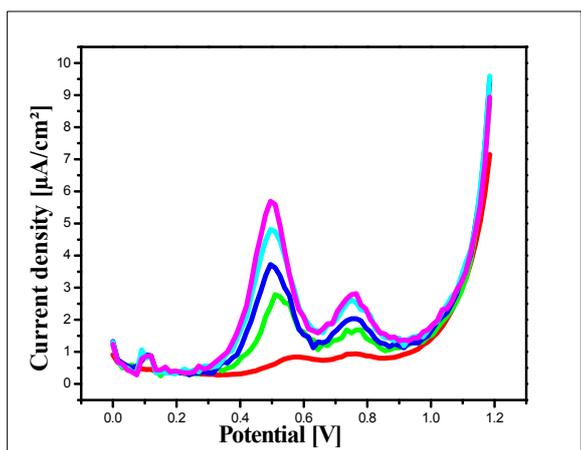
الكهروليت المساعد 0.1M من KCl .

موفي 2 ,pH من 12.5ml EtOH و
الكهروليت المساعد 0.1M من KCl .

III .3 .6. الدراسة الكهر وكيميائية للتآزر بين الثنائيات لمتعدد الفينول :

III .3 .6 .1. الدراسة الكهر وكيميائية للتآزر بين الثنائية حمض الأسكوربيك وحمض الغاليك

بنسبة 50% لكل منهما:



المنحنى (b14.iii): منحنيات الموجة المربعة

لمجموعة تراكيز متدرجة لـ AA و GA تحتوي خلية
التحليل على: 12.5ml من محلول موفي 2 =
pH من 12.5ml EtOH و الكهروليت

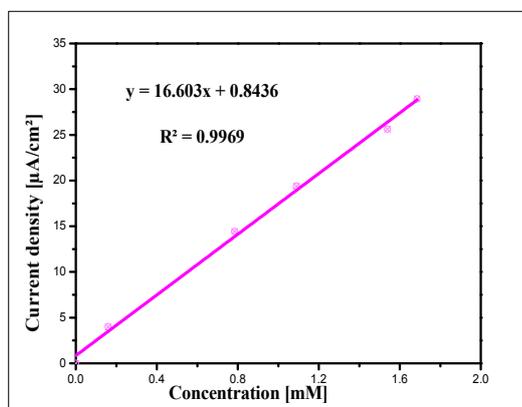
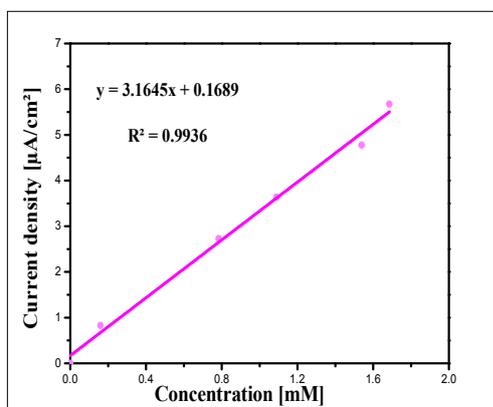
المنحنى (a14.iii): الفولتاموغرام الحلقي

لمجموعة تراكيز متدرجة لـ AA و GA تحتوي
خلية التحليل على: 12.5ml من محلول موفي
2 = pH من 12.5ml EtOH و الكهروليت

المساعد 0.1M من KCl .

المساعد 0.1M من KCl .

♦ وينفس طريقة الـ AA نرسم المنحنيات VC و SWV الخاصة بـ AA و GA لتراكيز المركبات القياسية من 0.1 إلى 2 ml, نقوم بتحديد كثافة التيار المصعدية لكل فولتاموغرام لرسم منحنى AA و GA بدلالة التركيز $i_p = f(C)$.



المنحنى (b15.III): المنحنى القياسي لـ AA و

المنحنى (a15.III): المنحنى القياسي لـ AA و

GA الخاص بالموجة المربعة $i_p = f(C)$

GA الخاص بالفولتأ أمبيرومترى الحلقى

تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول

$i_p = f(C)$ تحتوي خلية التحليل على:

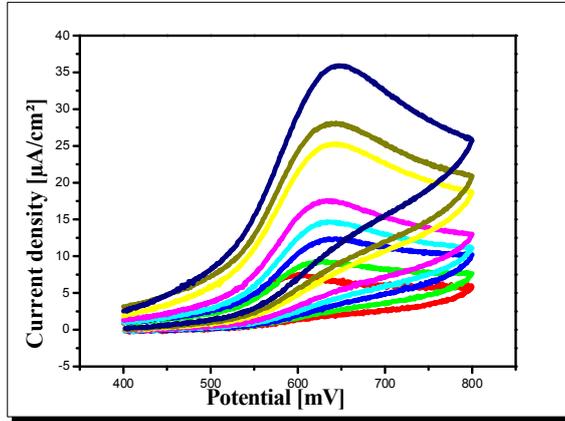
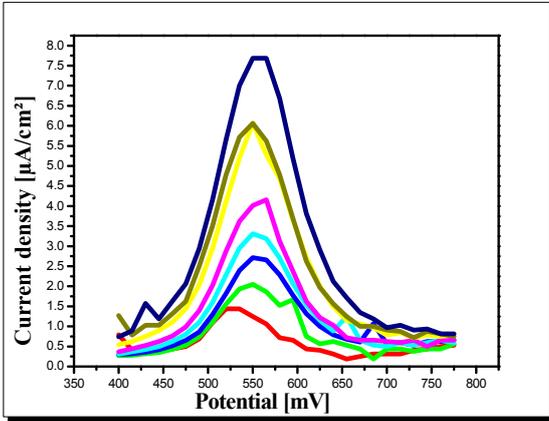
موقى pH = 2 , 12.5ml من

12.5ml من محلول موقى pH = 2 ,

. EtOH والكهروليت المساعد 0.1M من KCl .

12.5ml من EtOH و الكهروليت المساعد M
0.1 من KCl .

III . 3 . 6 . 2. الدراسة الكهر وكيميائية للتآزر بين الثنائية حمض الأسكوبيك و BHA بنسبة 50% لكل منهما:



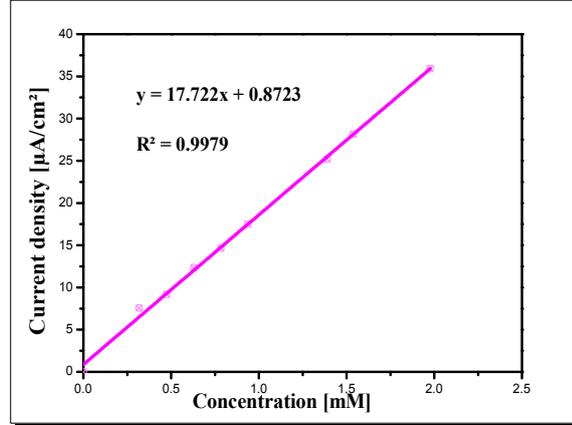
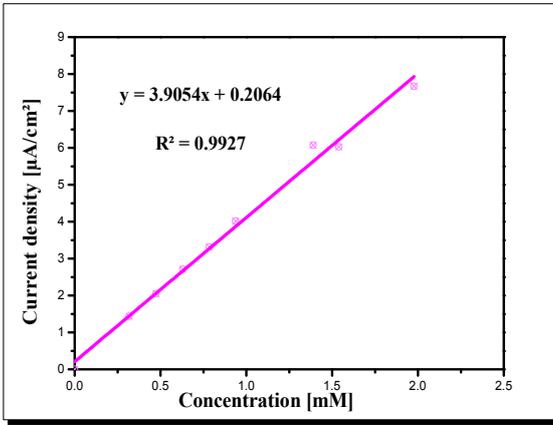
المنحنى (b16.III): منحنيات الموجة المربعة لمجموعة تراكيز متدرجة لـ AA و BHA تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول موقى pH = 2، 12.5ml من EtOH و الكهروليت المساعد 0.1M من KCl .

المنحنى (a16.III): الفولتاموغرام الحلقى لمجموعة تراكيز متدرجة AA و BHA تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول موقى pH = 2، 12.5ml من EtOH و الكهروليت المساعد M 0.1 من KCl .

◆ وينفس طريقة الـ AA لرسم المنحنيات VC وSWV الخاصة بـ AA و BHA

لتراكيز المركبات القياسية من 0.1 إلى 2 ml، نقوم بتحديد كثافة التيار المصعدية لكل فولتاموغرام لرسم

منحنى AA و BHA بدلالة التركيز $i_p = f(C)$.



المنحنى (b17.III): المنحنى القياسي لـ AA و BHA

الخاص بالموجة المربعة $i_p = f(C)$.

تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول موقى

pH = 2، 12.5ml من EtOH والكهروليت

المساعد 0.1M من KCl.

المنحنى (a17.III): المنحنى القياسي لـ AA و

BHA الخاص بالفولتأ أمبيرومتري الحلقي $i_p = f(C)$

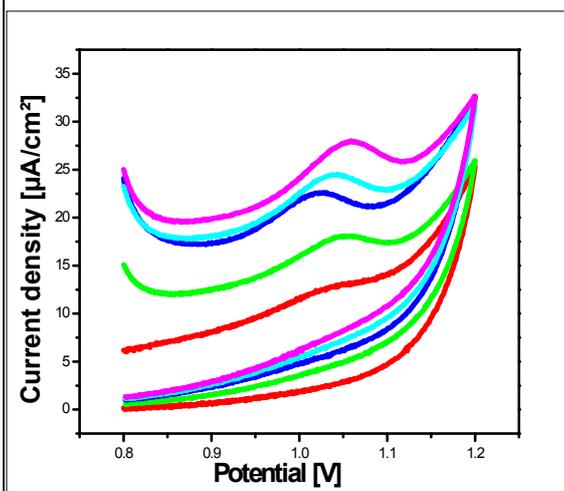
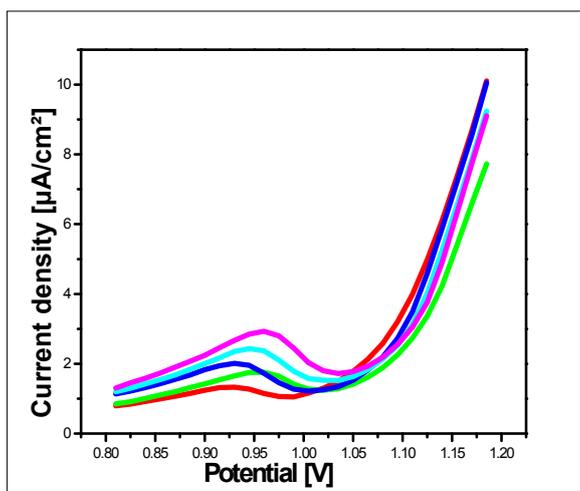
تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول موقى

pH = 2، 12.5ml من EtOH والكهروليت

المساعد 0.1M من KCl.

III. 3. 6. 3. الدراسة الكهر وكيميائية للتآزر بين الثنائية حمض الأسكوبيك و BHT بنسبة

50% لكل منهما:



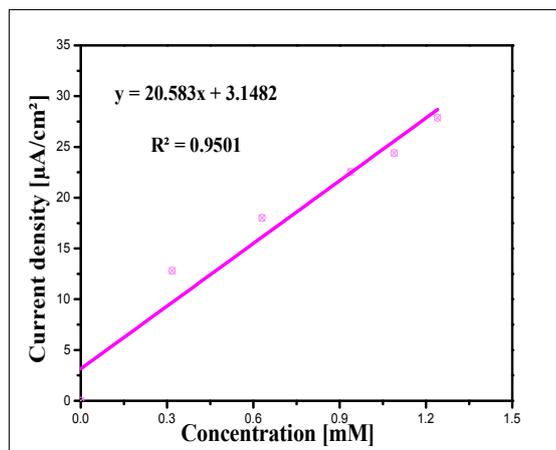
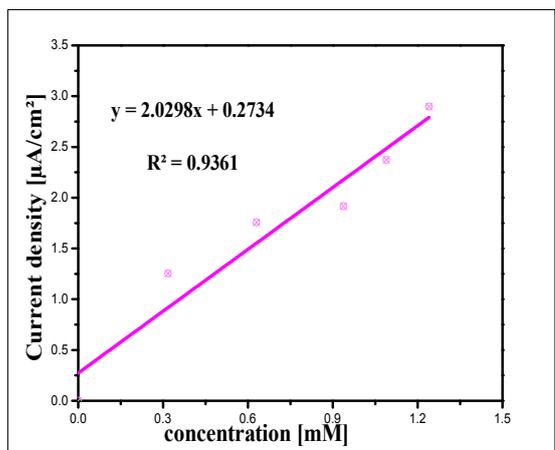
المنحنى (b18.iii): منحنيات الموجة المربعة لمجموعة تراكيز متدرجة لـ AA و BHT تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول موقى 2 M المساعد 0.1M من KCl و EtOH و الكهروليت

المنحنى (a18.iii): الفولتاموغرام الحلقي لمجموعة تراكيز متدرجة لـ AA و BHT تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول موقى pH = 2, 12.5ml من EtOH و الكهروليت المساعد M 0.1 من KCl .

◆ وينفس طريقة الـ AA نرسم المنحنيات VC و SWV الخاصة بـ AA و BHT

لتركيز المركبات القياسية من 0.1 إلى 2 ml, نقوم بتحديد كثافة التيار المصعدية لكل فولتاموغرام لرسم

منحنى AA و BHT بدلالة التركيز $i_p = f(C)$.



المنحنى (b19.III): المنحنى القياسي لـ AA و BHT

الخاص بالموجة المربعة $i_p = f(C)$ تحتوي خلية

التحليل على: 12.5ml من محلول موفي $\text{pH} = 2$,

12.5ml من EtOH و الكهروليت المساعد M

. KCl من 0.1

المنحنى (a19.III): المنحنى القياسي لـ AA و BHT

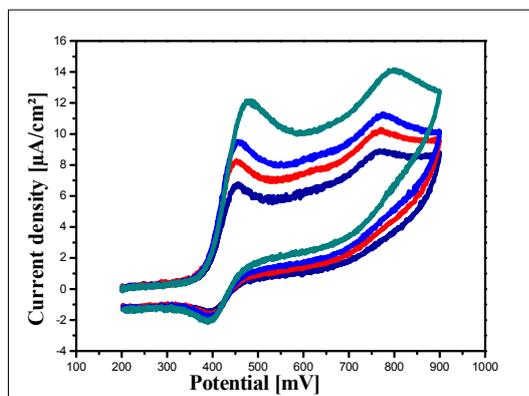
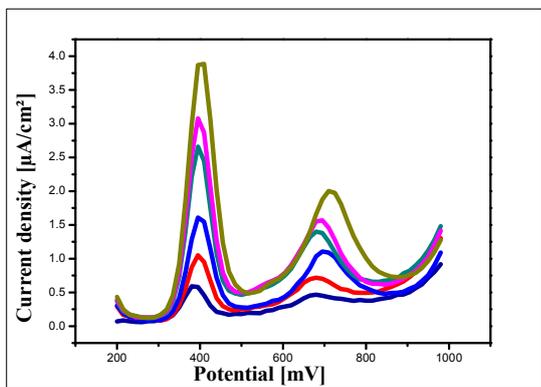
الخاص بالفولتأميرومتر الحلقي $i_p = f(C)$

تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول موفي

$\text{pH} = 2$, 12.5ml من EtOH و الكهروليت

المساعد 0.1M من KCl .

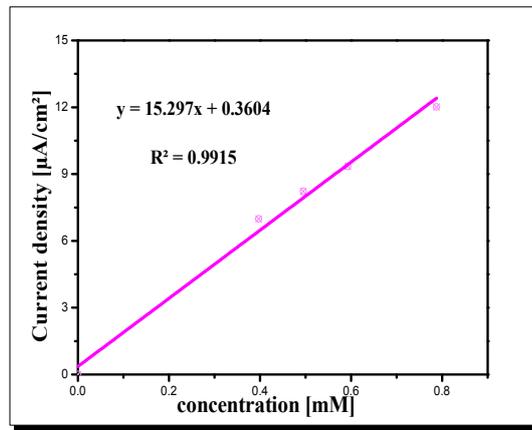
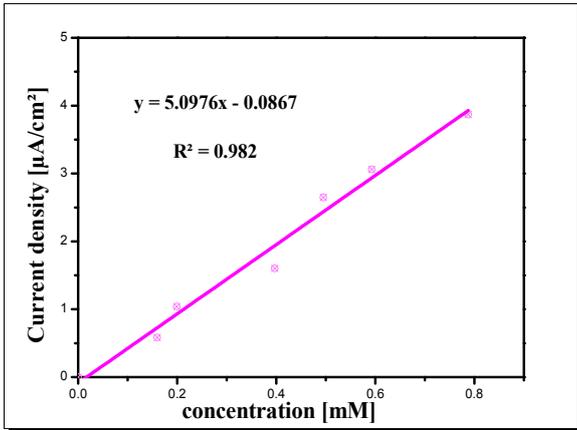
III. 3. 6. 4. الدراسة الكهر وكيميائية للتآزر بين الثنائية حمض الأسكوريك والكيرسيتين بنسبة 50% لكل منهما:



المنحنى (b20.III): منحنيات الموجة المربعة لمجموعة تراكيز متدرجة AA و Quer تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول موفي $\text{pH} = 2$, 12.5ml من EtOH و الكهروليت المساعد M من KCl .

المنحنى (a20.III): الفولتاموغرام الحلقي لمجموعة تراكيز متدرجة AA و Quer تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول موفي $\text{pH} = 2$, 12.5ml من EtOH و الكهروليت المساعد 0.1M من KCl .

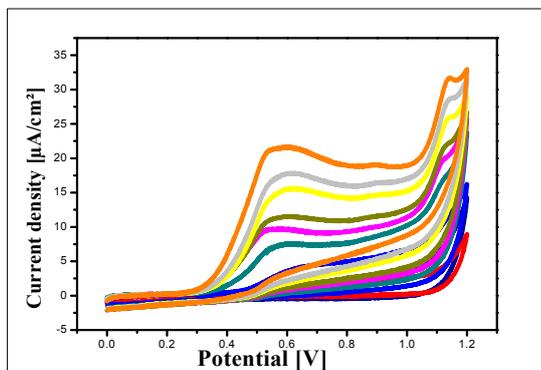
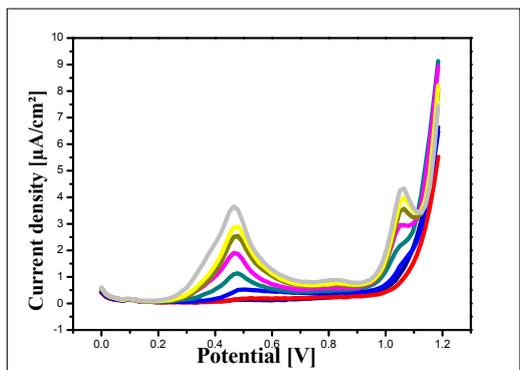
♦ وينفس طريقة الـ AA نرسم المنحنيات VC و SWV الخاصة بـ AA و Quer لتراكيز المركبات القياسية من 0.1 إلى 2 ml, نقوم بتحديد كثافة التيار المصعدية لكل فولتاموغرام لرسم منحنى AA و Quer بدلالة التركيز $i_p = f(C)$.



المنحنى (b21.III): المنحنى القياسي لAA و Quer الخاص بالموجة المربعة $i_p = f(C)$ تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول موفي $\text{pH} = 2$, 12.5ml من EtOH و الكهروليت المساعد 0.1M من KCl .

المنحنى (a21.III): المنحنى القياسي لQuer و AA الخاص بالفولتأمة بيرومترية الحلقي $i_p = f(C)$ تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول موفي $\text{pH} = 2$, 12.5ml من EtOH و الكهروليت المساعد M من KCl .

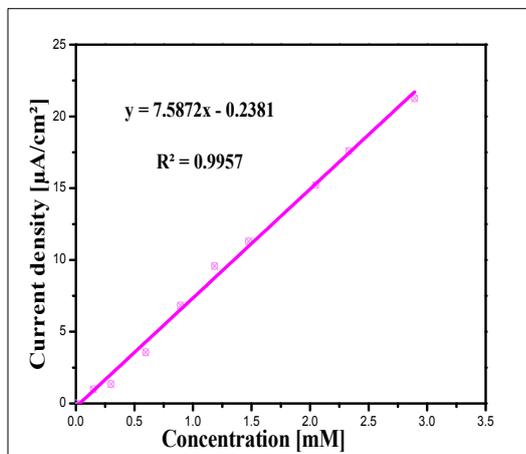
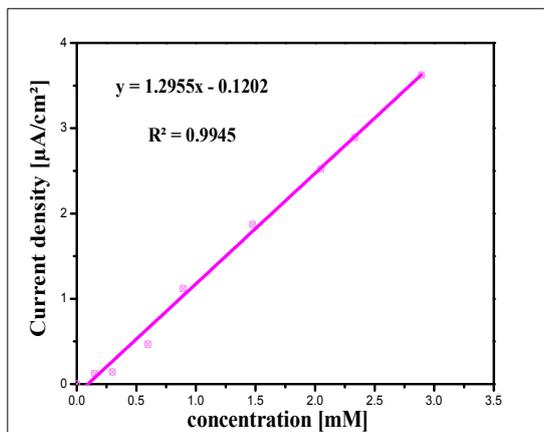
III. 6 3 .5. الدراسة الكهر وكيميائية للتآزر بين الثنائية حمض الأسكوربيك والروتين بنسبة 50% لكل منهما:



المنحنى (a22.III): الفولتاموغرام الحلقي لمجموعة تراكيز متدرجة لـ Rut و AA تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول موفي $\text{pH} = 2$, 12.5ml من EtOH و الكهروليت المساعد 0.1 M KCl .

المنحنى (b22.III): منحنيات الموجة المربعة لمجموعة تراكيز متدرجة لـ Rut و AA تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول موفي $\text{pH} = 2$, 12.5ml من EtOH و الكهروليت المساعد 0.1M KCl .

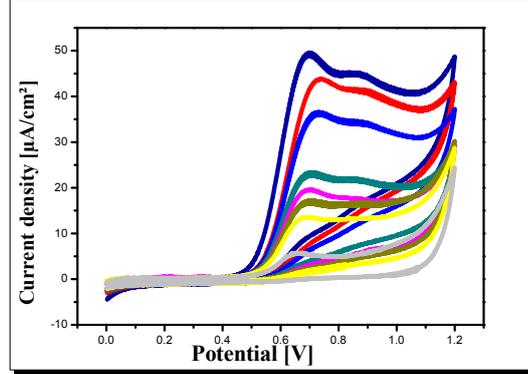
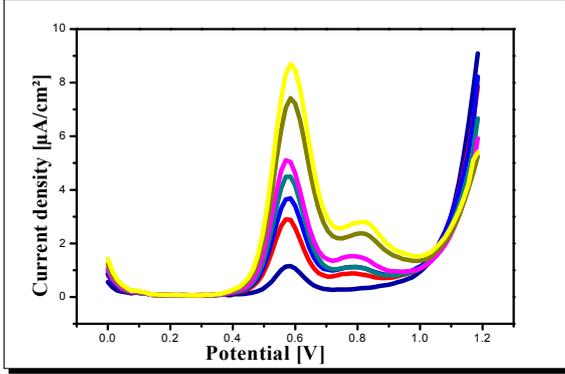
♦ وينفس طريقة الـ AA نرسم المنحنيات VC و SWV الخاصة بـ AA و Rut لتراكيز المركبات القياسية من 0.1 إلى 2 ml, نقوم بتحديد كثافة التيار المصعدية لكل فولتاموغرام لرسم منحنى AA و Rut بدلالة التركيز $i_p = f(C)$.



المنحنى (b23.III): المنحنى القياسي لـ Rut و AA الخاص بالموجة المربعة $i_p = f(C)$ تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول موفي 2 = pH 12.5ml من EtOH والكهروليت المساعد 0.1M من KCl .

المنحنى (a23.III): المنحنى القياسي لـ Rut و AA الخاص بالفولتأمبيرومتر الحلقي $i_p = f(C)$ تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول موفي 2 = pH 12.5ml من EtOH والكهروليت المساعد 0.1M من KCl .

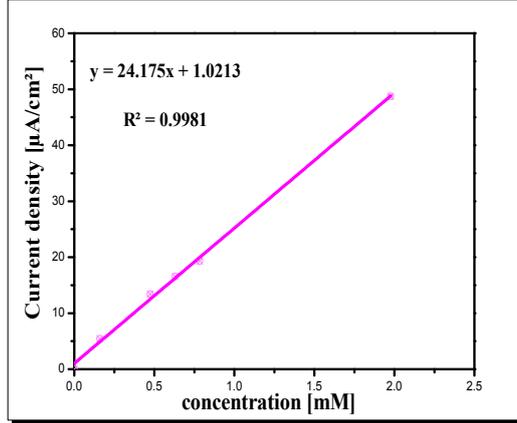
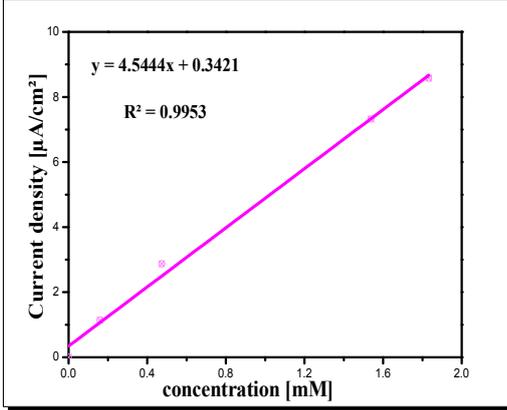
III . 3 . 6 . 6 . الدراسة الكهر وكيميائية للتآزر بين الثنائية حمض الغاليك و BHA بنسبة 50% لكل منهما:



المنحنى (a24.III): الفولتاموغرام الحلقي لمجموعة تراكيز متدرجة لـ BHA و GA تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول موقى $\text{pH} = 2$, 12.5ml من EtOH و الكهروليت المساعد M 0.1 من KCl .

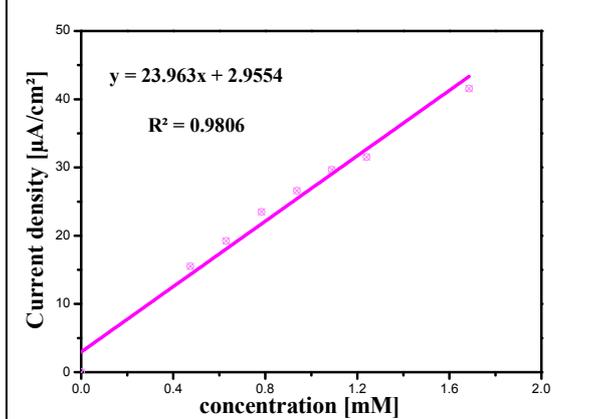
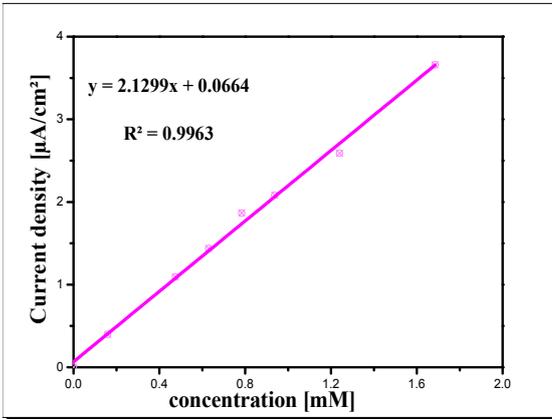
المنحنى (b24.III): منحنيات الموجة المربعة لمجموعة تراكيز متدرجة لـ BHA و GA تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول موقى $\text{pH} = 2$, 12.5ml من EtOH و الكهروليت المساعد 0.1M من KCl .

- ♦ وينفس طريقة الـ AA نرسم المنحنيات VC و SWV الخاصة بـ GA و BHA /تركيز المركبات القياسية من 0.1 إلى 2 ml, نقوم بتحديد كثافة التيار المصعدية لكل فولتاموغرام لرسم منحنى BHA و GA بدلالة التركيز $i_p = f(C)$.



المنحنى (b25.iii): المنحنى القياسي لـ GA و BHA الخاص بالموجة المربعة $i_p = f(C)$ تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول موقى pH = 2, 12.5ml من EtOH و الكهروليت المساعد 0.1M من KCl.

المنحنى (a25.iii): المنحنى القياسي لـ GA و BHA الخاص بالفولتأميرومترى الحلقي $i_p = f(C)$ تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول موقى pH = 2, 12.5ml من EtOH و الكهروليت المساعد 0.1M من KCl.



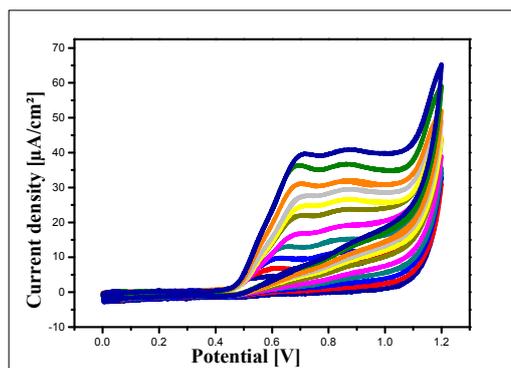
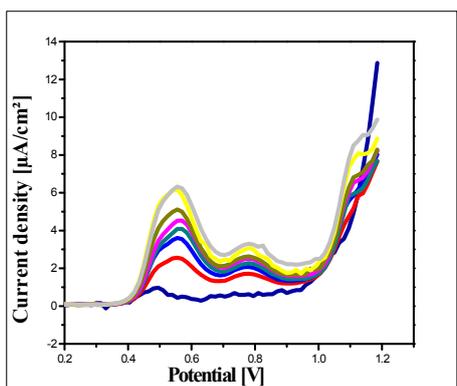
المنحنى (b27.III): المنحنى القياسي لـ الخاص

بالموجة المربعة $i_p = f(C)$ و GA و BHT
تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول
موقى $\text{pH} = 2$, 12.5ml من EtOH و
الكهروليت المساعد 0.1M من KCl .

المنحنى (a27.III): المنحنى القياسي لـ

الخاص بالفولتأميرومترى الحلقي $i_p = f(C)$
و GA و BHT تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من
محلول موقى $\text{pH} = 2$, 12.5ml من EtOH و
الكهروليت المساعد 0.1M من KCl .

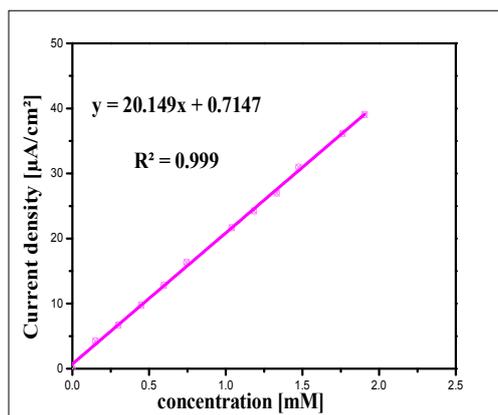
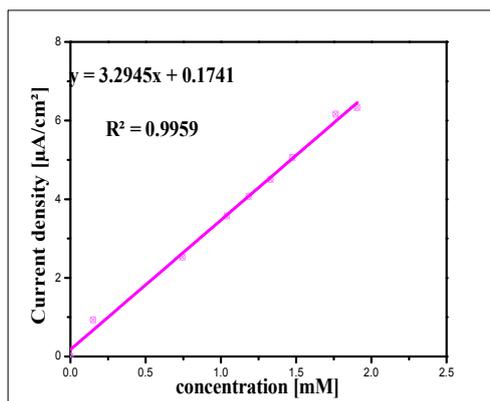
III . 3 . 6 . 8 . الدراسة الكهر وكيميائية للتآزر بين الثنائية حمض الغاليك والروتين بنسبة 50% لكل منهما:



المنحنى (b28.III): منحنيات الموجة المربعة لمجموعة تراكيز متدرجة لـ Rut و AA تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول مقي 2 , pH = 12.5ml من EtOH والكهروليت المساعد 0.1M من KCl.

المنحنى (a28.III): الفولتاموغرام الحلقي لمجموعة تراكيز متدرجة لـ Rut و AA تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول مقي 2 , pH = 12.5ml من EtOH والكهروليت المساعد 0.1M من KCl .

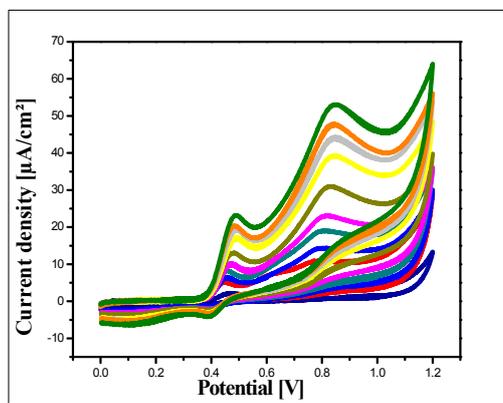
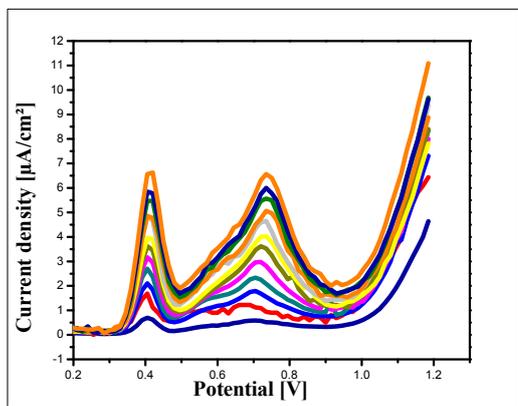
♦ وينفس طريقة الـ AA نرسم المنحنيات VC وSWV الخاصة بـ Rut و AA
 لتركيز المركبات القياسية من 0.1 إلى 2 ml، نقوم بتحديد كثافة التيار المصعدية لكل فولتاموغرام
 لرسم منحنى Rut و AA بدلالة التركيز $i_p = f(C)$.



المنحنى (b29.III): المنحنى القياسي لـ Rut و AA الخاص بالموجة المربعة
 $i_p = f(C)$ تحتوي خلية التحليل على:
 12.5ml من محلول موقى pH = 2,
 12.5ml من EtOH و الكهروليت
 المساعد 0.1M من KCl.

المنحنى (a29.III): المنحنى القياسي لـ Rut و AA الخاص بالفولتأميرومترى الحلقى
 $i_p = f(C)$ تحتوي خلية التحليل على:
 12.5ml من محلول موقى pH = 2,
 12.5ml من EtOH و الكهروليت المساعد M
 0.1 من KCl.

III . 3 . 6 . 9 . الدراسة الكهر وكيميائية للتآزر بين الثنائية حمض الغاليك و الكيرسيتين بنسبة 50% لكل منهما:



المنحنى (b30.III): منحنيات الموجة المربعة

لمجموعة تراكيز متدرجة لـ GA و Quer تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول موفي $pH = 2$, 12.5ml من EtOH و الكهروليت المساعد 0.1M من KCl .

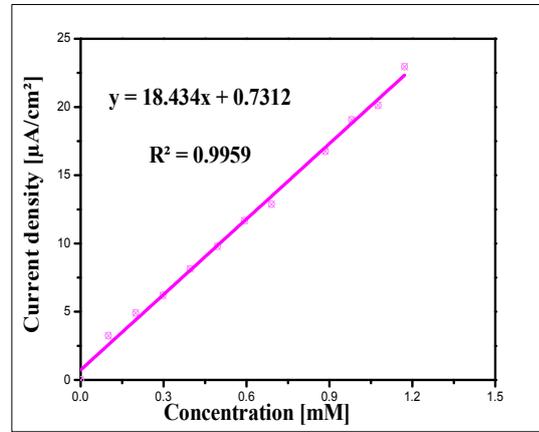
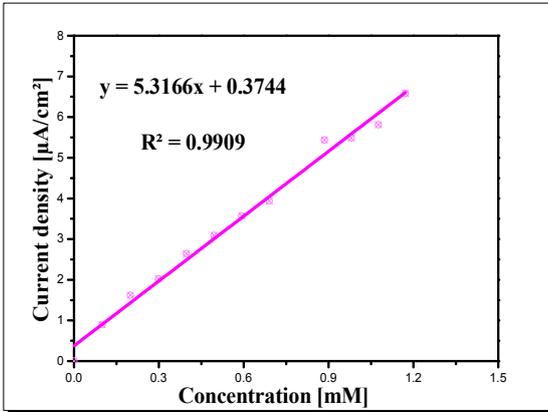
المنحنى (a30.III): الفولتاموغرام الحلقي

لمجموعة تراكيز متدرجة لـ GA و Quer تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول موفي $pH = 2$, 12.5ml من EtOH و الكهروليت المساعد 0.1M من KCl .

♦ وينفس طريقة الـ AA نرسم المنحنيات VC و SWV الخاصة بـ GA و Quer

لتركيز المركبات القياسية من 0.1 إلى 2 ml، نقوم بتحديد كثافة التيار المصعدية لكل فولتاموغرام لرسم

منحنى لـ GA و Quer بدلالة التركيز $i_p = f(C)$.



المنحنى (b31.iii): المنحنى القياسي لـ Quer و

$$i_p = f(C) \text{ الخاص بالموجة المربعة } GA$$

تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول

موقى $\text{pH} = 2$, 12.5ml من EtOH و

الكهروليت المساعد 0.1M من KCl .

المنحنى (a31.iii): المنحنى القياسي لـ Quer و

GA الخاص بالفولتأمتريوم تري الحلقى

$$i_p = f(C) \text{ تحتوي خلية التحليل على:}$$

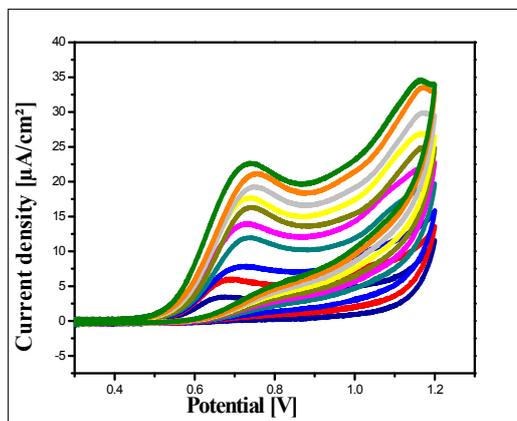
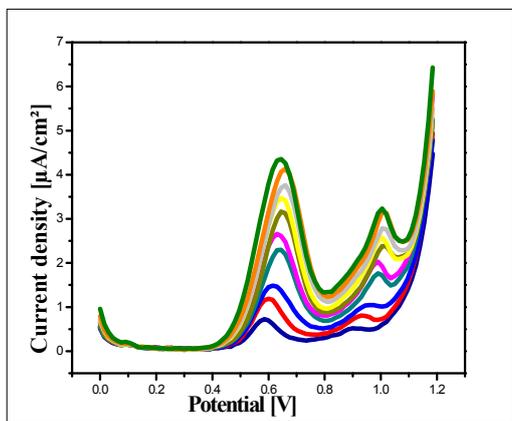
12.5ml من محلول موقى $\text{pH} = 2$, 12.5ml

من EtOH و الكهروليت المساعد 0.1M من

KCl .

III. 3. 6. 10. الدراسة الكهر وكيميائية للتآزر بين الثنائية BHA و BHT بنسبة 50% لكل

منهما:



المنحنى (b32.III): منحنيات الموجة المربعة

لمجموعة تراكيز متدرجة لـ BHT و BHA

تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول

موقى $\text{pH} = 2$, 12.5ml من EtOH و

الكهروليت المساعد 0.1M من KCl .

المنحنى (a32.III): الفولتاموغرام الحلقي

لمجموعة تراكيز متدرجة لـ BHT و BHA

تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من

محلول موقى $\text{pH} = 2$, 12.5ml من

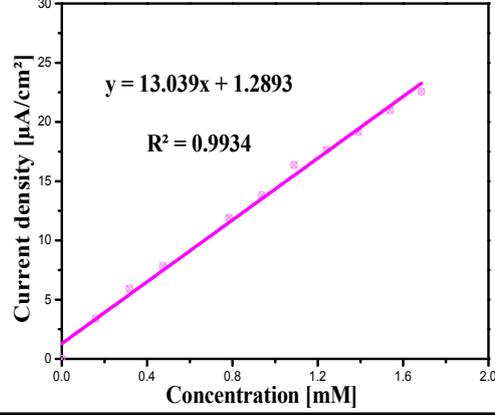
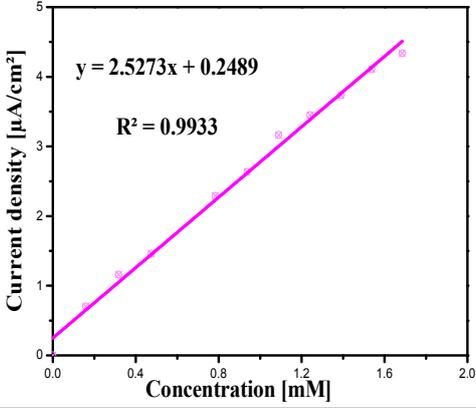
EtOH والكهروليت المساعد 0.1M من

KCl.

• وبنفس طريقة الـ AA نرسم المنحنيات VC و SWV الخاصة بـ BHT و BHA /تركيز المركبات

القياسية من 0.1 إلى 2 ml, نقوم بتحديد كثافة التيار المصعدية لكل فولتاموغرام لرسم منحنى

لـ BHT و BHA بدلالة التركيز $i_p = f(C)$.



المنحنى (b33.III): المنحنى القياسي لـ BHA

و BHT الخاص بالموجة المربعة $i_p = f(C)$

تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من

محلول موقى $\text{pH} = 2$, 12.5ml من

EtOH والكهروليت المساعد 0.1M من

.KCl

المنحنى (a33.III): المنحنى القياسي لـ BHA

و BHT الخاص بالفولتأ أمبيرومترى الحلقي

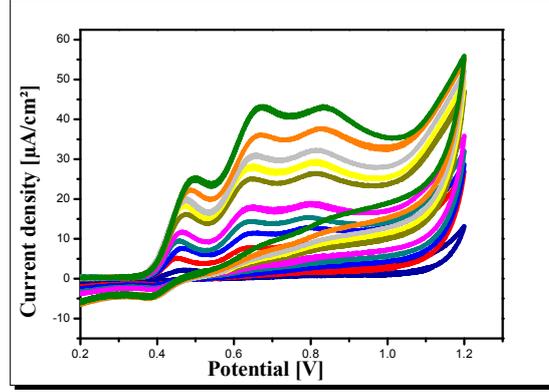
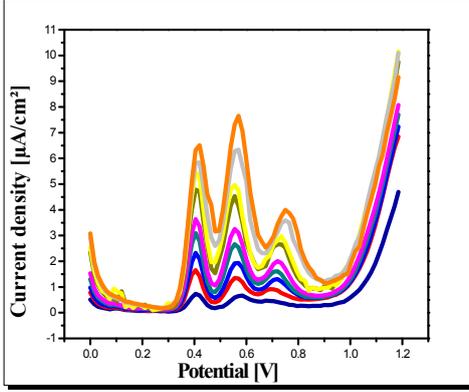
$i_p = f(C)$ تحتوي خلية التحليل على:

12.5ml من محلول موقى $\text{pH} = 2$,

12.5ml من EtOH والكهروليت المساعد M

0.1 من KCl .

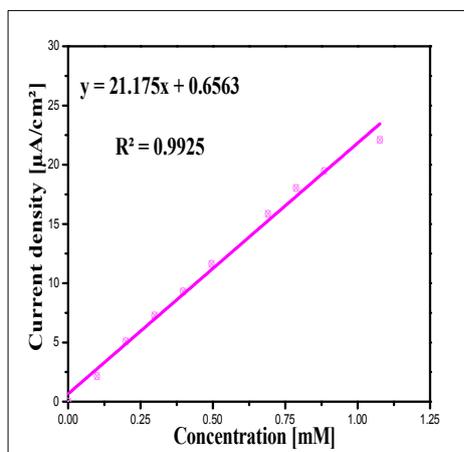
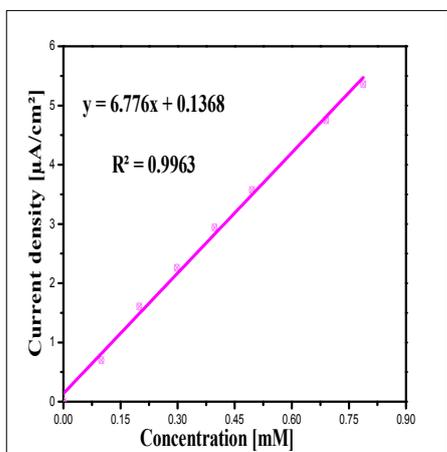
III. 3. 6. 11. الدراسة الكهر وكيميائية للتآزر بين الثنائية BHA و الكيرسيتين بنسبة 50% لكل منهما:



المنحنى (b34.III): منحنيات الموجة المربعة لمجموعة تراكيز متدرجة لـ BHA و Quer تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول موفي $pH = 2$, 12.5ml من EtOH و الكهروليت المساعد 0.1M من KCl .

المنحنى (a34.III): الفولتاموغرام الحلقي لمجموعة تراكيز متدرجة لـ BHA و Quer تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول موفي $pH = 2$, 12.5ml من EtOH و الكهروليت المساعد 0.1M من KCl .

- وبنفس طريقة الـ AA نرسم المنحنيات VC و SWV الخاصة بـ BHA و Quer لتراكيز المركبات القياسية من 0.1 إلى 2 ml, نقوم بتحديد كثافة التيار المصعدية لكل فولتاموغرام لرسم منحنى BHA و Quer بدلالة التركيز $i_p = f(C)$.



المنحنى (b35.iii): المنحنى القياسي

لـ BHA و Quer الخاص بالموجة المربعة

تحتوي خلية التحليل على: $i_p = f(C)$

12.5ml من محلول موفي $\text{pH} = 2$,

12.5ml من EtOH و الكهروليت

المساعد 0.1M من KCl .

المنحنى (a35.iii): المنحنى القياسي

لـ BHA و Quer الخاص

بالفولتأ أمبيرومتري الحلقي $i_p = f(C)$

تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من

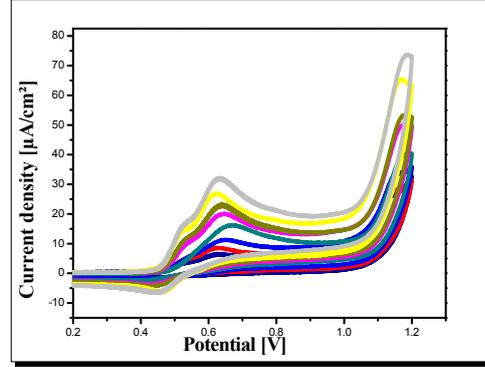
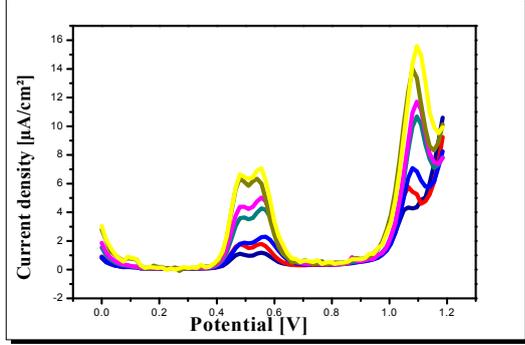
محلول موفي $\text{pH} = 2$, 12.5ml من

EtOH و الكهروليت المساعد 0.1M

من KCl .

III . 3 . 6 . 12 . الدراسة الكهر وكيميائية للتآزر بين الثنائية BHA و الروتين بنسبة 50% لكل

منهما:



المنحنى (b36.III): منحنيات الموجة

المربعة لمجموعة تراكيز متدرجة لـ BHA و

Rut

تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول

موقى pH = 2 , 12.5ml من EtOH و

الكهروليت المساعد 0.1M من KCl .

المنحنى (a36.III): الفولتاموغرام الحلقي

لمجموعة تراكيز متدرجة لـ BHA و Rut

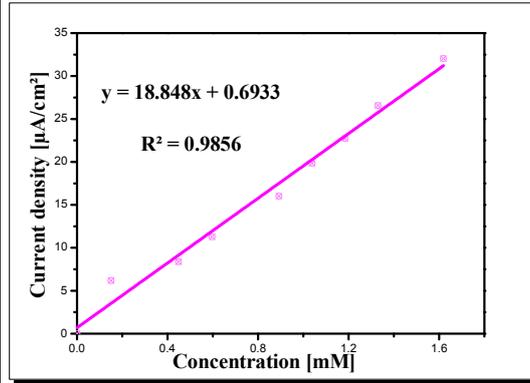
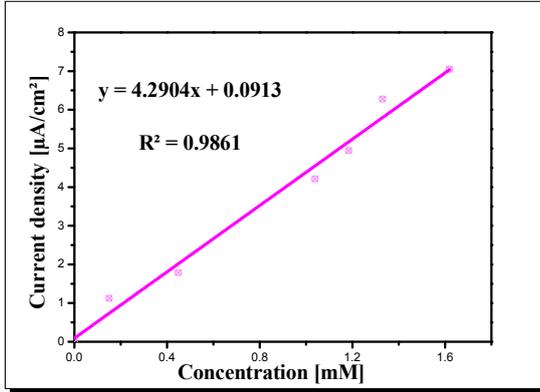
تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من

محلول موقى pH = 2 , 12.5ml من

EtOH و الكهروليت المساعد 0.1M من

KCl .

- وينفس طريقة الـ AA نرسم المنحنيات VC و SWV الخاصة بـ Rut و BHA لتراكيز المركبات القياسية من 0.1 إلى 2 ml , نقوم بتحديد كثافة التيار المصعدية لكل فولتاموغرام لرسم منحنى Rut و BHA بدلالة التركيز $i_p = f(C)$.



المنحنى (b37.III): المنحنى القياسي لـ Rut و BHA الخاص بالموجة المربعة

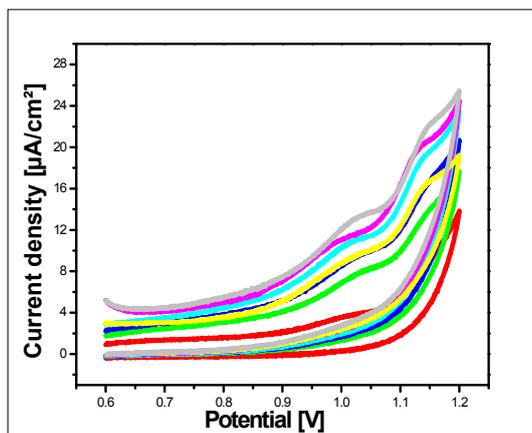
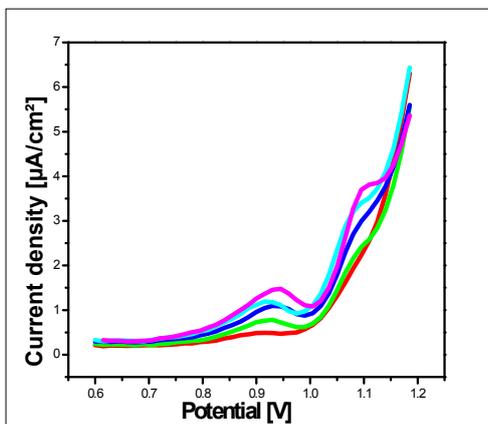
$i_p = f(C)$ تحتوي خلية التحليل على:
 12.5ml من محلول موفي $\text{pH} = 2$,
 12.5ml من EtOH و الكهروليت
 المساعد 0.1M من KCl .

المنحنى (a37.III): المنحنى القياسي لـ Rut و BHA الخاص بالفولتأمبيرومترى الحلقي

$i_p = f(C)$ تحتوي خلية التحليل على:
 12.5ml من محلول موفي $\text{pH} = 2$,
 12.5ml من EtOH و الكهروليت
 المساعد 0.1M من KCl .

III. 3. 6. 13. الدراسة الكهر وكيميائية للتآزر بين الثنائية BHT و الروتين بنسبة 50% لكل

منهما:



المنحنى (b38.III): منحنيات الموجة

المربعة لمجموعة تراكيز متدرجة لـ

Rut و BHT تحتوي خلية التحليل على:

12.5ml من محلول موفي $\text{pH} = 2$,

12.5ml من EtOH و الكهروليت

المساعد 0.1M من KCl .

المنحنى (a38.III): الفولتاموغرام الحلقي

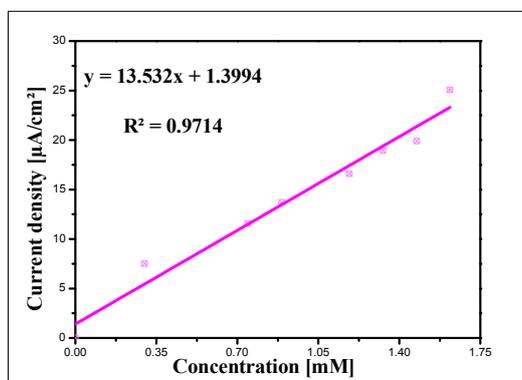
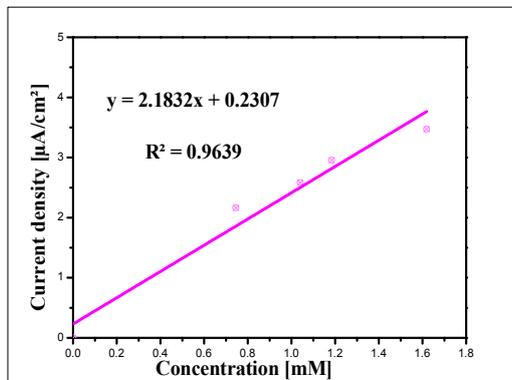
لمجموعة تراكيز متدرجة لـ Rut و BHT

تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول

موفي $\text{pH} = 2$, 12.5ml من EtOH و

الكهروليت المساعد 0.1M من KCl .

- وينفس طريقة الـ AA نرسم المنحنيات VC و SWV الخاصة بـ Rut و BHT لتراكيز المركبات القياسية من 0.1 إلى 2 ml, نقوم بتحديد كثافة التيار المصعدية لكل فولتاموغرام لرسم منحنى Rut و BHT بدلالة التركيز $i_p = f(C)$.



المنحنى (b39.iii): المنحنى القياسي لـ

الخاص بالموجة المربعة $i_p = f(C)$

تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من

محلول موقى pH = 2 , 12.5ml من

EtOH والكهروليت المساعد 0.1M من

. KCl

المنحنى (a39.iii): المنحنى القياسي لـ

الخاص بالفولتأمتري الحلقي

$i_p = f(C)$

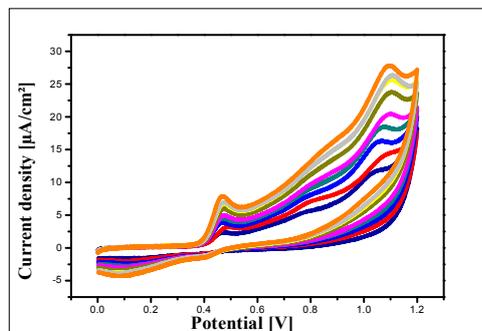
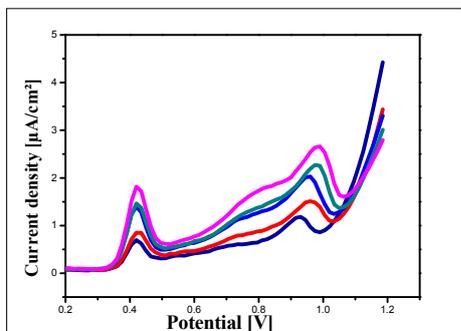
تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول

موقى pH = 2 , 12.5ml من EtOH و

الكهروليت المساعد 0.1M من KCl .

III. 3. 6. 14. الدراسة الكهر وكيميائية للتآزر بين الثنائية BHT و الكيرسيتين بنسبة 50% لكل

منهما:



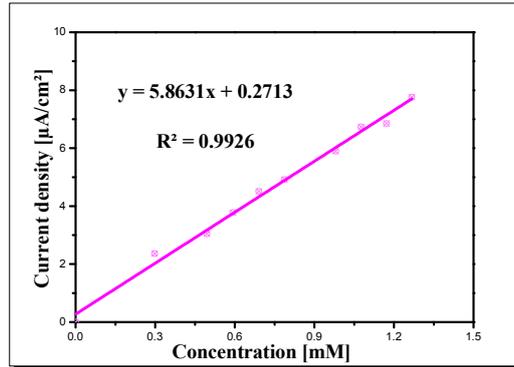
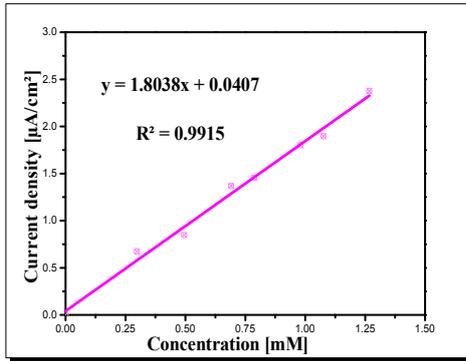
المنحنى (b40.III): منحنيات الموجة المربعة

لمجموعة تراكيز متدرجة لـ Quer و BHT تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول موفي pH = 2, 12.5ml من EtOH والكهروليت المساعد 0.1M من KCl.

المنحنى (a40.III): الفولتاموغرام الحلقي

لمجموعة تراكيز متدرجة لـ Quer و BHT تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول موفي pH = 2, 12.5ml من EtOH والكهروليت المساعد 0.1M من KCl.

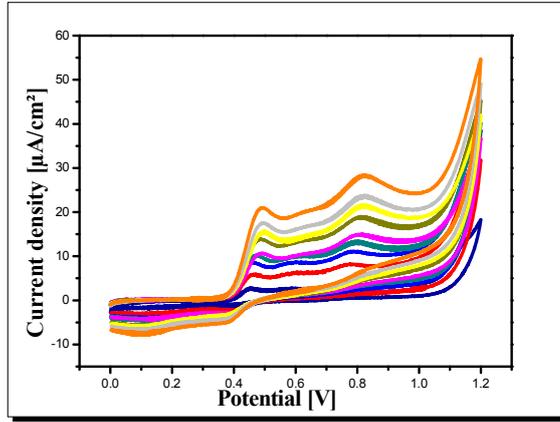
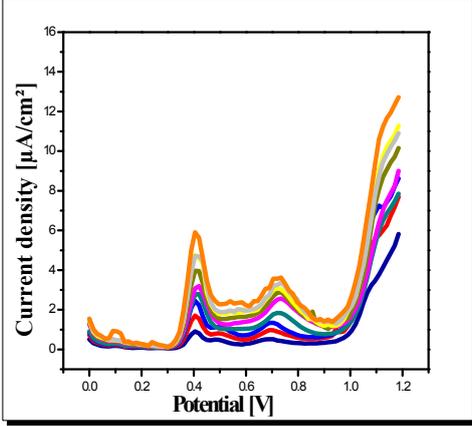
- وينفس طريقة الـ AA نرسم المنحنيات VC و SWV الخاصة بـ Quer و BHT لتراكيز المركبات القياسية من 0.1 إلى 2 ml, نقوم بتحديد كثافة التيار المصعدية لكل فولتاموغرام لرسم منحنى Quer و BHT بدلالة التركيز $i_p = f(C)$.



المنحنى (b41.iii): المنحنى القياسي لـ BHT و Querc الخاص بالموجة المربعة. $i_p = f(C)$ تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول موفي $pH = 2$, 12.5ml من EtOH و الكهروليت المساعد 0.1M من KCl.

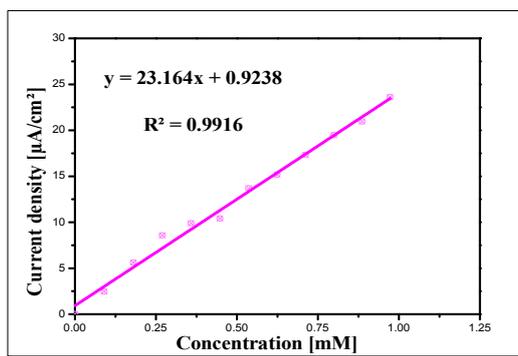
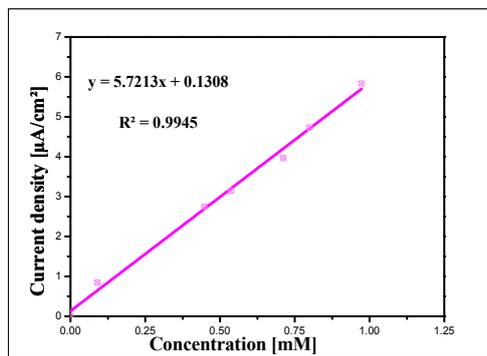
المنحنى (a41.iii): المنحنى القياسي لـ BHT و Querc الخاص بالفولتأميرومتر الحلقى $i_p = f(C)$ تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول موفي $pH = 2$, 12.5ml من EtOH و الكهروليت المساعد 0.1M من KCl.

III. 3. 6. 15. الدراسة الكهر وكيميائية للتآزر بين الثنائية الروتين و الكيرسيتين بنسبة 50% لكل منهما:



المنحنى (b42.III): منحنيات الموجة المربعة لمجموعة تراكيز متدرجة ل Rut و Quer تحتوخلية التحليل على: 12.5ml من محلول موفي $pH = 2$ من 12.5ml من EtOH والكهروليت المساعد 0.1M من KCl.

المنحنى (a42.III): الفولتاموغرام الحلقي لمجموعة تراكيز متدرجة ل Rut و Quer تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول موفي $pH = 2$ من 12.5ml من EtOH والكهروليت المساعد M 0.1 من KCl.



المنحنى (b43.III): المنحنى القياسي لـ

الخاص بالموجة المربعة $i_p = f(C)$.

لـ Rut و Quer تحتوي خلية التحليل على:

12.5ml من محلول موفي $\text{pH} = 2$,

12.5ml من EtOH و الكهروليت

المساعد 0.1M من KCl.

المنحنى (a43.III): المنحنى القياسي لـ

الخاص بالفولتأ أمبيرومتري الحلقي $i_p = f(C)$

لـ Rut و Quer تحتوي خلية التحليل على:

12.5ml من محلول موفي $\text{pH} = 2$,

من EtOH و الكهروليت المساعد 0.1M من

KCl.



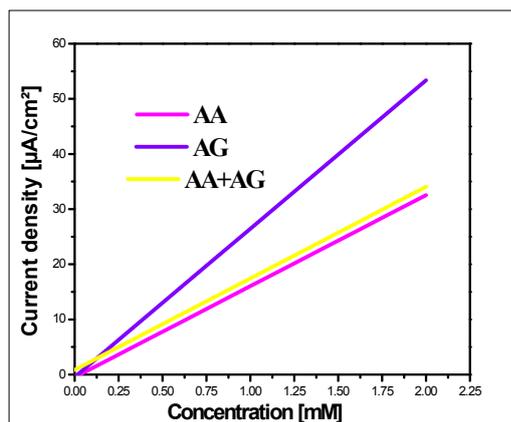
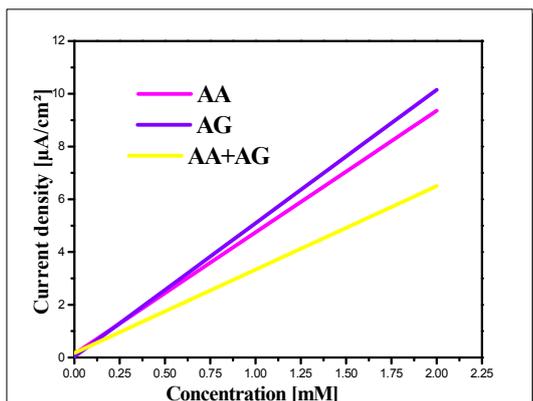
المنحنى (44.III): مخطط توضيحي لقيم كثافة التيار العظمى الخاصة بكل مركب فينولي قياسي

مدروس عند $C=2\text{mM}$

III.4 . مقارنة قيم كثافة التيار الخاصة بتآزر متعدد الفينول :

منحنى

AA+AG+AA-AC



المنحنى (b.58.III): المنحنيات القياسية لـ AA و

AG والتآزر بينهما الخاصة بالموجة المربعة

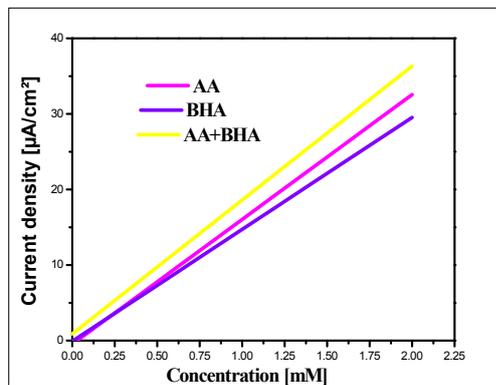
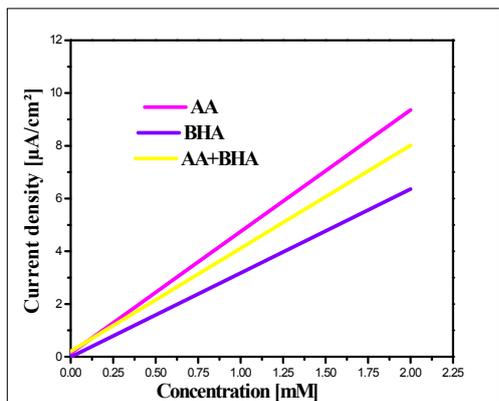
$$i_p = f(C)$$

المنحنى (a.58.III): المنحنيات القياسية لـ AA و

AG والتآزر بينهما الخاص بالفولتأمتري

$$i_p = f(C) \text{ الحلقي}$$

AA+BHA+AA-BHA .2

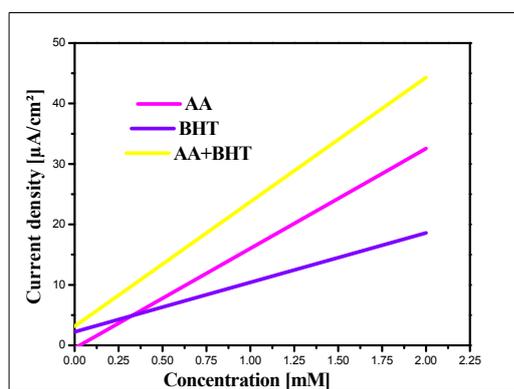
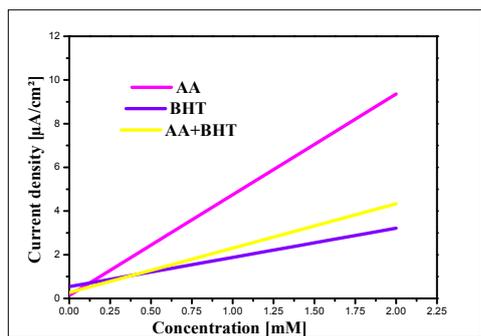


المنحنى (b59.III): المنحنيات القياسية لـ AA و BHA الخاصة بالموجة المربعة $i_p = f(C)$

المنحنى (a59.III): المنحنيات القياسية لـ AA و BHA الخاصة بالفولتأمتري الحلقى $i_p = f(C)$

$$i_p = f(C)$$

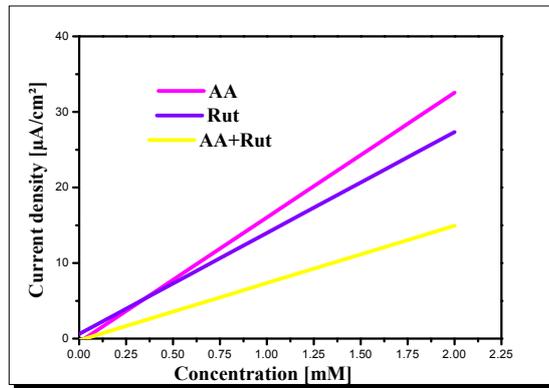
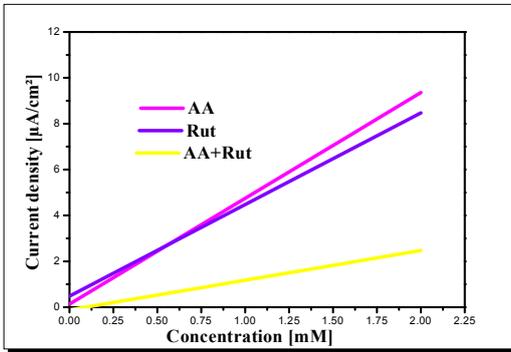
AA+BHT+AA-BHT .3



المنحنى (b60.III): المنحنيات القياسية لـ AA و BHT والتآزر بينهما الخاصة بالموجة المربعة المربعة $i_p = f(C)$

المنحنى (a60.III): المنحنيات القياسية لـ AA و BHT والتآزر بينهما الخاص بالفولتأمبيرومتر الحلقي $i_p = f(C)$

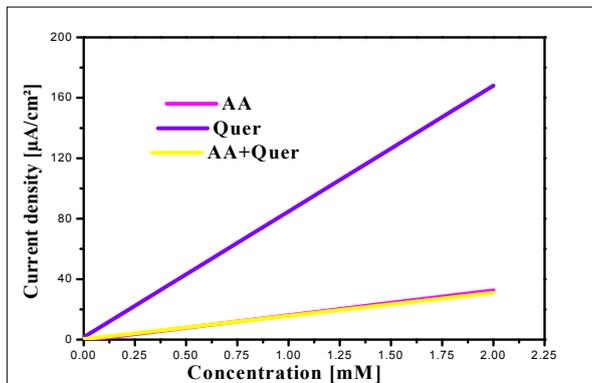
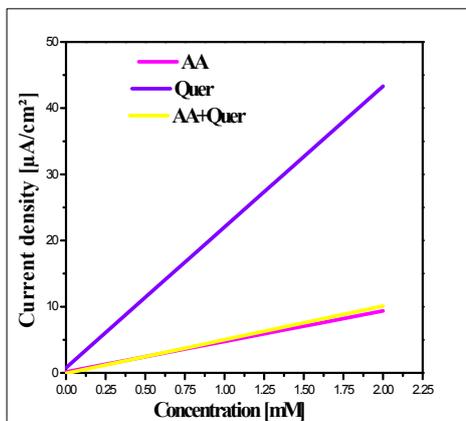
AA+Rut+AA-Rut .4



المنحنى (b61.III): المنحنيات القياسية لـ AA و Rut والتآزر بينهما الخاصة بالموجة المربعة المربعة $i_p = f(C)$

المنحنى (a61.III): المنحنيات القياسية لـ AA و Rut والتآزر بينهما الخاص بالفولتأمبيرومتر الحلقي $i_p = f(C)$

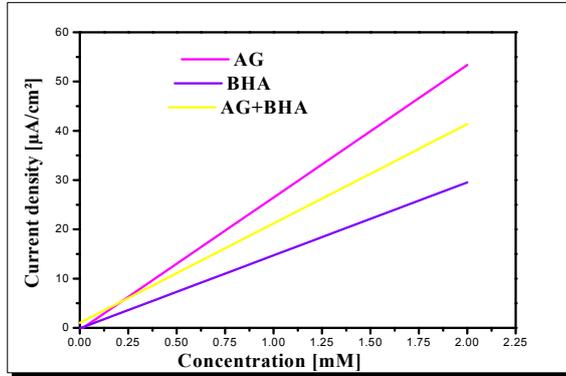
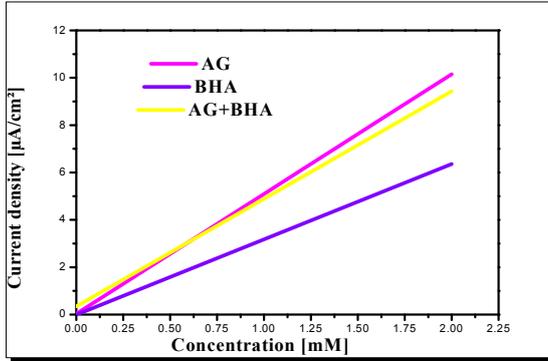
AA+Quer+AA-Quer .5



المنحنى (b62.III): المنحنيات القياسية لـ AA و Quer والتأزر بينهما الخاصة بالموجة المربعة $i_p = f(C)$

المنحنى (a62.III): المنحنيات القياسية لـ AA و Quer والتأزر بينهما الخاص بالفولتأمبيرومترى الحلقي $i_p = f(C)$

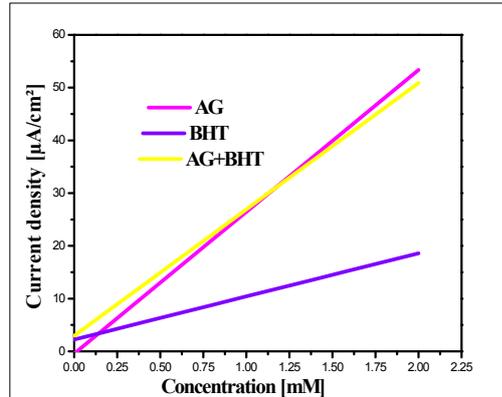
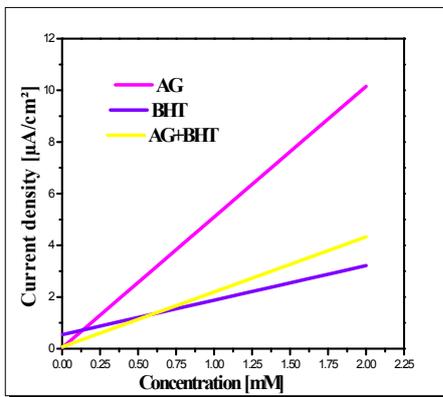
AG+BHA+AG-BHA .6



المنحنى (b63.III): المنحنيات القياسية لـ AG+BHA والتأزر بينهما الخاصة بالموجة المربعة $i_p = f(C)$

المنحنى (a63.III): المنحنيات القياسية لـ AG+BHA والتأزر بينهما الخاص بالفولتأمبيرومترى الحلقى $i_p = f(C)$

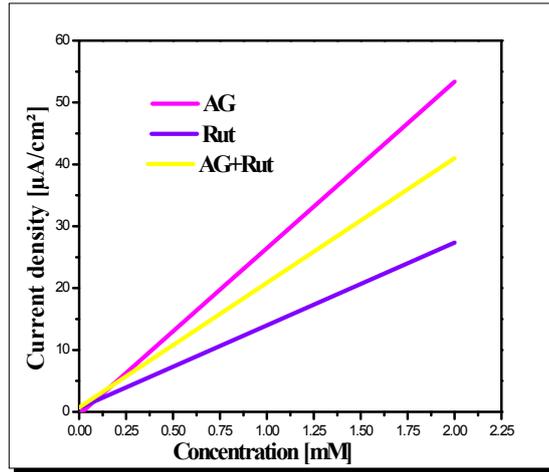
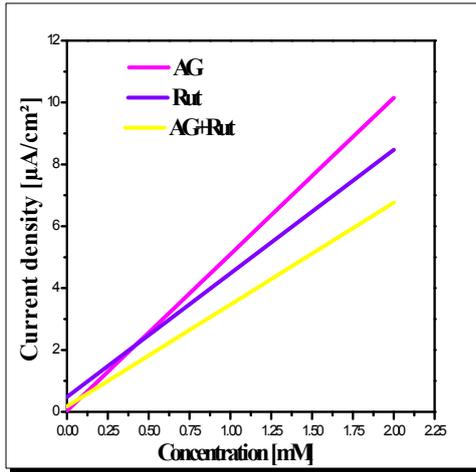
AG+BHT+AG-BHT.7



المنحنى (b64.III): المنحنيات القياسية لـ
GA و BHT والتأزر بينهما الخاصة بالموجة
المربعة $i_p = f(C)$

المنحنى (a64.III): المنحنيات القياسية لـ
GA و BHT
والتأزر بينهما الخاص بالفولتأمبيرومتر الحلقي
 $i_p = f(C)$

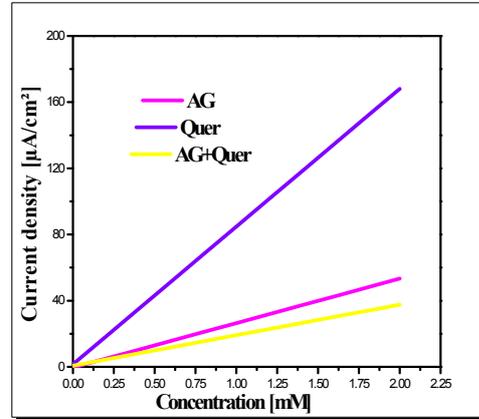
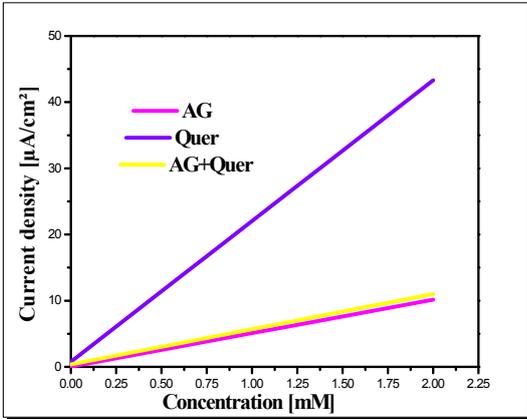
AG+Rut+AG-Rut .8



المنحنى (b65.III): المنحنيات القياسية لـ
AG و Rut والتأزر بينهما الخاصة بالموجة
المربعة $i_p = f(C)$

المنحنى (a65.III): المنحنيات القياسية لـ AG و Rut
والتأزر بينهما الخاص بالفولتأمبيرومتر الحلقي
 $i_p = f(C)$

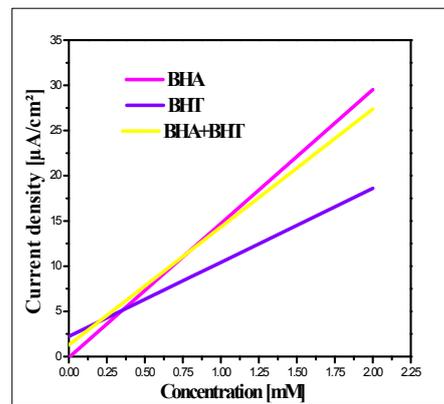
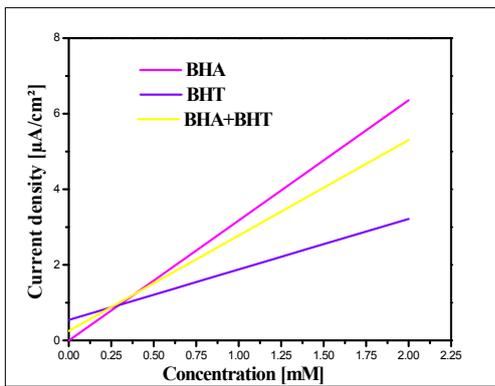
AG+Quer+AG-Quer . 9



المنحنى (b66.III): المنحنيات القياسية لـ AG و Quer والتأزر بينهما الخاصة بالموجة المربعة $i_p = f(C)$

المنحنى (a66.III): المنحنيات القياسية لـ AG و Quer والتأزر بينهما الخاص بالفولتأمبيرومترى الحلقي $i_p = f(C)$

BHA+BHT+BHA-BHT . 10



المنحنى (b67.III): المنحنيات القياسية لـ BHA و BHT والتأزر بينهما الخاصة بالموجة المربعة $i_p = f(C)$

المنحنى (a67.III): المنحنيات القياسية لـ BHA و BHT والتأزر بينهما الخاص بالفولتأمبيرومترى الحلقي $i_p = f(C)$

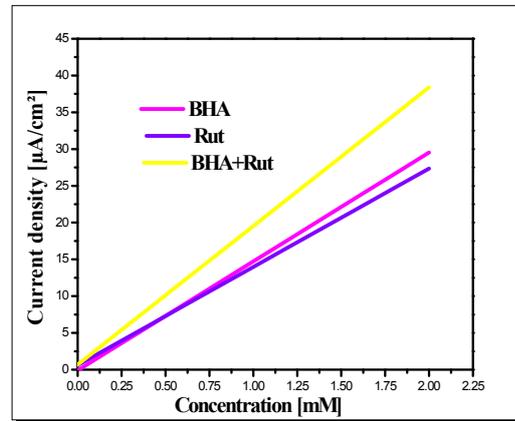
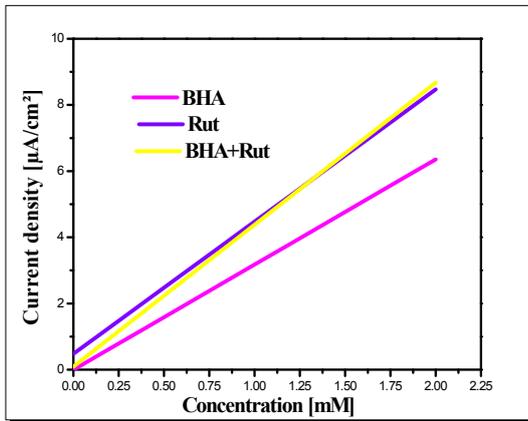
BHA+BHT والتآزر بينهما الخاصة بالموجة

$$i_p = f(C) \text{ المربعة}$$

BHA+BHT والتآزر بينهما الخاصة

$$i_p = f(C) \text{ بالفولتأميرومتر الحلقي}$$

BHA+Rut+BHA-Rut .11



المنحنى (b68.III): المنحنيات القياسية لـ

BHA+Rut والتآزر بينهما الخاصة بالموجة

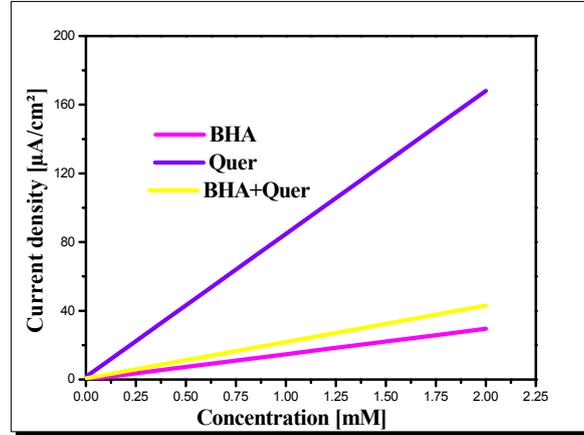
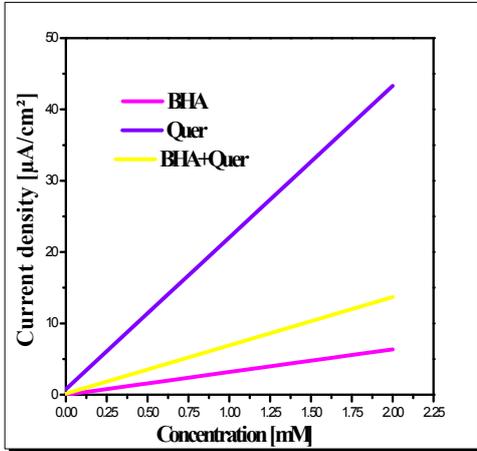
$$i_p = f(C) \text{ المربعة}$$

المنحنى (a68.III): المنحنيات القياسية لـ

BHA+Rut والتآزر بينهما الخاصة

$$i_p = f(C) \text{ بالفولتأميرومتر الحلقي}$$

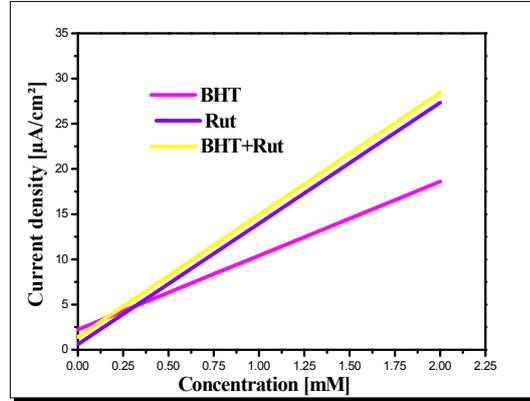
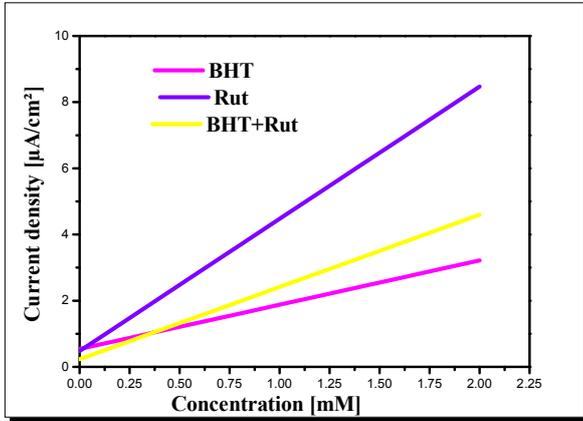
BHA+Quer+BHA-Quer .12



المنحنى (b.69.III): المنحنيات القياسية لـ BHA+Quer والتأزر بينهما الخاصة بالموجة المربعة $i_p = f(C)$

المنحنى (a.69.III): المنحنيات القياسية لـ BHA+Quer والتأزر بينهما الخاصة بالفولتأمبيرومتر الحلقي $i_p = f(C)$

BHT+Rut+BHT-Rut .13



المنحنى (b70.III): المنحنيات القياسية لـ

BHT و Rut والتأزر بينهما الخاصة بالموجة المربعة

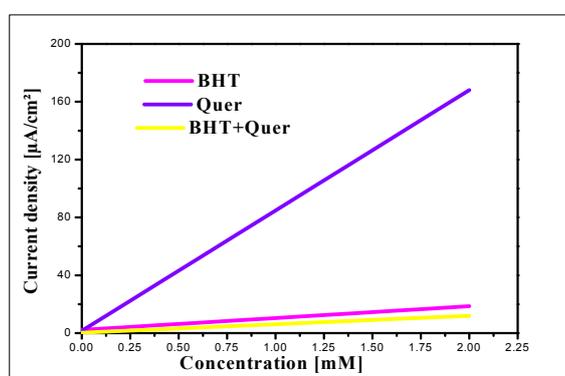
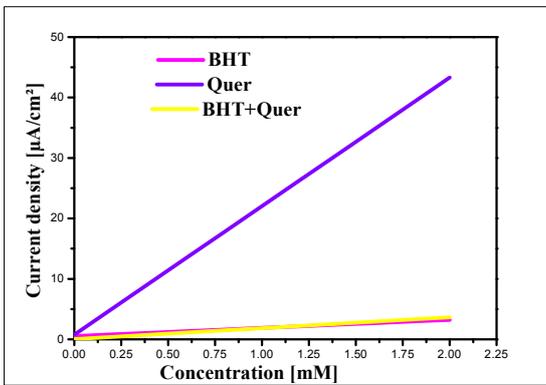
$$i_p = f(C)$$

المنحنى (a70.III): المنحنيات القياسية لـ

BHT+Rut والتأزر بينهما الخاصة

بالفولتأمبيرومتر الحلقى $i_p = f(C)$

BHT+Quer+BHT-Quer .14



المنحنى (a71.iii): المنحنيات القياسية لـ

BHT+Quer والتآزر بينهما الخاصة

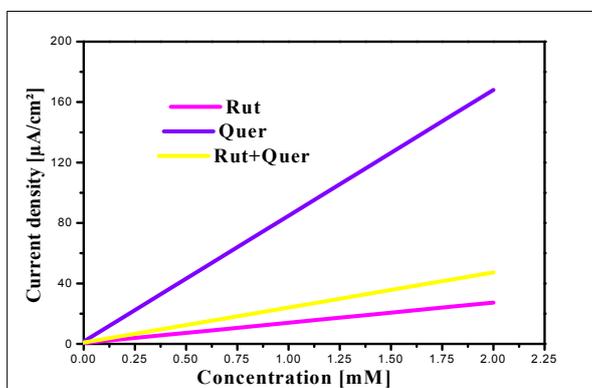
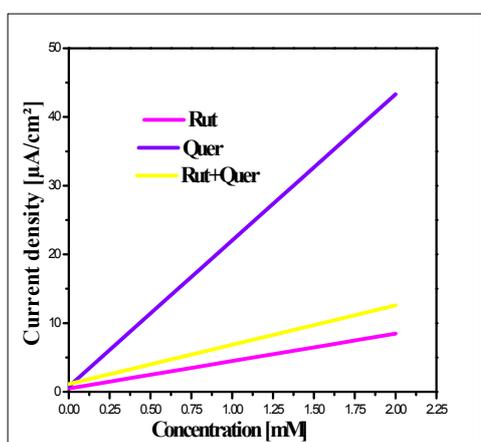
بالفولتأمبيرومتر الحلقي $i_p = f(C)$

المنحنى (b71.iii): المنحنيات القياسية لـ

BHT وQuer والتآزر بينهما الخاصة بالموجة

المربعة $i_p = f(C)$

15. Rut+Quer+Rut-Quer



المنحنى (a72.iii): المنحنيات القياسية لـ Rut وQuer

والتآزر بينهما الخاصة بالفولتأمبيرومتر الحلقي

$i_p = f(C)$

المنحنى (b72.iii): المنحنيات القياسية لـ

Rut وQuer والتآزر بينهما الخاصة بالموجة

المربعة $i_p = f(C)$

III. 5. جني عينات البروبوليس:

تتحكم الظروف الناشئة عن تداخل الموقع بالنسبة لدرجات العرض وتوزع اليابسة والماء والتضاريس واتجاهاتها وارتفاعاتها واتساع مساحة الجزائر في رسم الصورة المناخية العامة للبلاد حيث تظهر نطاقات مناخية رئيسة لها بصمات مميزة تمتد على شكل نطاقات عرضية من الغرب ومن الشرق ومرتببة من الشمال إلى الجنوب.

حيث أن عينات البروبوليس المدروسة جمعت من مناطق مختلفة، هذه المناطق اختيرت حسب طبيعة المناخ الذي يعتبر حالة الجو السائدة في مكان ما خلال فصل أو سنة.

الوسط - بومرداس (منحلة يسر):

ذات مناخ شبه رطب حيث يغطي هذا المناخ المناطق المحاذية لساحل البحر شمال الأطلس التلي طقسه معتدل.

الغرب - مستغانم (سيدي خطاب):

ذات مناخ شبه جاف حيث يغطي هذا المناخ الهضاب العليا وهو مناخ انتقالي بين المناخ المتوسط والصحراوي.

بجاية: ذات مناخ رطب هي منطقة مناخية تتميز بصيف حار رطب وبارد في الشتاء.

الجنوب - غرداية (تيزواتي الغرارة):

ذات مناخ جاف والحرارة عالية والفوارق الحرارية اليومية والفصلية مرتفعة.

وفي الجدول التالي إحدائيات كل منطقة:

الجدول (1.IV): إحداثيات مناطق جني البروبوليس

المناطق	دائرة عرض	خط طول
بومرداس	36°46'3.35"N	3°42'10.44"E
مستغانم	35°56'23.42"N	0°5'23.16"E
بجاية	36°44'60.00"N	5°4'0.00"E
غرداية	32°29'20.61"N	3°40'42.74"E

انطلاقاً من الإحداثيات مناطق الجني نستطيع توضيح ذلك في الخريطة التالية:



الشكل (5. IV): الخريطة الجغرافية لمناطق جني البروبوليس.

والجدول التالي يوضح ترميز وتاريخ جني عينات البروبوليس من مناطق مختلفة في الجزائر:

الجدول (2. V): تاريخ جني وترميز عينات البروبوليس

رمز العينة	منطقة الإنتاج	تاريخ الجني
R_B	الوسط – بومرداس (منحلة يسر)	افريل 2012
R_M	الغرب - مستغانم (سيدي خطاب)	جانفي 2012
R_{BJ}	بجاية	اكتوبر 2012
R_G	الجنوب – غرداية (تيزواتي الغرارة)	ديسمبر 2012

إن العينات المدروسة تحمل مواصفات فيزيائية موضحة في الجدول الموالي:

الجدول (3. IV): الصفات الفيزيائية لعينات البروبوليس المدروسة

رمز العينة	اللون	الخصائص الفيزيائية	طبيعة المناخ
R_B	بني فاتح	رائحته عطرية خفيفة, لين الملمس, لين, متماسك, رطب, سهل العجن	مناخ شبه رطب
R_M	بني داكن	رائحته عطرية متوسطة, لين الملمس, سهل العجن, متماسك, مشبع بالدهون, رطب	مناخ شبه جاف
R_{BJ}	بني داكن	رائحته عطرية متوسطة, خشن الملمس, سريع التفتت, صعب العجن, متوسط الرطوبة	مناخ رطب
R_G	بني	عطرية لاسعة, لين الملمس, سهل العجن, متماسك, مشبع بالدهون	مناخ جاف



الشكل (6.IV): عينات البروبوليس المدروسة.

III. 6. استخراج المركبات الفينولية من البروبوليس:

إن عملية استخراج المركبات الفينولية من البروبوليس هي أهم خطوة في دراسته كمصدر للمواد الفعالة، إذ أجريت الكثير من الدراسات حول أحسن الطرق المستخدمة لاستخلاص أكبر كمية من المواد الفعالة^[1]، وقد تنوعت هذه الطرق وفقا لطبيعة البروبوليس المدروس، حسب دراسات سابقة قد تمت عملية استخراج العينات بالطرق الأكثر استخداما والتي تستخلص أكبر مردود ممكن، حيث استنبطنا من خلال هذه التجارب أن عملية الاستخلاص التي تمت بجهاز حوض الأمواج فوق الصوتية أعطت مردود جيدا مقارنة بما درس سابقا وقد اعتمدنا الطريقة التالية:

وزنا كمية قدرها 1g من كل عينة من عينات البروبوليس المدروسة وقمنا بتقطيعها لقطع صغيرة ثم

بنقعها في الميثانول : حجمه $V_{MeOH} = 20ml$.



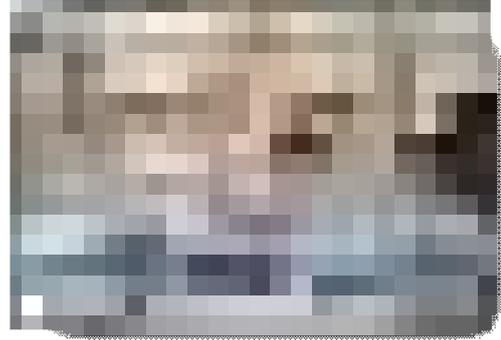
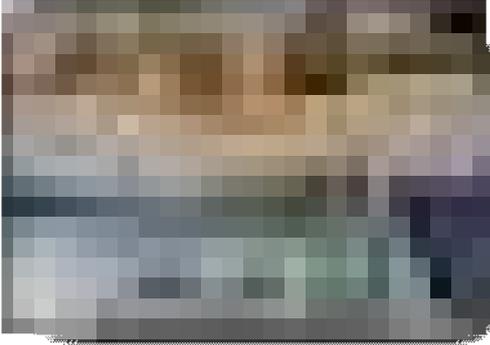
الشكل (7. IV): يوضح الاختلاف في الألوان أثناء النقع في الميثانول

وتوضع هذه الأخيرة في حوض الأمواج فوق الصوتية لمدة 30 min عند الدرجة 25°C وبعدها نتركها لمدة ساعة من أجل الاستقرار, موضحة في الشكل التالي:



الشكل (IV. 8): يوضح عملية الاستخلاص في حوض الأمواج فوق الصوتية

وبعدها قمنا بعملية الترشيح للحصول على مستخلص الميثانولي, و من ثم تبخير الميثانول عند درجة حرارة 40°C باستخدام حمام مائي فحصلنا على الناتج الجاف.



الشكل (IV. 9): يوضح عملية التبخير بواسطة حمام مائي.

ومن ثم قمنا بحساب مردود الاستخلاص. وبعدها نقوم بإذابة هذا الناتج في 20ml من الميثانول ثم يحفظ وهنا نكون قد حصلنا على عينات جاهزة للتقدير الكمي (المستخلص الميثانولي).



الشكل (IV. 10): يوضح المستخلصات الناتجة.

❖ ملاحظة: تم أثناء عملية الاستخلاص ترميز كل عينة بحرف لاتيني كما هو موضح في الصور

أعلاه.

III. 7. الدراسة الفيتوكيميائية والكهروكيميائية للعينات المستخلصة:

III. 7. 1. الدراسة الفيتوكيميائية:

III. 7. 1. 1. التقدير الكمي للمركبات الفينولية الطبيعية:

كح تقدير كمية الفينولات الكلية بطريقة Singleton-Ross :

يمكننا هذا التحليل من معرفة كمية الفينولات الكلية للعينة، ومقدار الفينولات تقاس بطريقة

(Single ton, Ross 1965) باستعمال الكاشف فولين (Réactif de Folin Ciocaltau) [21][3] ، هذا

الكاشف يتغير لونه من الأصفر إلى الأزرق بالأكسدة.

يتكون الكاشف من حمض فوسفوتنغستيك ($H_3PW_{12}O_4$ Acide phosphungstique)،

وحمض فوسفوموليبيديك ($H_3PMo_{12}O_4$ Acide phosphomolybdique)، يرجع هذا الأخير

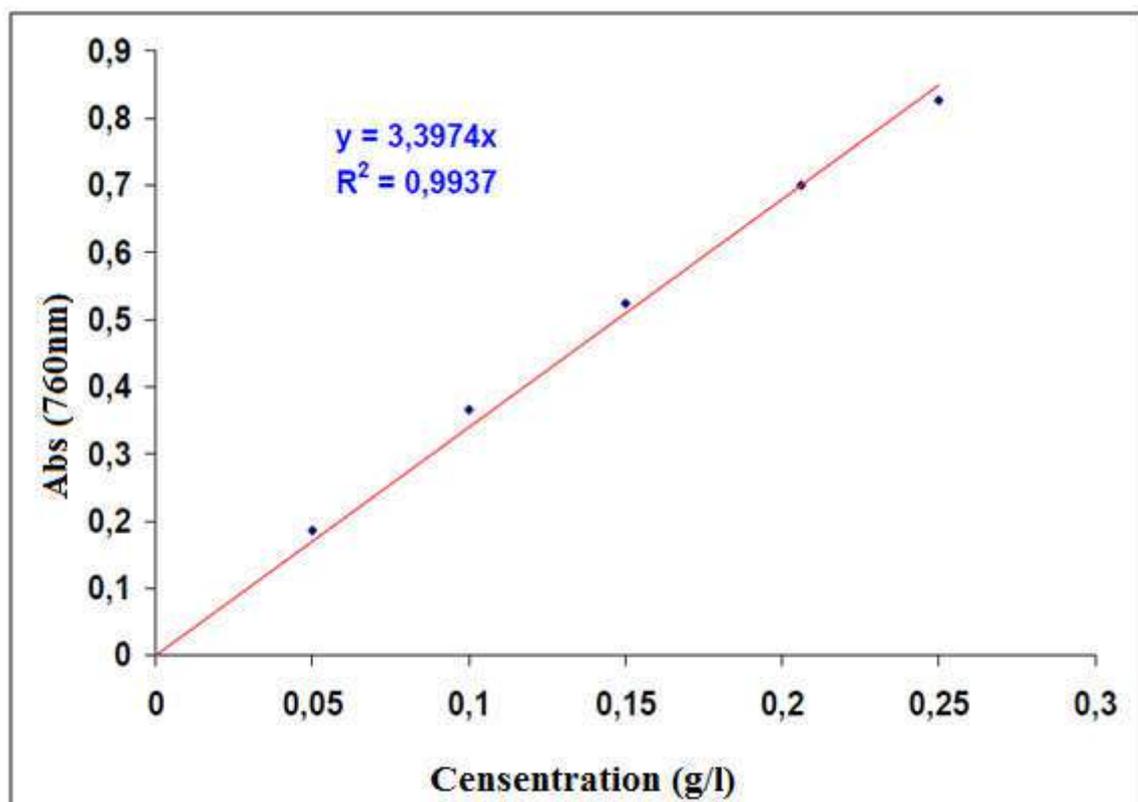
بواسطة المركبات الفينولية إلى أكاسيد: أكسيد التنغستين (W_8O_{23}) وأكسيد الموليبيدين (Mo_8O_3) ذات

اللون الأزرق. المركبات الفينولية تقدر كميًا بواسطة جهاز UV-Vis حيث يستعمل حمض الغاليك (Acide Gallique) كمركب فينولي مرجعي عند طول موجي $\lambda_{MAX}=760\text{nm}$ [5114].

تحضير المحلول القياسي:

تم تحضير تراكيز مختلفة من حمض الغاليك تكون محصورة بين (0.03 mg/ml و 0.3mg/ml) ونأخذ من كل محلول 0.1ml ونضعها في أنبوب اختبار نضيف لها 0.5ml من كاشف (folin) الممدد 10 مرات في الماء المقطر، ثم نضيف 2ml من كربونات الصوديوم (Na_2CO_3) تركيزه 20%، نرج الأنابيب جيدا ليتجانس المحلول و نضعها في الظلام لمدة 30 دقيقة تتم القراءة الامتصاصية بجهاز (UV-Visible) عند طول الموجة المذكور أعلاه.

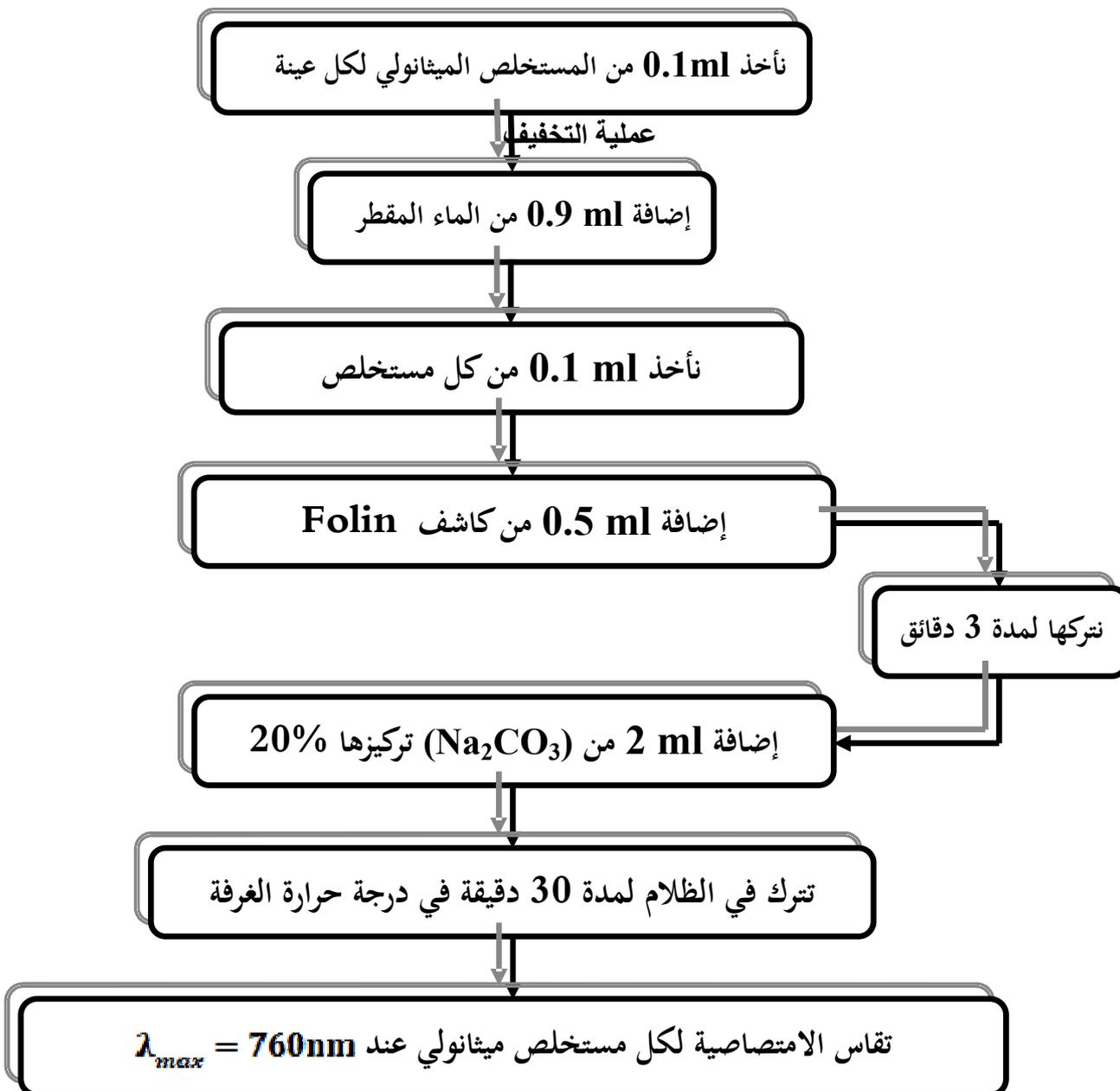
انطلاقًا من قيم الامتصاصية (A) لمحاليل حمض الغاليك، نرسم المنحنى القياسي الذي يبين تغير الامتصاصية (A) بدلالة التركيز بـ (g/l) الموضح في المنحنى رقم (1.IV):



المنحنى (1.IV): المنحنى القياسي لحمض الغاليك (GA) Acid Gallique.

تقدير كمية الفينولات الكلية في المستخلصات الميثانولية:

يتم تقدير المركبات الفينولية في المستخلصات الميثانولية، حيث عاملنا المستخلصات بنفس الطريقة التي عاملنا بها حمض الغاليك AG كما في المخطط التالي:



الشكل (11.IV): مخطط تقدير الفينولات الكلية في المستخلصات.

الامتصاصية الضوئية المتمثلة في الجدول أدناه:

الجدول (4. IV): قيم الامتصاصية الضوئية لكل من مستخلصات الميثانولية

العينة	r_b	r_m	r_{bj}	r_g
الامتصاصية A_1 (nm)	0.914	0.438	0.318	0.347
الامتصاصية A_2 (nm)	0.918	0.441	0.321	0.352

نستخدم المنحنى القياسي لحمض الغاليك (AG) لحساب تراكيز الفينولات في مختلف المستخلصات وذلك بإسقاط هذه النتائج على المنحنى القياسي.

نحدد تركيز العينات بالنسبة لحمض الغاليك حيث تقدر بوحدة (mg/g) وتحسب وفقا لقانون بيير لامبيرت:

$$A = K * C \quad / K = \epsilon * l$$

حيث: K: ميل المنحنى القياسي لحمض الغاليك K=3.3974.

A: الامتصاصية (nm).

C: التركيز (g/l).

بإدخال كل من معامل التمديد (N_d), حجم MeOH المذابة فيه الخلاصة الفينولية (V "ml") الكتلة المتحصل عليها بعد عملية الاستخلاص (m "g") يصبح القانون كما يلي:

$$C = \frac{A * N_d * V}{K * m}$$

تقدير كمية الفلافونويدات الكلية:

المبدأ:

تعتمد في تقدير الفلافونويدات على الخصائص المخيلية للجزيئات الفينولية ضد كلورور الألومنيوم ($AlCl_3$) كما أننا نستخدم في تقدير الفلافونويدات (Woisky and Salatino 1998) على قدرة تكوين المعقد الأصفر بين ثلاثي كلور الألومنيوم ($AlCl_3$) مع مجموعة الهيدروكسيل (OH) الموجودة على الحلقات البنزينية للفلافونويدات كما في المعادلة التالية:

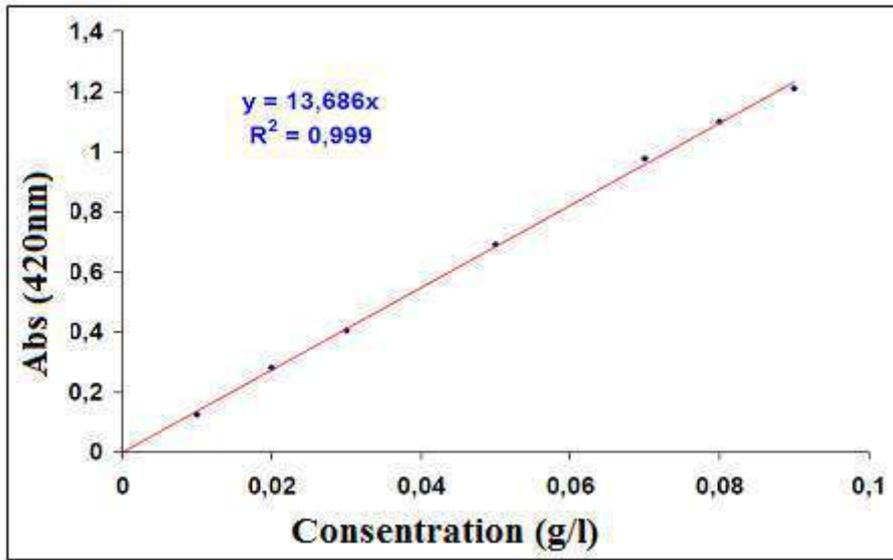
الشكل (IV. 12): آلية تفاعل تشكل المعقد بين ثلاثي كلور الألومنيوم ($AlCl_3$) والفلافونويد.

حيث يشكل معقدا ثابتا بين مجموعة الكربونيل وهيدروكسي الموقع 5 و3، كما يشكل معقدات غير ثابتة مع مجموعتي أورثو هيدروكسي، ذو معامل امتصاص عال ويمتص عند طول موجة $\lambda_{MAX} = 420$ nm [7][6]، نستعمل في هذه التجربة فلافونويد الروتين (Rutine) كأساس مرجعي (قياسي) لرسم المنحنى القياسي.

تحضير المحلول القياسي:

حضرنا تراكيز مختلفة من محلول الروتين (Rutine) الممدد في الميثانول محصورة ما بين 0.02g/l و 0.1g/l، من كل تركيز أخذنا 1ml وعاملناه بـ 1ml من ثلاثي كلور الألومنيوم (2% $AlCl_3$) في الميثانول، يترك المزيج نصف ساعة في الظلام حتى إتمام التفاعل، ثم قرأنا شدة الامتصاص الضوئي لكل محلول عند طول الموجة المذكور سابقا.

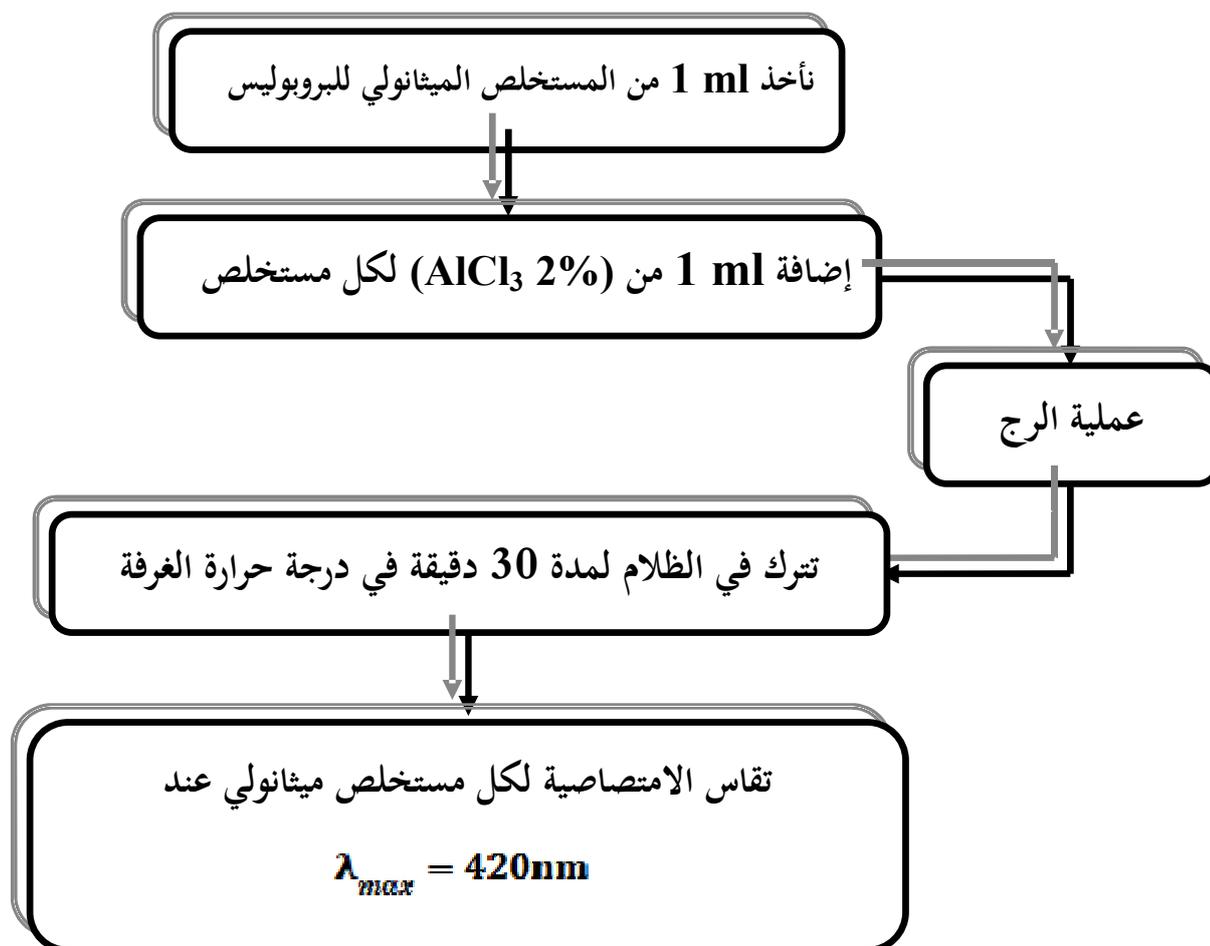
انطلاقا من قيم الامتصاصية (A) لمحاليل الروتين، ثم رسمنا المنحنى البياني لتغير الامتصاصية الضوئية (A) بدلالة التركيز (g/l) الموضح في المنحنى رقم (IV. 2).



المنحنى (IV. 2): المنحنى القياسي لمحاليل الروتين Rutine .

تقدير كمية الفلافونويدات في المستخلصات:

لتقدير كمية الفلافونويدات نعامل المستخلصات الممددة للبروبوليس بنفس الطريقة التي عملنا بها الروتين Ru كما هو موضح في المخطط التالي:



الشكل (IV. 13): مخطط تقدير الفلافونويدات الكلية في المستخلصات.

✓

الامتصاصية المتحصل عليها في الجدول التالي:

الجدول (5.IV): قيم الامتصاصية الضوئية لكل من مستخلصات العينة

العينة	r_b	r_m	r_{bj}	r_g
الامتصاصية $A_1(nm)$	0.789	0.383	0.203	0.323
الامتصاصية $A_2(nm)$	0.793	0.392	0.212	0.333

نستخدم المنحنى القياسي للروتين لحساب تراكيز الفلافونويدات في مختلف المستخلصات وذلك بإسقاط هذه النتائج على المنحنى القياسي. وذلك من أجل حساب كمية الفلافونويدات في كل مستخلص.

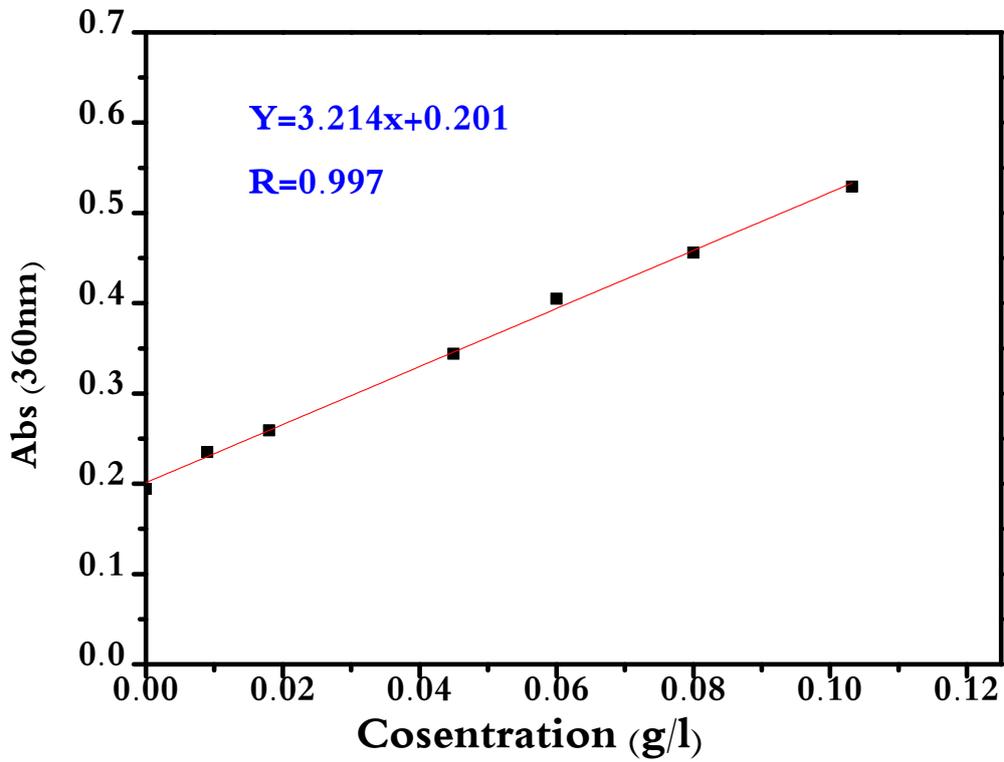
تقدير كمية الفلافونول الكلية:

تحضير المحلول القياسي:

تم تحضير تراكيز مختلفة من الكرسيتين (مركب قياسي) تكون محصورة بين (0 و 0.1 g/ml) ونأخذ من كل محلول ذو تركيز معين 0.125 ml ونضعها في أنبوب اختبار نضيف لها 0.125 ml من (0.1% HCl) في الميثانول، ثم نضيف 2.250 ml من (0.2% HCl) في الماء^[8]، نرج الأنابيب جيدا ليتجانس المحلول ونضعها في الظلام لمدة 30 دقيقة.

تتم القراءة الامتصاصية بجهاز (UV-Visible) عند طول الموجة $\lambda_{MAX} = 360nm$ ^[9].

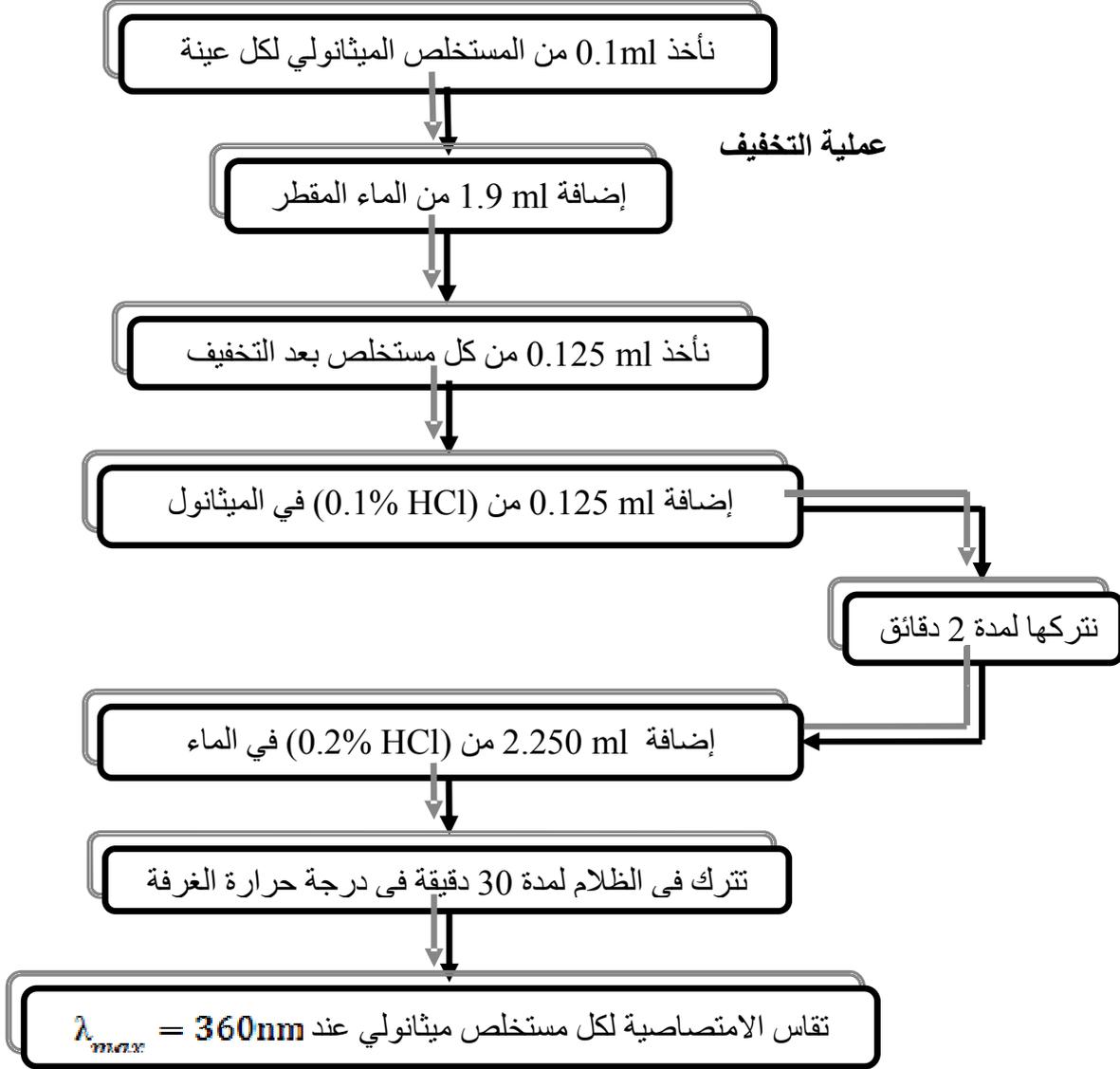
انطلاقاً من قيم الامتصاصية (A) لمحاليل الكرسيتين، نرسم المنحنى القياسي الذي يبين تغير الامتصاصية (A) بدلالة التركيز بـ (g/l) الموضح في المنحنى رقم (3.IV).



المنحنى (3.IV): المنحنى القياسي للكربستين Qursitin.

تقدير كمية الفلافونول في المستخلصات الميثانولية: 

لتقدير كمية الفلافونول نعامل المستخلصات الممددة للبروبوليس بنفس الطريقة التي عملنا بها الكرسيتين Qu كما هو موضح في المخطط التالي:



الشكل (14. IV): مخطط تقدير الفلافونول في المستخلصات

نسجل قيم الامتصاصية المتحصل عليها في الجدول التالي:

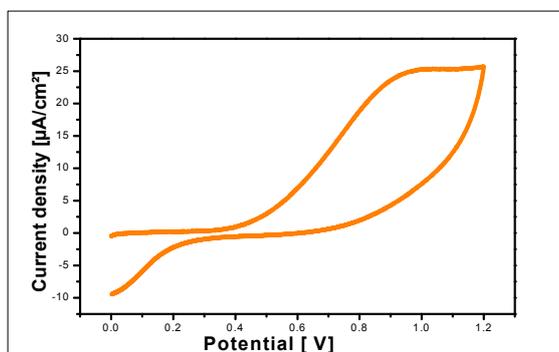
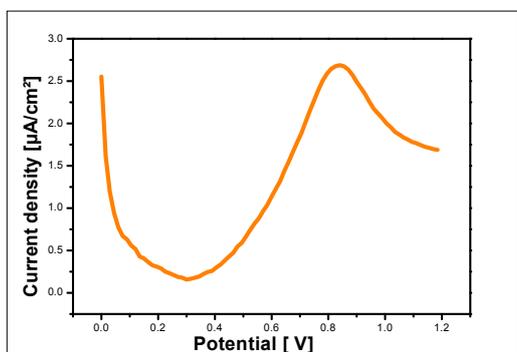
الجدول (6.IV): قيم الامتصاصية الضوئية لكل من مستخلصات العينة

العينة	r_b	r_m	r_{bj}	r_g
الامتصاصية A_1 (nm)	0.222	0.214	0.209	0.214
الامتصاصية A_2 (nm)	0.225	0.217	0.211	0.218

نستخدم المنحنى القياسي للكروسيطين لحساب تراكيز الفلافونول في مختلف المستخلصات وذلك بإسقاط هذه النتائج على المنحنى القياسي. وذلك من اجل حساب كمية الفلافونول في كل مستخلص.

III . 7 . 2. الدراسة الكهر وكيميائية للمستخلصات المدروسة :

كهر . بروبوليس منطقة بومرداس B:

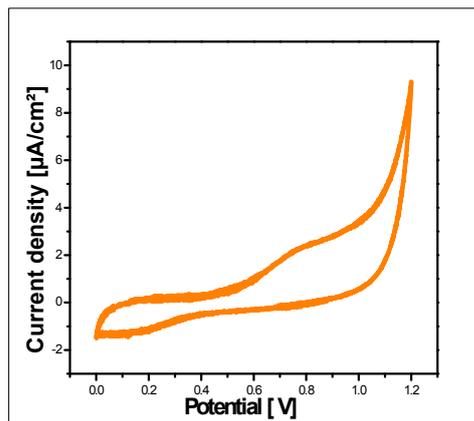
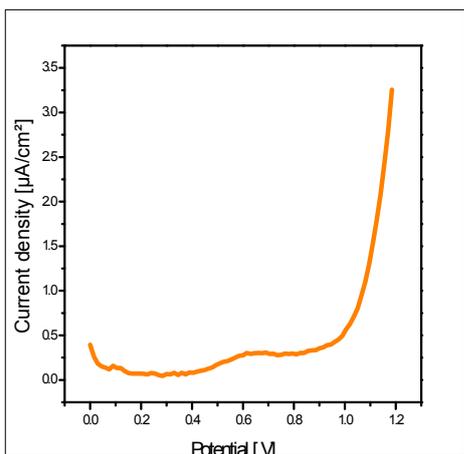


المنحنى (b51.III): منحنى الموجة المربعة لعكبر منطقة بومرداس B تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول موفي $pH = 2$, 12.5ml من EtOH و الكهروليت المساعد M

المنحنى (a51.III): الفولتاموغرام الحلقي لعكبر منطقة بومرداس B تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول موفي $pH = 2$, 12.5ml من

EtOH و الكهروليت المساعد 0.1M من KCl . 0.1 من KCl .

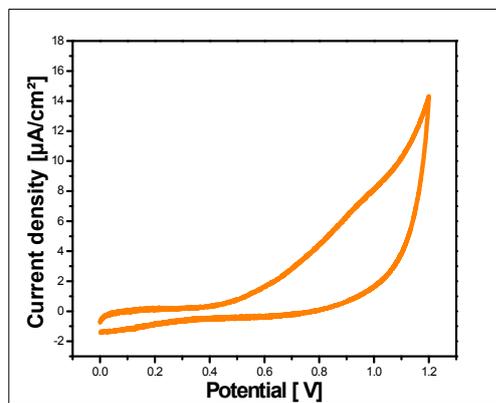
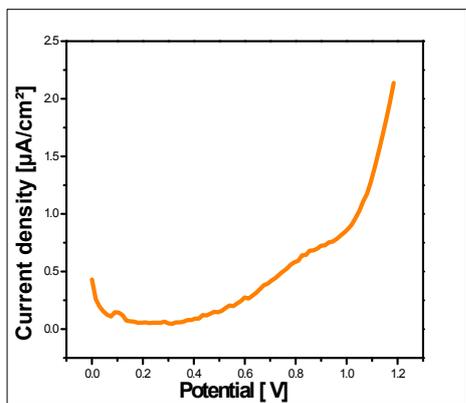
كهربوليس منطقة غرداية G:



المنحنى (b52.III): منحنى الموجة المربعة لعكبر
منطقة غرداية G تحتوي خلية التحليل على:
12.5ml من محلول موقى pH = 2 , 12.5ml
من EtOH و الكهروليت المساعد 0.1M من
.KCl

المنحنى (a52.III): الفولتاموغرام الحلقي لعكبر
منطقة غرداية G تحتوي خلية التحليل على:
12.5ml من محلول موقى pH = 2 , 12.5ml
من EtOH و الكهروليت المساعد 0.1M من
.KCl

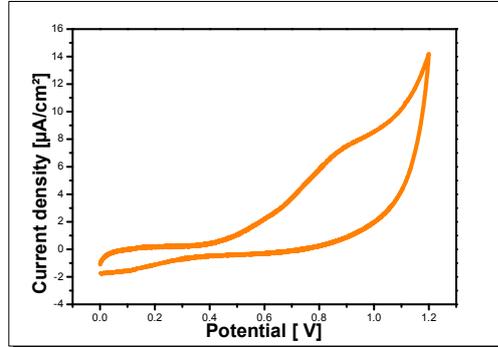
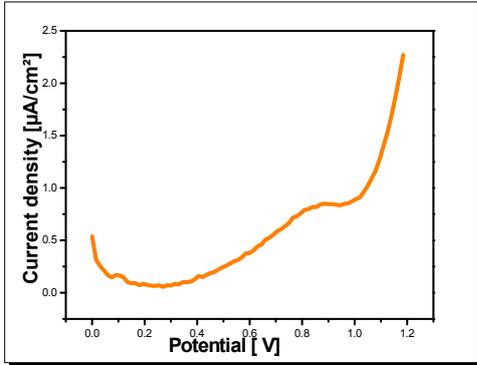
كهربوليس منطقة بجاية Bz:



المنحنى (b53.III): منحنى الموجة المربعة لعكبر منطقة بجاية Bz تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول موقى $\text{pH} = 2$, 12.5ml من EtOH و الكهروليت المساعد 0.1M من .KCl

المنحنى (a53.III): الفولتاموغرام الحلقي لعكبر منطقة بجاية Bz تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول موقى $\text{pH} = 2$, 12.5ml من EtOH و الكهروليت المساعد 0.1M من .KCl

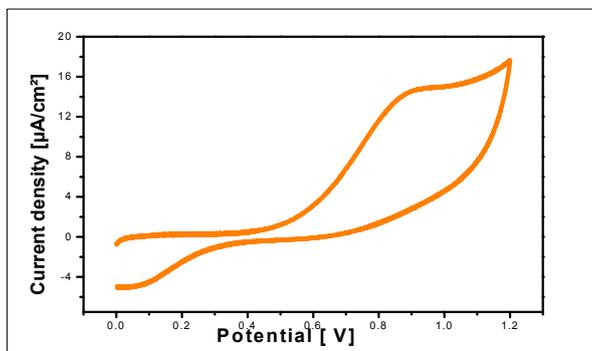
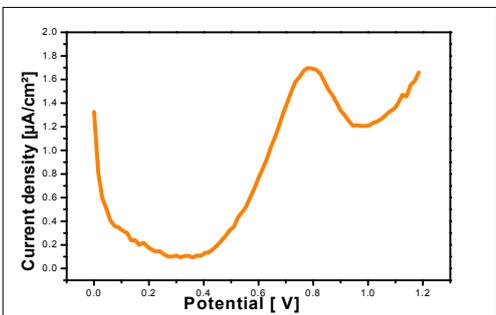
كهربوليس منطقة مستغانم M:



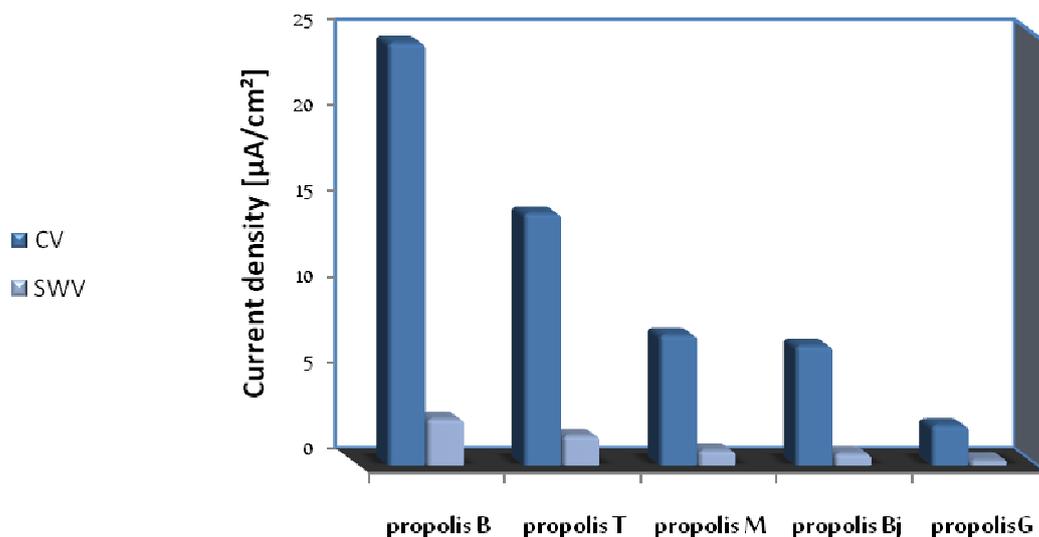
المنحنى (b54.iii): منحنى الموجة المربعة لعكبر منطقة مستغانم M تحتوي الخلية على 12.5ml من محلول موقى $\text{pH} = 2$, 12.5ml من EtOH و الكهروليت المساعد 0.1M من KCl.

المنحنى (a54.iii): الفولتاموغرام الحلقي لعكبر منطقة مستغانم M تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول موقى $\text{pH} = 2$, 12.5ml من EtOH و الكهروليت المساعد 0.1M من KCl.

كهربوليس منطقة تيزي وزو:

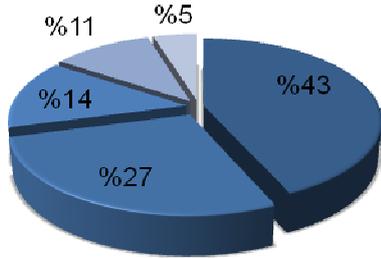


<p>المنحنى (b55.III): منحنى الموجة المربعة لعكبر منطقة تيزي وزو تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول موقى $\text{pH} = 2$, 12.5ml من EtOH و الكهروليت المساعد 0.1M من KCl .</p>	<p>المنحنى (a55.III): الفولتاموغرام الحلقي لعكبر منطقة تيزي وزو تحتوي خلية التحليل على: 12.5ml من محلول موقى $\text{pH} = 2$, 12.5ml من EtOH و الكهروليت المساعد 0.1M من KCl .</p>
--	--



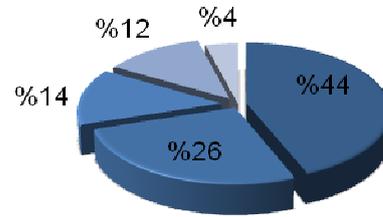
المنحنى (56.III): مقارنة قيم كثافة التيار لعينات العكبر

propolis B propolis T propolis M
propolis Bj propolisG



WV

propolis B propolis T propolis M
propolis Bj propolisG



CV

المنحنى (b57.III): مقارنة قيم كثافة التيار
لعينات العكبر

المنحنى (a57.III): مقارنة قيم كثافة التيار لعينات
العكبر الخاصة بالمنحى

الفصل الرابع

نتائج و مناقشة

1.V مقارنة التقدير الكمي لمستخلصات البروبوليس:

تم استخلاص العينات بالمذيب العضوي الميثانول اعتمادا على الطريقة الاستخلاص بحوض الأمواج فوق الصوتية وتم حساب مردود الاستخلاص انطلاقا من 1g من الوزن الجاف لعينات البروبوليس، توضح طريقة الاستخلاص في الشكل التالي:



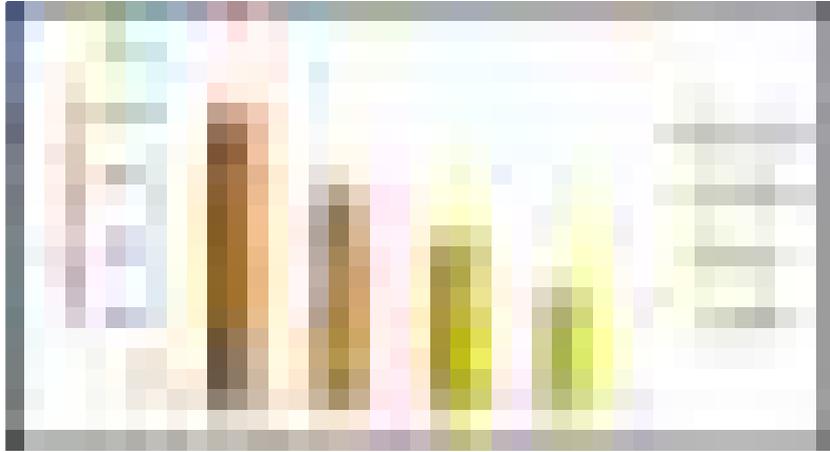
الشكل (1.V): يوضح طريقة الاستخلاص صلب-سائل لعينات البروبوليس في الميثانول.

نتائج مردود الاستخلاص لعينات البروبوليس:

النتائج المحصل عليها مدونة في الجدول (1.V) وتمثيلها بالمنحنى (1.V):

الجدول (1.V): نتائج مردود المادة المستخلصة.

العينات	الكتلة الابتدائية (g)	الكتلة التجريبية (g)	المردود %	حجم المذيب	التركيز الكتلي g/ml
R_B	1	0,411	41,1	20ml	0,02055
R_M	1	0,3001	30,01	20ml	0,01500
R_{BF}	1	0,2318	23,18	20ml	0,01159
R_G	1	0,1557	15,57	20ml	0,00778



المنحنى (1.V): يوضح مقارنة مردود الاستخلاص حسب المناطق.

مناقشة النتائج:

يتضح من خلال الدراسات السابقة أن مردود الاستخلاص يتغير من عينة لأخرى, ومن طريقة لأخرى, كما ذكرنا سابقا (الفصل السابق) إذ أجريت الكثير من الدراسات حول أحسن الطرق المستخدمة

لاستخلاص اكبر كمية ممكنة من المواد الفعالة. وقد تنوعت هذه الطرق وفقا لطبيعة البروبوليس المدروس, حسب هذه الدراسات قد تمت عملية استخلاص العينات بالطرق الأكثر استخداما والتي تستخلص اكبر مردود ممكن, حيث اختيرت عملية الاستخلاص صلب-سائل في حوض الأمواج فوق الصوتية كطريقة مثلى لإعطاء نتائج جيدة عند حساب المردود, اثبتت تلك الدراسات استخدام عملية الاستخلاص لمذيبات مختلفة متدرجة في التركيز بأن الميثانول كان أفضل مذيب قطبي.

من خلال النتائج المدونة في الجدول (1.V) والموضحة بالمنحنى (1.V), نلاحظ القيمة العظمى للمردود تحصلنا عليها عند عينة بروبوليس بومرداس حيث بلغت نسبته %41.1, يليه عينة بروبوليس مستغانم بـ %30.01 عينة بروبوليس بجاية بـ %23.18 أما عينة بروبوليس غرداية كان المردود ضعيف نسبياً بـ %15.57.

وترجع نسبة التفاوت في قيمة المردود إلى: طبيعة مكونات البروبوليس الخاصة بكل منطقة, طبيعة المناخ, اختلاف مصادره, مناطق جنيه وكذلك فصل الجني.

2.V. نتائج الدراسة الفيتوكيميائية والكهروكيميائية:

1.2.V. نتائج الدراسة الفيتوكيميائية:

1.1.2.V. مقارنة كمية المركبات الفينولات الطبيعية لمختلف

المستخلصات:

1. تقدير كمية الفينولات الكلية بطريقة Singleton-Ross :

تم تطبيق طريقة (Singleton, Ross 1965) لتقدير الفينولات الكلية في المستخلصات, والتي تتميز بسهولتها وفعاليتها, وباستعمال حمض الغاليك كفينول مرجعي, حيث أظهر هذا التحليل أن الكثافة الضوئية تتناسب طرذا مع تركيز GA (0.03g/l و 0.3g/l) ورسم منحنى (1.IV) بشكل خطي ($R^2=0.993$) وهو يعبر عن المحتوى الفينولي في كل مستخلص بعدد (mg) لكل 1g من الوزن الجاف للعينة.

كما دوننا النتائج المتحصل عليها في الجدول (2. V) التالي:

الجدول (2. V): يوضح التقدير الكمي للفينولات الكلية في المستخلصات الميثانولية.

الترتيب	نسبة الخطأ Sd	كمية الفينولات الكلية (mg/g)	العينة
1	±0.81005	262.338*	R _B
3	±0.41612	86.213	R _M
4	±0.53874	81.141	R _{BJ}
2	±1.33675	185.074	R _G

2. تقدير كمية الفلافونويدات الكلية بطريقة (AlCl₃):

اعتمدنا في تقدير الفلافونويدات على قدرة تكوين المعقد الأصفر بين ثلاثي كلور الألمنيوم (AlCl₃) مع مجموعة الهيدروكسيل (OH) الموجودة على الحلقات البنزينية للفلافونويدات. وباستعمال الروتين كفينول مرجعي، حيث أظهر هذا التقدير أن هناك تناسب طردي بين زيادة الكثافة الضوئية وتركيز الروتين (0.03g/l و 0.3g/l) حيث تم رسم المنحنى (2.IV) بشكل خطي ($R^2=0.999$) وهو يعبر عن كمية الفلافونويدات في كل مستخلص بعدد (mg) لكل 1g من الوزن الجاف للعينة.

كما دونا نتائج التقدير الكمي للفلافونويدات المتحصل عليها في الجدول (3.V) التالي:

الجدول (3.V): يوضح التقدير الكمي للفلافونويدات في المستخلصات.

الترتيب	نسبة الخطاء Sd	كمية الفلافونويدات الكلية (mg/g)	العينة
1	±0.754	210.884*	R _B
3	±0.232	28.304	R _M
4	±0.301	19.626	R _{BJ}
2	±0.995	74.827	R _G

3. تقدير كمية الفلافانول الكلية:

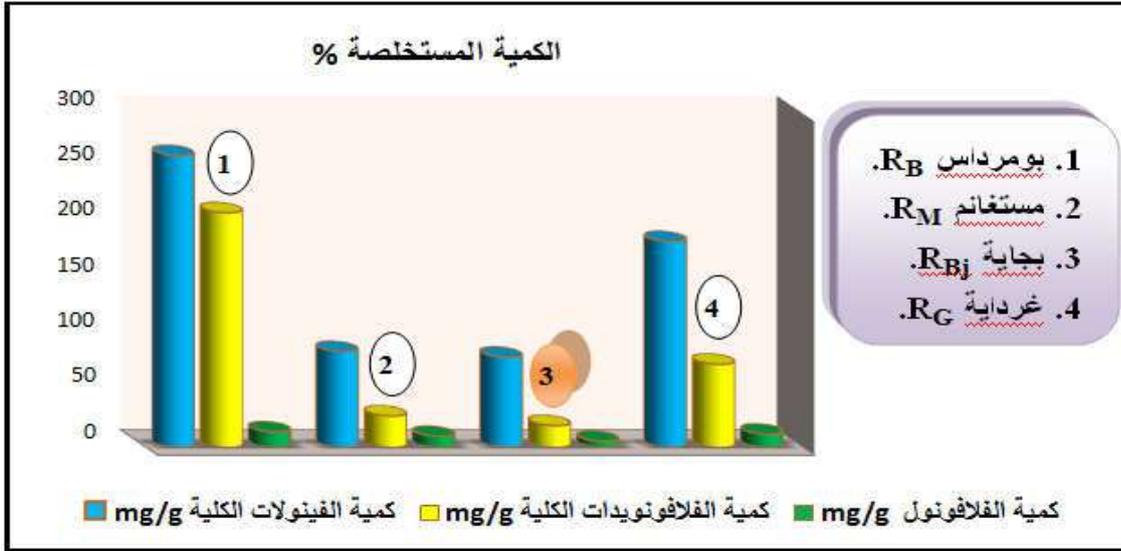
تم تقدير الفلافانول الكلية في المستخلصات الميثانولية، وباستعمال الكريستين كفينول مرجعي، حيث أظهر هذا التحليل أن الكثافة الضوئية تتناسب طرذاً مع تركيز Qu (0 g/ml و 0.1 g/ml) ورسم منحنى (3.IV) بشكل خطي ($R^2=0.997$) وهو يعبر عن كمية فلافانول في كل مستخلص بعدد (mg) لكل 1g من الوزن الجاف للعينة.

كما دونا نتائج التقدير الكمي للفلافانول المتحصل عليها في الجدول التالي:

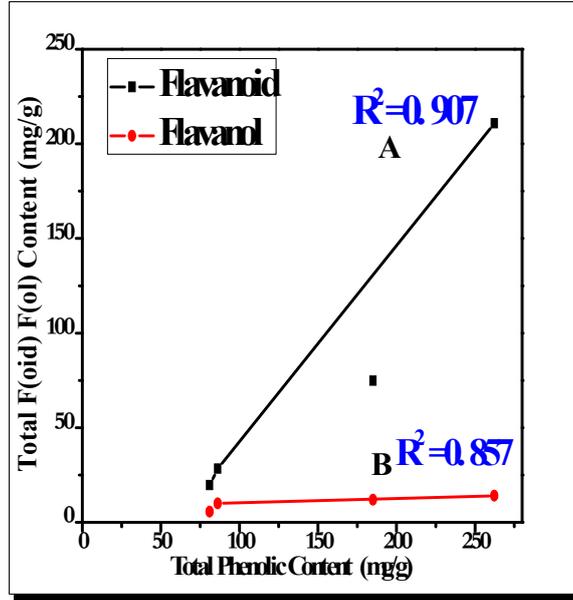
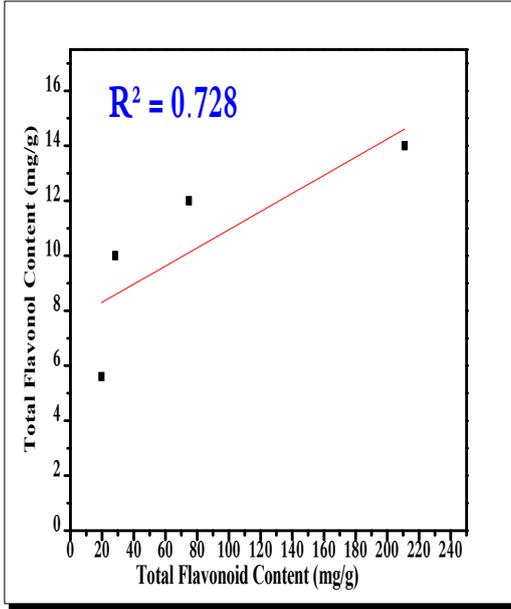
الجدول (4.V): يوضح التقدير الكمي للفلافانول في المستخلصات.

الترتيب	نسبة الخطاء Sd	كمية الفلافونول (mg/g)	العينة
1	±1.320	14*	R _B
3	±0.880	9.02	R _M
4	±0.840	5.6	R _{BJ}
2	±2.260	11.98	R _G

من خلال نتائج التقدير الكمي للفينولات والفلافونويدات والفلافونول في المستخلصات الميثانولية
نرسم المنحنى (5.V) الذي يمثل المقارنة بين كمية الفينولات والفلافونويدات والفلافونول في
المستخلصات الميثانولية:



المنحنى (2.V): يوضح المقارنة بين كمية الفينولات والفلافونويدات في المستخلصات
الميثانولية.



المنحنى (3.V): يوضح علاقة الارتباط بين كمية الفينولات والفلافونويدات (A) و بين كمية الفينولات والفلافونول (B) في المستخلصات.

المنحنى (4.V): يوضح علاقة الارتباط بين كمية الفلافونويدات والفلافونول في المستخلصات.

مناقشة النتائج المتحصل عليها:

انطلاقاً من النتائج السابقة المدونة في الجداول (2.V) (3.V) (4.V) و الموضحة بالمنحنى (5.V) نستنتج النقاط التالية:

أن المستخلصات الميثانولية تحتوي على كميات معتبرة من الفينولات الكلية غير أن المحتوى الفينولي للمستخلصات تختلف من مستخلص لأخر، حيث كانت أكبر كمية ممكنة للفينولات الكلية تم تقديرها سجلتها بومرداس حيث وصلت قيمته إلى $(262,338 \pm 0.810 \text{ mg/g})$ يليها بروبوليس غرداية بـ $(185.074 \pm 1.336 \text{ mg/g})$ أما بقية المستخلصات وهما مستغانم و بجاية فكانت كميتهما متقاربة نسبياً إلى حد ما حيث بلغت كمية بروبوليس مستغانم $(86.213 \pm 0.41 \text{ mg/g})$ أما أقل نتيجة فسجلها بروبوليس بجاية حيث قدرت كمية الفينولات الكلية بـ $(81.141 \pm 0.538 \text{ mg/g})$.

إن كمية الفلافونويدات المكافئة للروتين تختلف من مستخلص إلى آخر، حيث تراوحت كمية الفلافونويدات في المستخلصات الميثانولية ما بين (19.626mg/g و 210.884mg/g) وأخذت هذه الأخيرة نفس الترتيب للمناطق حسب الكميات المعتبرة للفينولات الكلية وذلك بملاحظة أن أكبر قيمة للفلافونويدات سجلها بروبوليس بومرداس وبلغت قيمته بـ (210.884±0.754 mg/g) يليه بروبوليس غرداية (85.827±0.995 mg/g) أما بالنسبة لبروبوليس مستغانم وبجاية فقد وصلت كميتهما إلى (14.718±0.981 mg/g) و (23.972±0.334 mg/g) على التوالي.

كذلك عند التقدير الكمي للفلافانول وجد أن كمية الفلافانول المكافئة للكرسيتين تكون متفاوتة من مستخلص لآخر، فكانت كمية الفلافانول محصورة بين (5.60mg/g و 14mg/g)، بالمقارنة مع نتائج كمية الفينولات الكلية وكمية الفلافونويدات يظهر جليا تناسبا كبيرا من ناحية ترتيب المناطق حيث بلغت أكبر قيمة سجلها بروبوليس بومرداس وقدرت بـ (14±1.320 mg/g) وبلغت أقل قيمة لدى بروبوليس بجاية حيث بلغت قيمته بـ (5.60±0.840 mg/g).

يرجع هذا التفاوت في الكميات المعتبرة إلى طبيعة مكونات البروبوليس لكل منطقة من المناطق المختارة وكذلك لطبيعة المناخ بالإضافة إلى اختلاف مصادره ومناطق جنيته وكذلك فصل الجني.

هذه النتائج توحي بأن هناك علاقة ارتباط بين كمية الفينولات والفلافونويدات والفلافونول لذلك قمنا بالتأكد من ذلك برسم المنحنيات الموضحة في (3.V) و(4.V) الذي كانت فيه علاقة الارتباط على التوالي $R^2 = 0.907$, $R^2 = 0.857$ و $R^2 = 0.728$ وهذا يثبت أن هناك:

علاقة ارتباط كبيرة بين كمية الفينولات وكمية الفلافونويدات والفلافانول فكلما كانت كمية الفينولات كبيرة كانت كمية الفلافونويدات والفلافانول كبيرة والعكس صحيح.

علاقة ارتباط بين كمية الفلافونويدات والفلافونول فكلما كانت كمية الفلافونويدات كبيرة كانت كمية الفلافونول كبيرة والعكس صحيح.

-





الفصل الخامس

الجنور الحرة و المضادات الأوكسدة

V. الجنور الحرة و مضادات الأكسدة

من الأمثلة البسيطة على عملية الأكسدة ما يحدث عند قطع تفاحة وتتركها معرضة للهواء فإنها تتحول إلى اللون البني، كما أن صدأ الحديد وتشقق المطاط وتلف الأغذية أمثلة شائعة لهذه العملية الطبيعية، والتي تؤدي إلى تحطيم جزيئات المادة.

والأكسدة في جسم الإنسان، كل خلية من خلايا الجسم تحتاج إلى أكسجين ويتفاعل هذا الأكسجين مع جزيئات الطعام المهضوم بحيث ينتج ثاني أكسيد الكربون والماء والطاقة، تتكون الجنور الحرة داخل الأنسجة الحية كنواتج كيميائية ثانوية لعمليات التمثيل الغذائي أو (الأيض أو الإستقلاب) التي تحدث بصورة مستمرة في الجسم. وتعمل الجنور الحرة على مهاجمة وتدمير مكونات الخلايا لتحدث بها أضراراً بالغة في مادتها الوراثية ووظائفها الخلوية المختلفة.

ظلت آلية تأكسد الدسم غير معروفة حتى شرحت من قبل العالم Emile Duclaux (1840–1904) [1]، الذي اعتبر أن الأكسجين الجوي هو العامل الرئيسي المسبب لتأكسد الأحماض الدسمة الحرة. الدهون والزيوت و الأطعمة التي تحتوي على الليبيدات يحدث لها عملية تخریب جراء تعرضها إلى درجة الحرارة أو إلى تخزين طويل المدى. هذا التخریب ناتج عن تفاعلات الأكسدة و تفكك لنواتج الأكسدة مما يؤدي إلى انخفاض في القيمة الغذائية و جودتها الحسية. و تأخير في عمليات الأكسدة مهم جدا في تصنيع المنتجات الغذائية، وهي في الواقع مهمة جدا بالنسبة لجميع الأشخاص المشاركين في السلسلة الغذائية بأكملها من المصنع إلى المستهلك.

توجد طريقة للحماية من الأكسدة هو استخدام كمية محددة من مواد مضافة، التي تمنع الأكسدة. و تسمى هذه بشكل صحيح مثبطات أكسدة، ولكن في الوقت الحاضر تسمى المواد المضادة للأكسدة. هذه المثبطات تمثل فئة من المواد التي تختلف على نطاق واسع في التركيب الكيميائي، ولها آليات تفاعلات مختلفة [2].

1.V. الجذور الحرة

الجذور الحرة عبارة عن ذرة أو مجموعة من الذرات تحتوي على إلكترون غير مزدوج على الأقل. وعندما يتحول الإلكترون من مزدوج إلى غير مزدوج فإن خطره يزيد ويصبح غير مستقر، لفترة وجيزة، وشديدي التفاعل وخلال تفاعلها مع ذرات أخرى تحتوي على إلكترونات ناقصة، يتم إنتاج جذور حرة أخرى جديدة، وهكذا تبدأ سلسلة من التفاعلات. الجذور الحرة هي جزيئات شديدة العنف ناتجة عن أكسدة الأكسجين. ولكنها ليست جميعها ضارة، بل هي ضرورية من أجل الحياة [3].

توجد الجذور الحرة داخل جسم الإنسان أو الحيوانات الثديية في شكل صور أكسجينية فعالة (ROS) (reactive oxygen species) نشطة، نتروجينية (RNS)، أوكلورين (RCS) ومن أهمها: أنيون السوبر أكسيد ($O_2^{\cdot-}$)، وجذور الهيدروكسيل (OH^{\cdot})، بيرهيدروكسيل ($OH_2^{\cdot-}$)، جذر بيروكسنتريت ($ONNO^{\cdot-}$)، نترك أكسيد (NO^{\cdot})، (RO^{\cdot})، بيروكسيل (ROO^{\cdot})، ($^{\cdot}OCl$)، بيروكسيل الليبيد (LOO^{\cdot})، كما يمكن الجذور الحرة للأكسجين و النيتروجين أن تتحول إلى متفاعلات خطيرة جدا على صحة الإنسان، مثل فوق أكسيد الهيدروجين (H_2O_2)، أحادي الأكسجين (1O_2)، الأوزون (O_3)، بيروكسنتريت ($ONNO^{\cdot-}$)، و حمض النتروز (HNO_2)، ثنائي النتروجين ثلاثي الأكسجين (HNO_2)، حمض الهيپوكلوريد ($HOCl$)، بيروكسيد الليبيد ($LOOH$) [4-7].

RSO- هي من الأنواع الكيميائية شديدة التفاعل، التي يمكن أن تتفاعل مع أي جزيئات مثل الحمض النووي، والدهون والبروتينات و الكربوهيدرات و تسبب في حدوث اختلال في وظائفهم. وأيضاً تؤثر في الأسباب الوراثية الأخرى. والخطر الرئيسي الناتج عن الجذور الحرة يكمن في التلف الناتج عن تفاعلها مع أهم مكونات الخلية وهو الحمض النووي منقوص الأكسجين (DNA)، أو مع جدار الخلية ما يؤدي إلى تدميرها وعدم قدرتها على القيام بوظائفها بالشكل المطلوب [8-11].

اختلال التوازن بين مواد الأكسدة والمواد المضادة للأكسدة في الجسم ما يسمى بالتوتر التأكسدي مرتبط بالعديد من المشاكل الصحية وله دوراً كبيراً في الإصابة بأكثر من 100 مرضاً من بينها: السرطان، وأمراض القلب التاجية، قرحة المعدة، والشيخوخة المبكرة، وبعض أمراض العيون، والأمراض

النفسية والعصبية، وتليف الكبد، وأمراض الدم، ومرض ويلسون (Wilson's disease). الذي يسببه إفراز النحاس بتركيزات غير طبيعية وعدم قدرة الجسم على التمثيل الغذائي له فيتراكم في الكبد والمخ وقرنية العين. مرض القلب، ومرض التوحد، السرطان والسكتة الدماغية، ومرض السكري، والخرف الزهايمر، مرض باركنسون، التهاب المفاصل والضمور العضلي [12-23].

تنشأ الجنور الحرة في جسم الإنسان من مصادر داخلية Endogenous وخارجية Exogenous وتزيد في حالات المرض والإرهاق النفسي والجسدي ويتقدم العمر شيئاً فشيئاً. ويعتبر النشاط الأيضي داخل الخلايا مصدراً داخلياً للجنور الحرة، كما أن العديد من المركبات في الجسم مثل الأدرينالين والدوبامين وبعض مكونات الميتوكوندريا يمكن أن تتفاعل مع الأوكسجين لإنتاج جنور فوق الأوكسجين والذي يتم إنتاجه كذلك داخل الجسم من خلايا الدم البيضاء كآلية دفاعية ضد البكتيريا، كما تنشأ الجنور الحرة في جسم الكائن الحي من عدة مصادر خارجية أهمها: الأشعة فوق البنفسجية، السجائر وكل أنواع التدخين، مبيدات الحشائش والآفات Herbicides and Pesticides والمواد البتروكيميائية والمذيبات كالبنزين وبعض العقاقير Drugs والأشعة الكونية وأشعة إكس X-rays وفرن الأمواج القصيرة Microwaves oven والقوى الكهرومغناطيسية المنبعثة من خطوط الضغط العالي والمولدات الكهربائية والهواتف الجواله وشاشات التلفزيون والحاسب الآلي وبعض المركبات الموجودة ضمن الأطعمة المأكولة والغازات المنبعثة من العوادم الأطعمة المقلية، والكحوليات، كذلك الرياضات العنيفة مثل حمية إنقاص الوزن الزائد. كما أن بعض العناصر مثل الحديد والنحاس تدخل في تفاعلات كيميائية حيوية داخل الجسم تعرف بتفاعلات فينتون Fenoton's reactions وتؤدي إلى تكوين الجنور الحرة وتصل أيونات الحديد والنحاس إلى داخل الجسم نتيجة تلوث مصادر مياه الشرب بمخلفات الصرف الصناعي والزراعي، أو عن طريق النبات حيث تدخل مركبات النحاس في صناعة بعض المبيدات الحشرية [24-26].

و مع هذا لا نستطيع إيقاف تكون الجنور الحرة، لأنها جزء من عملياتنا الأيضية وحياتنا اليومية في هذا العالم الصناعي.

2.V. الأوكسدة التلقائية

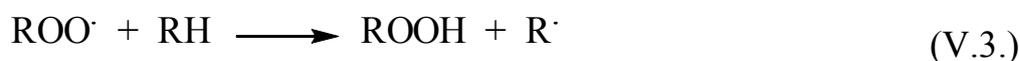
يتفاعل الأوكسجين مع العديد من المركبات العضوية (RH) لإنتاج هيدروبيروكسيد و مركبات أوكسجينية. في معظم الحالات هذه الأوكسدة عبارة عن تفاعلات جذرية تسلسلية تمر بثلاث مراحل، أولها مرحلة تكوين الجذور، ثانيا مرحلة انتشار الجذور، ثالثا مرحلة تجميع الجذور [27].

✚ أولا مرحلة البدء:



تكون الجذور الحرة قد تحدث من قبل التفكك الحراري المباشر (الحراري)، عن طريق التحلل هيدروبيروكسيد، من خلال الحفز معدنية وعن التعرض للضوء (التحلل الضوئي).

✚ ثانيا مرحلة الانتشار:

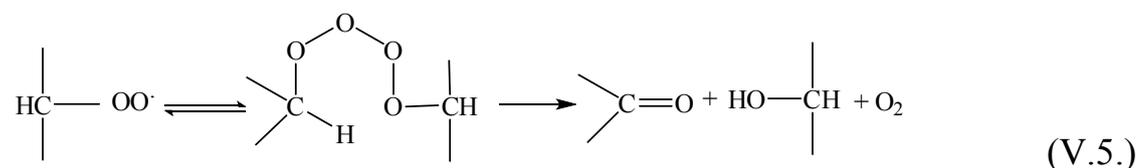


قابلية المركبات العضوية للأوكسدة التلقائية على سهولة منحها هيدروجين عن طريق التفاعل (3).

✚ ثالثا مرحلة تجميع الجذور:



اقترح Russell أن تفاعل جذرين من هيدروبيروكسيد في درجة الغرفة يعطي وسيط تنترأوكسيد لإنتاج كينون و كحول و أكسجين [28].



يمكن أن يكون الأوكسجين الناتج من التفاعل السابق نشيط في الحالة الأحادية [29].

3.V. مضادات الأكسدة**1.3.V. تعريف مضادات الأكسدة**

تعرف مضادات الأكسدة بأنها تلك المواد التي لها القدرة على تثبيط المواد المؤكسدة فهي تعمل منع تكوين أو منع تأثير أصناف الأكسجين والنتروجين الفعال الناشئين داخل الجسم ويؤديان إلى أضرار في الجزيئات الحيوية للخلية يتم ذلك بإضافة كم هائل من الإلكترونات إلى داخل الأوعية الدموية مما يحقق التوازن لذرات الأكسجين التي تحمل عناصر حرة وأيضاً والأهم أنه يعيد الخلية مسلوقة الإلكترون إلى توازنها وطبيعتها. ومن بين الشروط التي يجب أن تتوفر في مضادات الأكسدة المناسبة للجسم هي أن تتفاعل مع نواتج الأيض الأكسجين التفاعلية التي هي مواد بيولوجية سامة ، تعديل الجذر الحر دون أن تتحول بنفسها إلى جذر حر، و فصل الجذر الحر المرتص على مستقبلات خاصة معينة عن هذا المستقبل، وألا تكون سامة و مؤذية للجسم وقابلة للانطراح من الجسم وغير قابلة للتخزين، و يجب أن يكون نصف عمر مضادات الأكسدة كبير بما فيه الكفاية للتفاعل مع المؤكسد. إلا أنه في الحقيقة فإن مواد قليلة تحقق هذه الشروط مجتمعة [29-31].

2.3.V. تصنيف مضادات الأكسدة

يوجد العديد من التصنيفات التي يمكن أن تندرج ضمنها مضادات التأكسد، فقد صنفت حسب مصدر إنتاجها داخلية أي ذاتية أو خارجية، آلية عملها، طبيعتها (إنزيمية، غير إنزيمية).

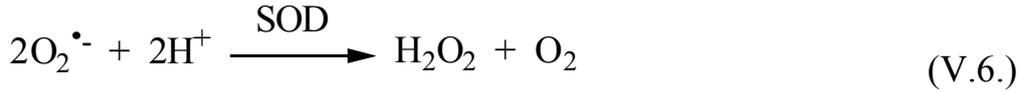
1.2.3.V. حسب مصدرها

تصنف المضادات الأكسدة حسب مصدرها إلى أربع مجموعات وهي على التوالي:

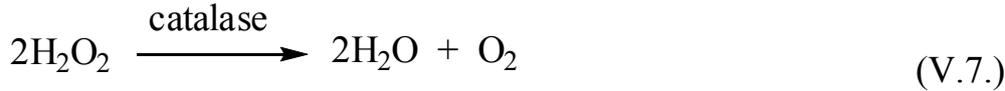
أ- مضادات الأكسدة ذاتية

توجد مضادات الأكسدة في جسم الكائن الحي على صورة إنزيمات أو مرافقات إنزيمية أو مركبات تحتوي على عنصر الكبريت، ينتج الإنسان أربعة إنزيمات وكالاتي:

• فوق أكسيد الديسميوتاز: Superoxide dismutase ويختصر بـ(SOD)، يعتبر هذا الإنزيم أحد أهم الإنزيمات الفاعلة كمضاد للأوكسدة. فهو يقوم بإزالة جذور فوق الأوكسجين وذلك بتسريع معدل إزالته بحوالي أربع مرات بمساعدة بعض المعادن مثل السيلينيوم والنحاس والزنك. وهو موجود في كل الأنسجة الهوائية في الميتوكوندريا والسييتوسول [32،21].



• الكاتالاز **Catalase**: ويوجد في الأجسام البيروكسية Peroxisomes في خلايا أنسجة الكائنات الراقية كالدماغ ونخاع العظام والأغشية المخاطية والكلية والكبد. كما أن هذه الأجسام غنية بإنزيم آخر هو الأكسيداز Oxidase. فبينما يعمل الأكسيداز على تكوين H_2O_2 يقوم الكاتالاز بتكسيده وتحويله إلى ماء وأوكسجين حسب التفاعل التالي:



حيث إن الماء والأوكسجين الناتجة ثابتة ومستقرة ولا تضرر منها. تحمي إنزيمات Hydroperoxidases الموجودة أيضاً في الأجسام البيروكسية الجسم ضد الأكاسيد الضارة، لأن تراكم الأكاسيد يؤدي إلى تكون جذور حرة تؤثر على الأغشية الخلوية وتسبب السرطان وأمراض الشرايين. يوجد البيروكسيداز في الحليب وخلايا الدم البيضاء والصفائح الدموية. إن التفاعل المحفز بواسطة البيروكسيداز معقد ويتم على عدة خطوات يمكن إيجازها في التفاعل التالي:

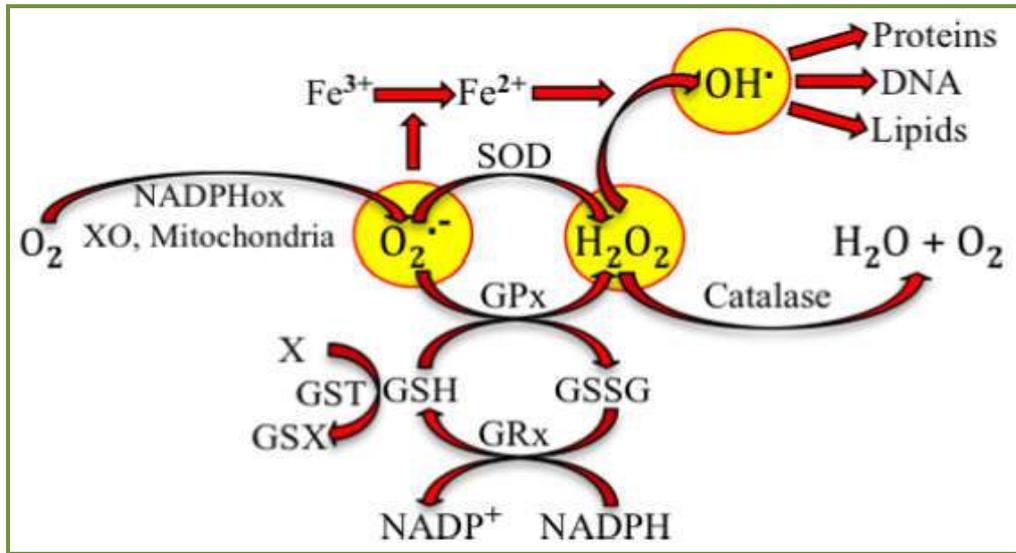
إنزيم الكاتالاز نشاط البيروكسيداز فهو يمكن أن يستخدم جزيئات H_2O_2 كركيزة مانحة للإلكترون وجزيئات H_2O_2 أخرى كمؤكسد أو مستقبل للإلكترون [32،33].

• جلوتاثيون بيروكسيداز **athione Peroxidase**: يوجد هذا الإنزيم في خلايا الدم الحمراء والأنسجة الأخرى. ويقوم هذا الإنزيم بتحفيز تكسير H_2O_2 و Hydroperoxides اللبيدات بواسطة الجلوتاثيون المختزل (GSH) و H_2O_2 ليعطي الجلوتاثيون المؤكسد (2GS) والماء، كما هو موضح في المعادلة التالية:



يقوم الجلوتاثيون بيروكسيداز بحماية دهون الأغشية الحيوية والهيموجلوبين ضد الأكسدة بواسطة Peroxides التي يمكن أن يستخدمها كركائز أخرى [34].

بالإضافة إلى هذه الإنزيمات هناك هورمون الميلاتونين (Melatonin) الذي تفرزه الغدة الصنوبرية (Pineal gland)، ويقوم هذا الهرمون الموجب الشحنة بمعادلة الشوارد الحرة ذات الشحنة السالبة ويزيل الأفعال الضارة لها. ولسوء الحظ فإن هذه الغدة تضمحل في سن الأربعين. وكذلك الثيول وهي مركبات تحتوي على عنصر الكبريت المختزل مثل الجلوتاثيون (Glutathione)، وحمض ألفا- ليبويك (α -Lipoic acid (LA) ، وأسيتيل سيستئين (NAC) N-acetylcysteine . حمض اليوريك، وNADPH وNADH. ومرفق إنزيم يوبيكوينون (Ubiquinone (Q10)) [35].



الشكل.1.V. مبادئ مضادات الأكسدة الإنزيمية.

ب- مضادات الأكسدة الغذائية

هي عبارة عن مركبات يكون مصدرها نباتي منها الخضروات، الفواكه، والحبوب، النباتات الطبية، والأعشاب العطرية. التي تحتوي على المركبات الفينولية مثل الأحماض الفينولية، الفلافونيدات، الأنتوسيانيدات، التانينات، الكومارينات، الكاروتينويدات، الليبوكين، و الفيتامينات، و معادن، أثبت عدة دراسات أن الفاعلية مضادة للأكسدة للمركبات الفينولية راجع إلى خاصية الأكسدة والإرجاع والتي يمكن أن تلعب دورا هاما في وامتصاص تعديل الجذور الحرة و تمنع الأكسجين الأحادي و الثلاثي وتفكك البروكسييدات. أو مصدر حيواني منها اللحوم الحمراء، ولحوم الدواجن والأسماك و البيض وتحتوي على الفيتامينات (C, E, A)، الأحماض الدهنية 3-أوميغا، و معادن نادرة مثلا السيلينيوم، المنغنيز، مغنيسيوم، الزنك [36-43].

ج- مضادات الأكسدة الصناعية

تستخدم المضادات الأكسدة الصناعية كثيرا في صناعة المواد الغذائية، مثل بوتيل هيدروكسي الأنيسول ((butylated hydroxyanisole (BHA))، بيوتل هيدروكسي طولوين ((Butylated hydroxytoluene (BHT))، بروبيل غالاتي ((propyl gallate (PG)) وثالثي بوتيل الهيدروكينون ((tert-butyl hydroquinone(TBHQ))، لأنها فعالة و أقل تكلفة من مضادات الأكسدة الطبيعية. تستخدم BHA و BHT للحفاظ على الدهون والزيوت في مستحضرات التجميل والمستحضرات الصيدلانية. ومن أجل الحفاظ على نكهة واللون والقيمة الغذائية. ومع ذلك مازالت تحتاج إلى دراسة من الناحية سلامة استعمالها مثل المواد المضادة للأكسدة الطبيعية كالمستخرجة من الغذاء [44].

د- توليفات مضادات الأكسدة

هي مركبات تعتبر من المواد مضادات الأكسدة ضعيفة الفاعلية، وتظهر خصائصها إلا في وجود غيرها من المضادات الأكسدة مثل اليسيستينات ((Lécithines (Phosphatidylcholine))،

حمض الستيريك، وحمض الطرطريك، والأحماض الأمينية، وبعض الفلافونويدات. ويمكن تفسير خصائصها من خلال تفاعل التمثيل مع المعادن كالحديد و النحاس، التي لها أثر مضاد الأكسدة عند تراكيز منخفضة. ويكون لبعض النواتج تأثير على تفكيك الهيدروبيروكسيد. و اخرى بتوليد مضادات الأكسدة مثل التكويفيرولات و مشتقات حمض الأسكروبيك من خلال أشكالهم المؤكسدة [45].

تستخدم مزائج من مضادات الأكسدة في الزيوت و الدسم لتأمين منتجات أفضل. فمثلا يستخدم مزيج من TBHQ مع BHT أو BHA و بإضافة حمض الستيريك لزيادة مدة التخزين للزيوت والدسم. أهم الفوائد المميزة لاستخدام مزيج من المواد المضادة للأكسدة:

✓ مزج مضادات الأكسدة مع بعضها البعض يؤمن فعالية أعلى و فوائد أفضل مما وضع كل مضاد على حدا.

✓ يؤمن حدود و ضوابط أفضل لتطبيقات مضادات الأكسدة ،

✓ يؤمن امتزاج أفضل بين طور مضاد التأكسد و الطور الدسم.

2.2.3.V حسب آلية التفاعل

يمكن تصنيف المضادات الأكسدة حسب آلية التفاعل إلى قسمين مهمين: مضادات الأكسدة الأولية و الثانوية.

أ- مضادات الأكسدة الأولية

هي المركبات التي تتفاعل مع الجذور الليبيدية (L^{\cdot} , LO^{\cdot} , LOO^{\cdot}) لإنتاج مركبات أكثر استقرار (LH, LOH, LOOH)، وهذا راجع إلى أنها مركبات مانحة بروتونات نشطة، ومشتق الجذر مضاد الأكسدة (A^{\cdot}) يحول إلى ناتج مستقر. مثل حمض الأسكروبيك و مشتقاته، تكوفيرول، BHT، BHA، THBP، TBHQ [46،47].

ب- مضادات الأوكسدة الثانوية (وقائية)

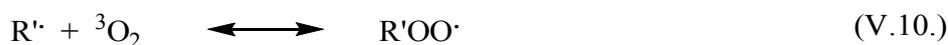
وفق Gordan فإن المركبات المضادة للأوكسدة الثانوية هي المركبات التي تؤخر أكسدة الدهون في تفاعلات مختلفة:

- ✓ امتصاص الأشعة فوق البنفسجية،
- ✓ التمثيل مع المعادن،
- ✓ إخماد الأوكسجين الأحادي،
- ✓ تفكك الهيدروبيروكسيد [48].

3.3.V. آلية عمل مضادات الأوكسدة

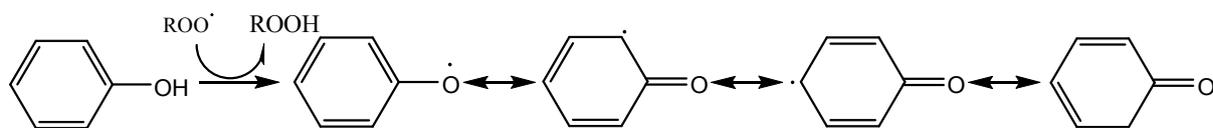
تعمل مضادات الأوكسدة الأولية على إعاقة و قطع تفاعلات الانتشار و بالتالي تبطئ عملية الأوكسدة ، وتعود لتتسارع عند نفاذه .وتعد متعددات الفينول من أهم مضادات الأوكسدة و خاصة تلك التي تحمل زمرة هيدروكسيل أو زمرة هيدروكسيل و مستبدل في المواقع أورثو أو بارا، وهي فعالة بالتراكيز المنخفضة و بالدم الحيوانية أكثر من الدم النباتية.

تتميز جذور المواد الدسمة بتفاعلية عالية و تدخل بسرعة في التفاعلات الانتشار من خلال سحب الهيدروجين أو بتفاعل مع الأوكسجين في حالته ثلاثي السبين.



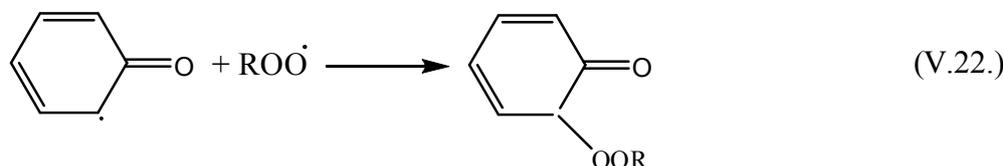
يحدث التأكسد بسرعة عالية بطاقة تنشيط منخفضة جدا و لذلك يكون تركيز جذور الألكيل بيروكسي $ROO\cdot$ أعلى بكثير من جذور الألكيل $R\cdot$ وذلك في جميع المنظومات الغذائية الحاوية على الأكسجين [49].

تقوم المركبات الفينولية بدور المستقبلات للجذور الحرة المتشكلة في مرحلة البدء و ذلك من خلال التنازل عن $H\cdot$ ليشكل جذر الفينوكسيل المستقر بسبب صيغته الطينينية التالية [50,37]:



تسلك آلية التأكسد آلية جذرية، تتفاعل المضادات الأكسدة الفينولية مع الهيدروبيروكسيدات وفق

التفاعل التالي:



ويجب الأخذ بعين الاعتبار إمكانية تشكل الجذور الحرة بالتفاعلات المحفزة ضوئياً أو إنزيمياً أو بوجود معادن، كما تزيد الرطوبة و الحرارة و الضوء و زيادة عدم الإشباع سرعة التأكسد [51].

أخيرا تجدر الإشارة إلى أن اختيار طريقة إضافة مضادات الأكسدة لمنظومة الأطعمة لتأمين التمازج الكامل مع طور الليبيدات أمر بغاية الأهمية، ويلعب نوع الطعام و ظروف التحضير و المعدات المستخدمة دورا أساسيا في اختيار الطريقة، ويمكن أن تتم الإضافة بشكل مباشر و مركز للدسم و الزيوت، أو كمذيب للطعام، أو بشكل مستحلب.

4.3.V. الآثار الضارة من المواد المضادة للاكسدة

تعد مضادات الأكسدة الصناعية أقل خطورة مقارنة مع المنتجات تأكسد المواد الدسمة دون إضافة مضادات الأكسدة، ولكن لها تأثير جانبي على صحة الإنسان عند استعمالها. نلخص هنا بعض من الدراسات المنشورة التي تظهر الآثار الضارة من المكملات المضادة للأكسدة في البشر. أجريت دراسة في أستراليا، حيث تلقى 69 شخص مصاب بارتفاع ضغط الدم مع ضغط الانقباضي الإسعافية أكبر من 125mmHg علاج بفيتامين C (500mg) و بوليفينول مستخرج من بذور العنب (1000mg) في اليوم لمدة ستة أسابيع . في نهاية العلاج زاد الضغط الانقباضي والانبساطي وكانت هناك تغييرات في البطانة المتعلقة بتوسع الأوعية أو بالجهد التأكسدي للمؤشرات الحيوية [52].

دراسة علاج تصلب الشرايين (HDL) لمئة وستون شخص مصاب بحدوث الرجال أقل من سبعين سنة والنساء أقل من ستين سنة، مع عندهم انخفاض في مستوى الـ HDL و ثلاثي الجليسيريد أقل من (400mg/dl). تم تعيين المرضى إلى واحد من 4 مجموعات: Simvastatin + niacin مع أو بدون فيتامين E (800IU)، فيتامين C (1000mg)، بتا كاروتين (25mg)، وسيلينيوم (100µg)، وهذه الجرعات تأخذ في اليوم. والمتابعة بعد 3 سنوات أظهرت أن العلاج المضادة للأكسدة قلل من ارتفاع HDL التي تنتجها Simvastatin + niacin [53-55].

في إطار الفحص التجريبي لسرطان البروستات والرئة والقولون والمستقيم والمبيض. كانت دراسة استطلاعية في الولايات المتحدة تشمل 25.400 امرأة تتراوح أعمارهن من 55 إلى 74 سنة أي بعد سن اليأس، اللواتي تمت متابعتهم لمدة 10 عاما. وأظهرت النتائج أن خطر الإصابة بسرطان الثدي زادت

بنسبة كبيرة (20%) لدى النساء اللواتي لديهن حامض الفوليك أكبر من أو يساوي 400µg في اليوم. في حين لم يرتبط تناول حمض الفوليك الغذائية مع زيادة خطر [56].

جرت دراسة ابتدائية لفعالية كل من بتا كاروتين و الروتينال (Beta carotene and Retinal) في الولايات المتحدة الأمريكية ، شارك 18314 من النساء و الرجال، وهذا بتلقي جرعات من بتا كاروتين (30mg) و فيتامين A (25000IU) أو علاج وهمي. تم إيقاف الدراسة بعد عامين وهذا بسبب ارتباط فيتامين العلاج مع وجود نسبة أكبر من (28%) من سرطان الرئة وما يزيد عن (17%) من الوفيات من العلاج الوهمي [57،53].

استعمال ألفا توكوفيرول و بيتا كاروتين في دراسة الوقاية من السرطان (ATBC). شملت الدراسة 29133 رجل مدخن تتراوح أعمارهم ما بين 50 إلى 69 سنة، حيث يأخذون 50mg من ألفا توكوفيرول و 30mg من بتا كاروتين في اليوم أو علاج وهمي، فكانت النتائج أن هناك نسبة وفيات قدرت أكبر من 8% للرجال الذين تناولون المكملات المضادة للأكسدة من الرجال الذين تلقوا العلاج الوهمي [59،58،53].

قام Bjelakovic et al بدراسة المكملات المضادة للأكسدة للوقاية من سرطان الجهاز الهضمي على 131727 مريض. و جدوا أن مضادات الأكسدة تزيد بشكل كبير من العدد الإجمالي للوفيات ولم يمنع سرطان الجهاز الهضمي [60].

قام Myung et al بتحليل 31 بحث من أصل 3327 بحث، بحيث شملت 22 تجربة مع 161045 مريض (88610 مريض تعامل مع المواد المضادة للأكسدة) وخلص الباحثون إلى أن المواد المضادة للأكسدة ليست لها أي تأثيرات وقائية على السرطان. و مع ذلك، عندما تم تقييم مجموعة فرعية من أربع تجارب وجدوا أن المرضى الذين يتلقون مضادات الأكسدة كانت زيادة ملحوظة في نسبة سرطان المثانة [61].

تنوعت نتائج الأبحاث حول إثبات الأثر السمي لحمض الأسكوربيك و مشتقاته، حيث تشير دراسة أن أخذ (12.5mg/Kg) من فيتامين C و (10mg/Kg) من N-acetylcysteine يؤدي إلى زيادة في الجهد التأكسدي التي تتجها التمارين الحادة بالنسبة للأشخاص الأصحاء.

يعزى هذا إلى تحول فيتامين C إلى جذر الأسكوربيل بفعل الأصناف النشطة الناتجة أثناء ممارسة الرياضة [62]. و في الآونة الأخيرة قام كل من Peternej و Combes بتقييم 23 دراسة، التي تشير إلى الآثار السلبية للمضادات الأكسدة التكميلية على الآثار المفيدة التي تنتجها الممارسة المزمنة للرياضة، وجدوا أن مضادات الأكسدة لها دخل في توسع الأوعية وزيادة إشارات الأنسولين التي تنتجها ممارسة الرياضة [63].

مؤخرا زاد الإقبال على استخدام مضادات الأكسدة الطبيعية بالرغم من أنها لم تدرس كما درست مضادات الأكسدة الصناعية (وبشكل خاص BHT و BHA و TBHQ) و ذلك بسبب التساؤلات العديدة حول الأضرار التي تسببها. لذلك يفضل استخدام مضادات الأكسدة الطبيعية بقليل من الحذر، و يجب مراعاة بالإضافة لسمية مضاد التأكسد الطبيعي و تأثيره في الصحة عدة نقاط أخرى:

- ✓ كمية مضادات الأكسدة الطبيعية المضافة و تتوقف على منشأها وطريقة استخلاصها،
- ✓ عدم تأثيرها في الرائحة و الطعم،
- ✓ كلفة اقتصادية منخفضة،
- ✓ عدم تفاعلها بشكل غير مرغوب مع المواد الغذائية الموجودة في المنتج.

الفصل السادس

طرق تقييم فعالية مضادات الأكسدة

VI. طرق تقييم فعالية مضادات الأكسدة

يمكن تعيين القدرة المضادة للأكسدة بعدة تقنيات تحليلية كلاسيكية مثل التحليل الطيفي أو اللوني، الكروماتوجرافي، مطيافية الكتلة، الأشعة تحت الحمراء، طريقة الرنين بارا المغناطيسي الإلكتروني [64-70]. أو بطرق حديثة كالتحليل الكهربائي مثل طرق القياس البولاروجرافية، الفولتامترية (الفولتامترية النبضي التفاضلي، الفولتامترية حلقية، الفولتامترية الترددي)، الأمبيرومترية [71-74].

نذكر على العموم بعض الاختبارات المستعملة في تحديد وتعيين القدرة المضادة للأكسدة: الـABTS، الـDPPH، الـFRAP، الـORAC، الـTRAP، الـTOSC، الـPCL، الـCAA، الـOH، الـO₂، الـNO₂، الـPR، الـPM، الـTBA، الـDCFH-D، بيتا-كروتين ليونات، الفا-أميلاز، اكرانتين اكسيداس [75-88].

نتطرق إلى مفهوم وشرح مبادئ الاختبارات المستعملة في هذه الدراسة، وهي على التوالي: اختبارات الأسر الجذر (OH، ABTS، DPPH)، اختبار إرجاع الحديد، اختبار فسفومليبيدات، وطريقة الكهروكيميائية باستعمال الفولتامترية حلقية.

1.VI. اختبارات الأسر الجذري

تعتبر من أهم وأكثر الاختبارات استعمالاً، وتحدد هذه الاختبارات قدرة مضادات الأكسدة على تثبيط الجذور الحرة و ذلك لأنها تتفاعل بشكل مباشر و سريع مع المواد المضادة للأكسدة [89].

1.6.VI. اختبار الـDPPH

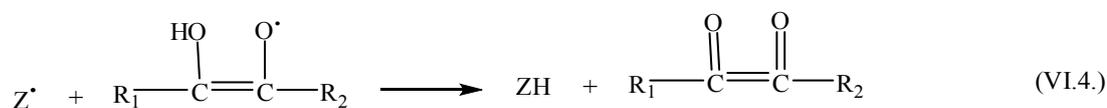
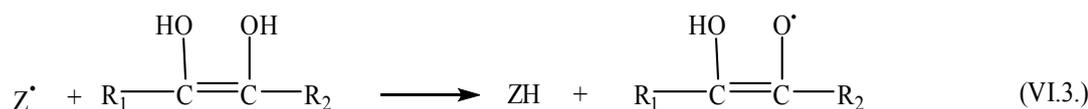
بينت الدراسات المرجعية أن أول من نشر هذه الطريقة العالم Marsden Blois سنة 1958 [90]، حيث درس الفاعلية على السيسيتئين بوصفه حمض أميني (amino acid cysteine) يحمل وظيفة ثيول، وفق التفاعل التالي:



ثم يتفاعل جذرين من RS^{\bullet} كما في التفاعل التالي:



كما درس تفاعل الكاشف الـ DPPH مع حمض الأسكوربيك وفق المعادلات التالية:



فيما بعد أصبح هذا التفاعل يطبق بشكل واسع على المستخلصات النباتية و الأطعمة و المحاليل البيولوجية و المصنوع و غيرها.

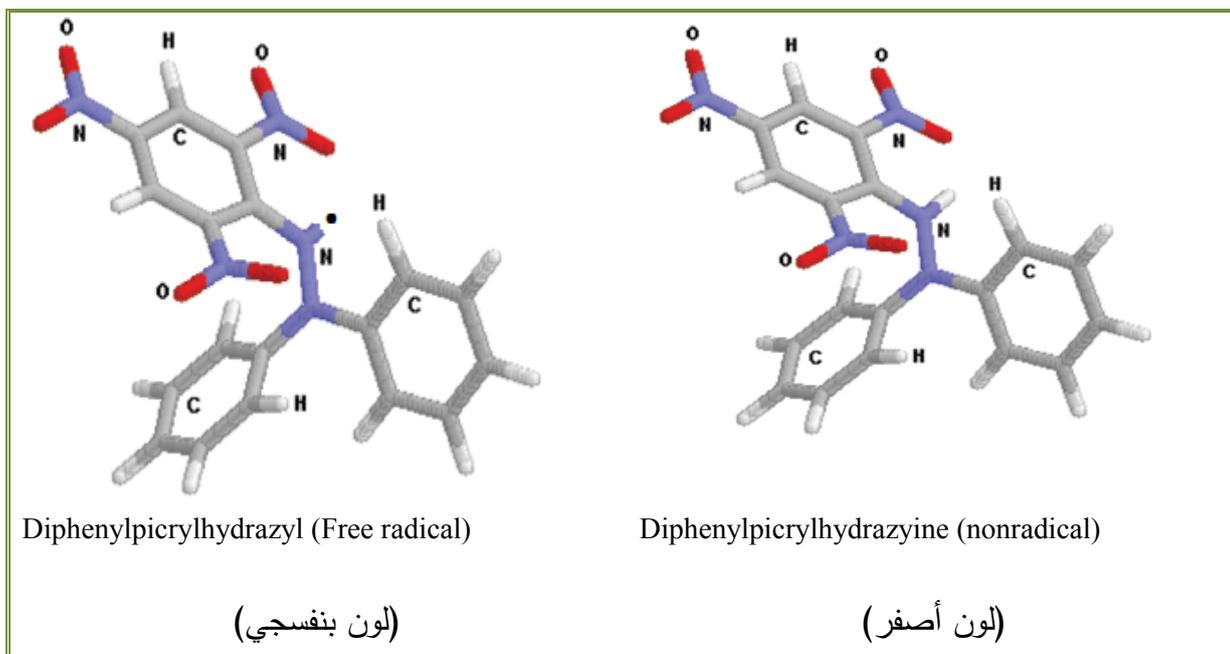
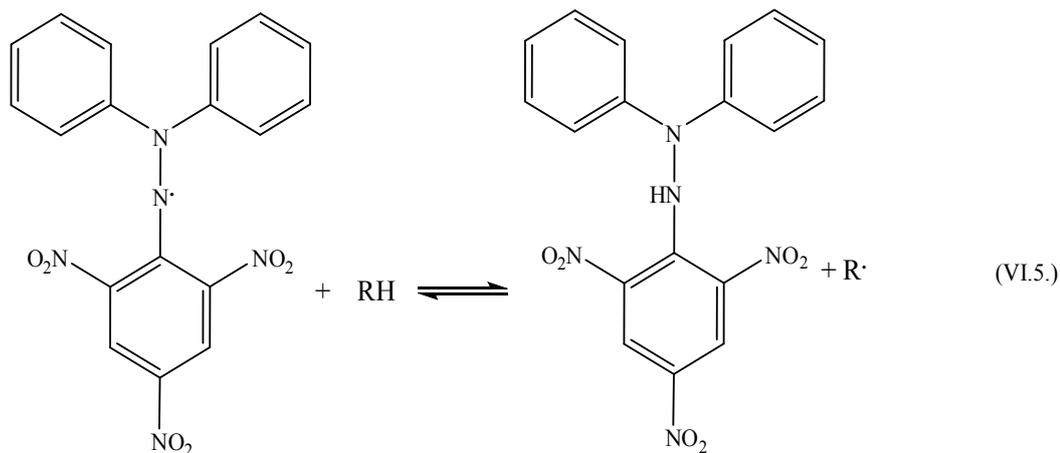
يتميز الجذر الحر لجزئ الـ DPPH بالإستقرار وذلك لأن له إلكترون واحد

مفرد على ذرة واحدة لجسر نيتروجين كما هو موضح في الشكل.1.VI. [91].

يعتمد مبدأ هذا التفاعل على التغير اللوني لجذر الكاشف الـ DPPH من اللون

البنفسجي الشديد إلى اللون الأصفر الفاتح. ونستعمل لهذا الغرض مطيافية ما فوق البنفسجي و المرئي

(UV/Visible)، ونقاس الامتصاصية عند طول الموجة 515nm، ويتم التفاعل بالشكل التالي [92]:



الشكل 1.VI. صيغة الـ DPPH و DPPH[·].

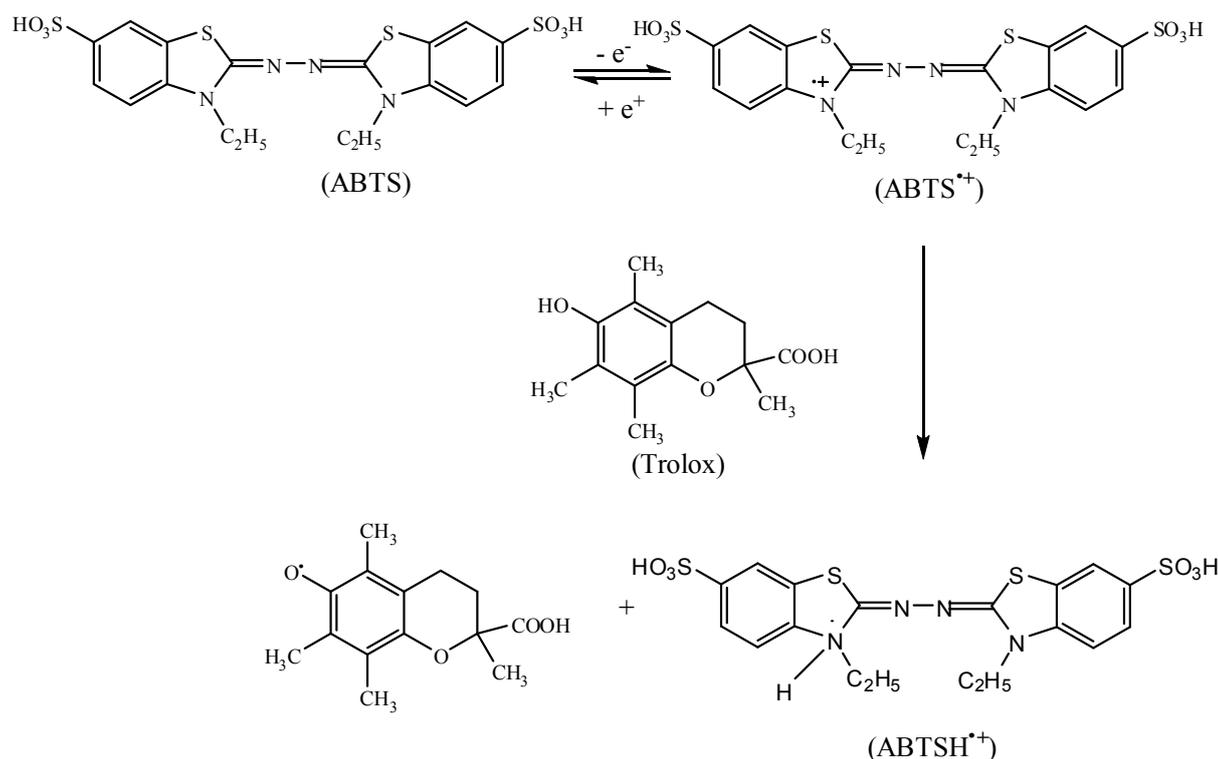
2.1.VI اختبار الـ ABTS

يستعمل هذا الاختبار بشكل واسع لتعيين القدرة الآسرة الجذرية للجزيئات على الجذر الكاتيوني المستقر الـ ABTS⁺ (2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiozoline-6-sulfonic acid) بالمقارنة مع الـ Trolox ويعتمد على الطريقة اللونية، يتأكسد جزئ الـ ABTS عديم

اللون إلى جذر كاتيوني $ABTS^{+}$ أزرق مخضر، وبخلطه مع أي مادة يمكن أن تتأكسد يرجع إلى شكله الأصلي $ABTS$ عديم اللون [93]. و هذا الجذر الكاتيوني له طول موجة أعظمي 645، 734، 815nm [96-94]، و لكن الأكثر استعمالاً عند طول موجة أعظمي 415nm. وتستخدم هذه الطريقة للمواد المضادة للأكسدة القابلة الذوبان في الماء، و القابلة الذوبان في الليبيدات، و المواد النقية، المستخلصات الغذائية [97].

وفق لطرق مذكورة في بعض الدراسات، يمكن لجزيء $ABTS$ أن يتأكسد بعدة مؤكسدات للحصول على جذره الكاتيوني. ومن هذه المؤكسدات مثل $K_2S_2O_8$ (potassium persulfate) [97]، MnO_2 [98]، و جذور الـ $ABAP$ (2,2V-azo-bis(2-aminopropane) [99]، ولقد استعمل في دراسات أخرى ثنائية متكونة من الماء الأكسجيني (H_2O_2) و إنزيم البيروكسيداز (peroxidase enzyme) [100]، أو بدون استعمال نظام إنزيمي وذلك باستبدال البيروكسيداز بـ $metmyoglobin$ [94].

المواد المضادة للأكسدة ترجع الجذر الكاتيوني $ABTS^{+}$ بمنحه هيدروجين، و طريقة قياس الفعالية المضادة للأكسدة دوماً مكافئة لـ $Trolox$ (TEAC)، و لها علاقة مباشرة بتركيز المواد المضادة للأكسدة و مدة زمن التفاعل. و يتميز هذا الاختبار أنه سريع و يمكن أن يستعمل في مجال واسع من قيم الرقم الهيدروجيني pH [101]. ولكن عند قيم الرقم الهيدروجيني العالية يتفكك البروتون بسهولة من مجموعة الهيدروكسيل للمركبات الفينولية و يحسن من القدرة المضادة للأكسدة لديها، بينما عند القيم للرقم الهيدروجيني المنخفضة للبرتنة يعيق من قدرتها المضادة للأكسدة [102]. و لذلك فإن قيم TEAC المذكورة في أغلب الدراسات عند رقم الهيدروجيني مساوي إلى 7.4 [103].



3.1.VI اختبار ال-OH

يعتبر الجذر OH[•] أقوى نوع كيميائي متفاعل من بين مختلف أنواع الأوكسجين النشطة، ينتج عن تفاعلات متتالية أحادية التكافؤ لإرجاع الأوكسجين الثنائي في عملية الإستقلاب الخلية [104]. وهو المسؤول الأول في الآثار السامة للأوكسجين في النباتات، والحيوانات، الكائنات الحية الدقيقة التي تعيش في الأوكسجين الجوي [105]. وهو خطير جدا بحيث يلحق الضرر لمجموعة واسعة من الجزيئات الحيوية الأساسية مثل والبروتين و الغشاء الليبيدي، الأحماض الأمينية الحمض النووي وهذا ما يفسر ظهور الآثار السامة على الكائنات الحية [106-109].

يفترض أن الجذر الهيدروكسيل ينشأ في النظم البيولوجية انطلاقا من المركب H₂O₂ عن طريق تفاعل فتون [110].



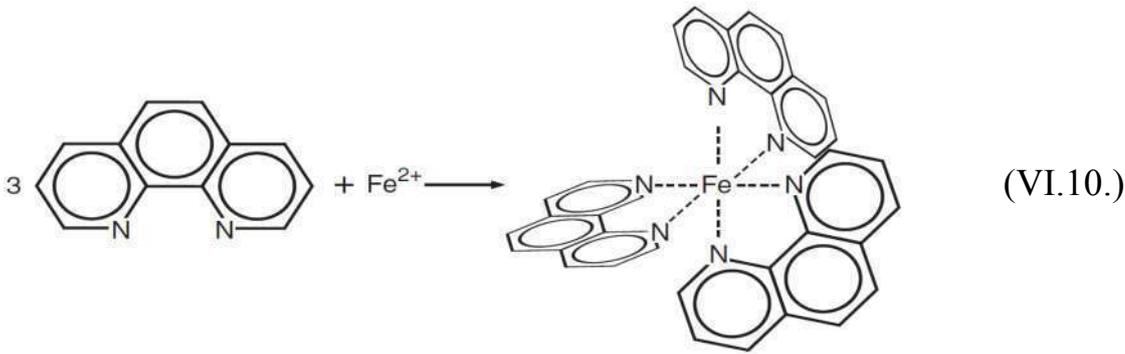
ويمكن استرجاع شاردة الحديد الثنائي Fe^{2+} بواسطة تفاعل الأوكسدة بأيون فوق أكسيد الأوكسجين $O_2^{\cdot-}$ حسب مايلي:



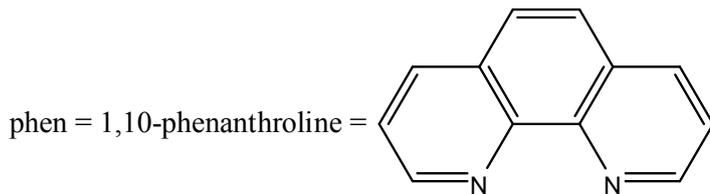
بجمع المعادلتين رقم (6) و (7) نتحصل على التفاعل لإجمالي يشار له تفاعل تحفيز الحديد -Haber Weiss [111]:



يمكن توليد جذور الهيدروكسيل مخبريا (*in vitro*) بخلط شوارد الحديد الثنائية (Fe^{2+}) و الماء الأوكسجيني (H_2O_2) و المركب 1,10-Phenanthroline. تتفاعل شوارد الحديد الثنائي مع 1,10-Phenanthroline أنظر التفاعلين (1،2) لتكوين معقد Phenanthroline- Fe^{2+} برتقالي اللون ولهذا يستعمل ككاشف لوني لتفاعل أكسد - إرجاع وتقاس الامتصاصية عند طول موجة ما بين 460 إلى 550nm. يولد النظام H_2O_2/Fe^{2+} من خلال تفاعل فوتون Fenton و تأكسد المعقد Phenanthroline- Fe^{2+} إلى شوارد الحديد الثلاثي $[Fe^{3+}]$ [112].



حيث أن:



2.VI. اختبار القدرة الإرجاعية للحديد

يستخدم كثيرا إرجاع الحديد الثلاثي كمؤشر يبين فاعلية الإلكترونات **المانحة** التي هي مهمة في آلية تفاعل مضادات الأكسدة الفينولية [113].
في اختبار القدرة الإرجاعية للحديد، تمنح المضادات الأكسدة الكترولونات تعمل على إرجاع الحديد الثلاثي إلى الحديد الثنائي. يمكن تحديد كمية معقد الحديد الثنائي بقياس طول موجة تشكل اللون الأزرق الداكن عند 700nm [114].



3.VI. اختبار موليبيدات الفوسفات

غالبا ما يعتبر هذا الاختبار في بعض الدراسات طريقة لحساب إجمالي القدرة المضادة للأكسدة [115،116].

هو اختبار سريع ومنخفض التكلفة وسهل التكرار، يسمح بقياس القدرة المضادة للأكسدة للمستخلصات المراد دراستها. في وجود عامل اختزال، وهذا بإرجاع حمض فسفوموليبيدات (Acide Phosphomolybdate) إلى فسفوموليبيدات (Phosphomolybdate) ذو اللون الأزرق حسب التفاعل التالي:



الطيف الأشعة فوق البنفسجية / مرئية في هذا المركب لديه الحد الأقصى مميزة في 695nm [117]. وقد استخدمت هذه الطريقة بنجاح لتحديد النشاط المضادة للأكسدة من المستخلصات النباتية [118]، ومركبات معزولة على سبيل المثال flavidin [119].

1.VI. الطريقة الفولطامتري حلقي

تتميز طريقة التحليل الفولطامتري الحلقي على الطرق الكهروكيميائية الأخرى بأن قياس المنحنيات تتم على قطب صلب ساكن مثل البلاتين و يظهر المخطط الفولطامتري (voltammogram) الكامل على هيئة قمم مهبطية و مصعدية متعاكسة تقريبا و التي تمثل عمليتي الارجاع و الأوكسدة على التوالي.

حديثا قام Korotkova et al بتطوير طريقة فولطامتريية جديدة لتحديد فعالية المضادات الأوكسدة [123-120]. تعتمد هذه الطريقة على إرجاع الأوكسجين المذاب بوجود مواد مضادة للأوكسدة على قطب من البلاتين أو كربون زجاجي المغلفة بشريط زئبقي.

وتعتبر الطريقة الفولطامتريية واحدة من أكثر الطرق الحديثة المستخدمة لقياس النشاط المضاد للأوكسدة للمركبات الفينولية وغيرها وهي طريقة انتقائية كهروكيميائية [126-124]. ولقد استعملت في تقييم القدرة الكلية لمضادات الأوكسدة لعينات حقيقية مثل السوائل البيولوجية أو الأنسجة ومستخلصات النباتات [133-127].



الفصل السابع

مواد و طرق الدراسة

VII. مواد و طرق الدراسة

1.VII. المواد الكيميائية

جميع المذيبات و الكواشف المستعملة في التجارب عالية النقاوة وتم شراؤها من Merck، و المواد التالية: DPPH، TCA، ABTS، $K_3Fe(CN)_6$ ، $FeCl_3$ ، Bu_4NPF_6 ، DMF، AG، AcA، BHT، BHA، تم شراؤها من شركة Trolox .Fluka. Aldrich تم شراؤه من Aldrich.

2.VII. اختبارات الأسر الجذري:

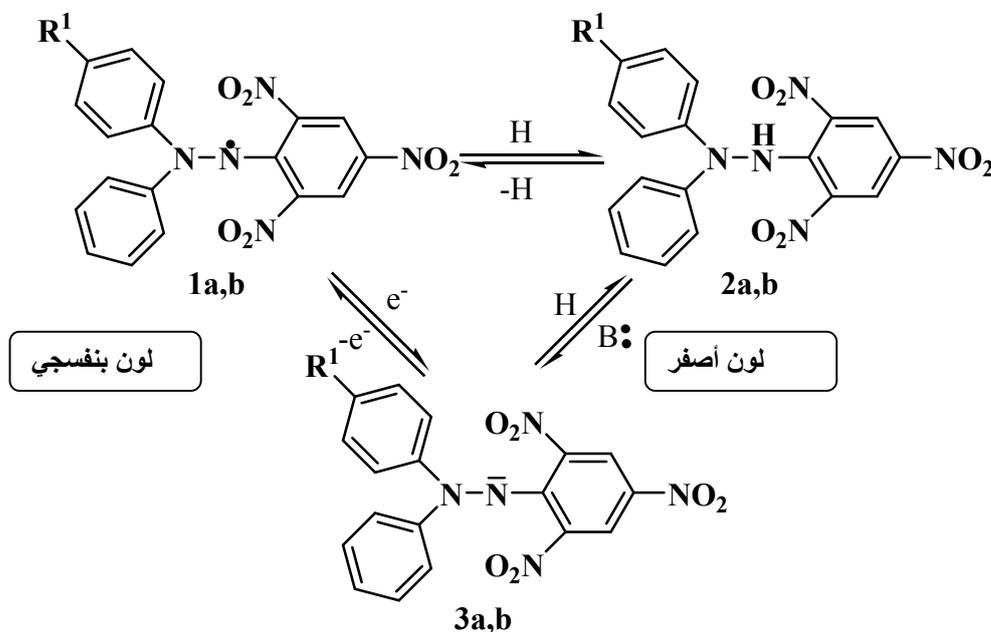
1.2.VII اختبار الـ DPPH :

هو اختبار مضاد للجذور الحرة و قد سبق تعريفه من 50 سنة ماضية من طرف العالم "بولواز" سنة 1958 ولقد اعتمد في ذلك على توضيح بعض الحسابات الخاصة بمضادات الأكسدة [10].

لغرض تقدير الفعل الأسر للجزيئات المضادة للتأكسد للمستخلص الميثانولي لكل من العينات تم استعمال اختبار الـ (DPPH) ثنائي فينيل بكريل هايدرازيل (diphenyl picrylhydrazyl) الذي يعتبر من أكثر الطرق استعمالا في تقدير التأثير الإزاحي للجزيئات المضادة للتأكسد (Burits & Bucar, 1997. Cuendet et al. 2000.,).

حيث تتناسب قدرة أسر الجذور الحرة بدلالة القدرة على إرجاع هذا الجذر, وذلك اعتمادا على قابلية إعطاء المستخلصات (مضادات الأكسدة) لذرة الهيدروجين [11], حيث تكون الجزيئات التي تملك هذه الخاصية قادرة على إرجاع جذر الـ DPPH (2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl) الذي يعتبر مادة صلبة لونها بنفسجي - مسود إلى (DPPH-H) (2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazine) غير جذرية لونها أصفر [12], وهذا باستعمال جهاز الطيف اللوني وذلك بقياس مقدار الانخفاض في

الامتصاصية, هذا الانخفاض في الامتصاصية يمكننا من معرفة قدرة وكفاءة المستخلصات من تثبيط الجذور [13].



a) $R^1 = H$ (namely DPPH for 1a; DPPH-H for 2a; DPPH⁻ for 3a)

b) $R^1 = NO_2$ (namely O₂NDPPH for 1b; O₂NDPPH-H⁻ for 2b; O₂NDPPH for 3b)

الشكل (IV. 15): يوضح آلية تثبيط العامل المضاد للأكسدة مع الجذر الثابت DPPH

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) وذلك باختلاف الألوان مع نقصان الامتصاصية عند طول الموجة الأعظمية $\lambda = 517nm$ [14] max

إن قدرة مضادات الجذور الحرة تحدد بعبارة كمية حسابية بدلالة تركيز المحلول لتثبيط 50% من الجذور الحرة، النتيجة نعبر عنها بـ IC₅₀ وهي معرفة بتركيز المحلول بوحدة (g/l) بالنسبة للمستخلصات الخام أو بـ (mM) للمركبات النقية معلومة الكتلة المولية لتثبيط 50% من جذور (DPPH)، وتحسب انطلاقاً من منحنيات التغير في نسب التثبيط المئوي % بدلالة تركيز المحلول، كلما كانت قيمة IC₅₀ صغيرة كانت فعالية المضادات الجذرية كبيرة [15][16].

هذا الاختبار مستعمل بكثرة نظرا للخصائص التي يتميز بها: سريعة، سهلة، غير مكلفة^[17]، 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-Vis)^[18].

في اختبار (DPPH) نلاحظ تغيرات مختلفة لمضادات الأكسدة تبعا لطبيعتها، من بينها الحركية السريعة، المتوسطة أو البطيئة وفقا للزمن اللازم للوصول إلى نتيجة، و قدرة مضاد الجذور تحسب انطلاقا من نسبة (DPPH) المتبقية في نهاية الوقت المحدد للتفاعل^[14].

تحضير المواد وطريقة العمل:

قمنا بتحضر 250 mM من محلول (DPPH) في الميثانول ثم تراكيز مختلفة من مستخلصات البروبوليس المخففة في الميثانول من كل تركيز نأخذ 1ml نضيف لها 1ml من (DPPH) نجانس المحلول، و نتركه 30 دقيقة في الظلام بعدها تتم القراءة في جهاز UV-Vis عند طول الموجة الأعظمي $\lambda_{max}=517\text{nm}$ ^[13]. نجري نفس العملية على حمض الأسكوربيك (AA) وذلك قصد مقارنة فعالية مستخلصات البروبوليس بالمركبات المضادة للجذور الحرة وللأكسدة.

● نتائج الاختبار:

نقوم بحساب النسبة المئوية للتثبيط (I%) و ذلك من العلاقة التالية:

$$I\% = ((A_0 - A_i) / A_0) * 100$$

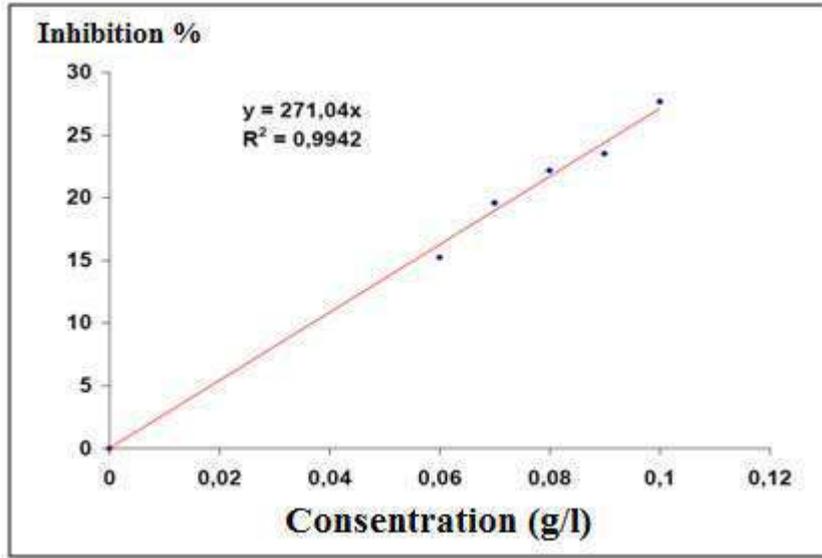
حيث أن:

A_0 : الامتصاصية الضوئية للجذر الحر في غياب المستخلصات.

A_i : الامتصاصية الضوئية للخليط (الجذر + المستخلصات) بعد مرور 30 دقيقة.

نرسم المنحنى البياني للنسبة المئوية للتثبيط بدلالة التركيز، هو عبارة عن معادلة مستقيم من الدرجة الأولى يمر بالمبدأ.

من المنحنيين (9.V) و(10.V) نحصل على التركيز المناسب لتثبيط 50% من الجذور الحرة لكل من مستخلصات البروبوليس وحمض الأسكوربيك المأخوذ كمرجع قياسي.



المنحنى (4. IV): المنحنى القياسي لحمض الاسكوربيك Acid Ascorbic (AA)

فيما بعد تم حساب التركيز المثبط لـ 50 % و 30 % من نشاط الـ DPPH (IC_{50}) و (IC_{30}) لكل مستخلص انطلاقاً من المعادلة التي تحدد نسبة التثبيط بدلالة تركيز المثبط. يعبر عنها بالمليغرام /مل وتم مقارنتها مع مثيلتها لحمض الاسكوربيك.



المنحنى (5. IV): اختبار الـ DPPH لمستخلصات البروبوليس

3.VII. اختبار موليبدات الأمونيوم:

يمكننا هذا التحليل من معرفة التقدير الإجمالي لمضادات الأكسدة في العينة، ومقدار المضادات

الأكسدة تقاس بطريقة (the phosphomolybdenum method) المقترحة من طرف Prieto وآخرون 1999^[19]، باستعمال الكاشف (Reactive the phosphomolybdenum)، هذا الكاشف يتغير لونه إلى الأخضر.

يتكون هذا الكاشف من (0.6 M: acide sulfurique; 28mM: phosphate de sodium; 4mM: molybdate d'ammonium)

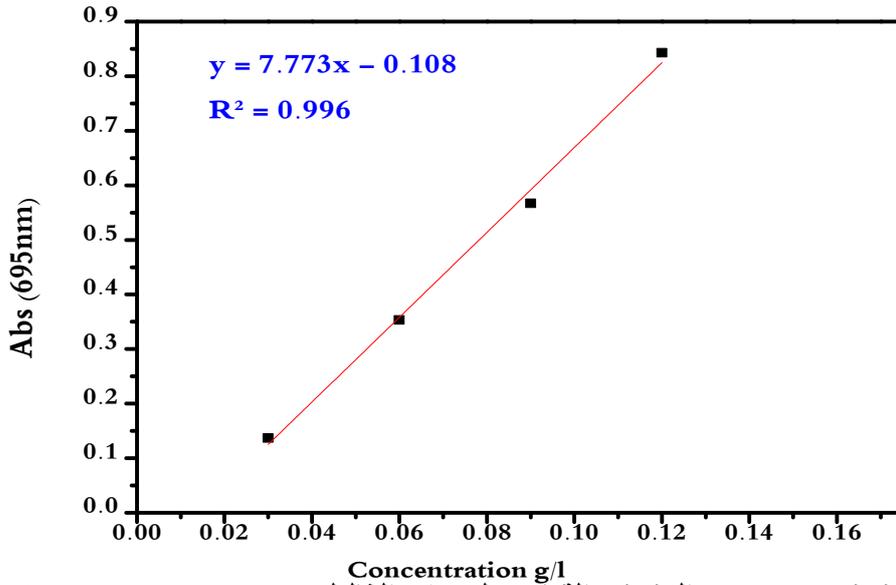
يعتمد هذا الاختبار في تقدير كمية إجمالي الفعالية المضادة للأكسدة على تشكيل معقد phosphate/Mo(V) ذو اللون الأخضر وذلك بإرجاع Mo(VI) إلى Mo(V) في المستخلصات الميثانولية^[20].

إن إجمالي الفعالية المضادة للأكسدة تقدر كميًا بواسطة جهاز UV-Vis حيث يستعمل حمض الغاليك (Acide Gallique) كمركب فينولي مرجعي عند طول موجي $\lambda_{MAX}=695nm$ ^[21].

❖ تحضير المحلول القياسي:

تم تحضير تراكيز مختلفة من حمض الغاليك (مركب قياسي) تكون محصورة بين (0.03 g/ml و 0.250 g/ml) ونأخذ من كل محلول ذو تركيز معين 0.2 ml ونضعها في أنبوب اختبار نضيف لها 2ml الكاشف (0.6 M: acide sulfurique; 28mM: phosphate de sodium; 4mM: molybdate d'ammonium)، نرج الأنابيب جيداً ليتجانس المحلول مع اخذ الاعتبار بغلق الأنابيب جيداً, ونضعها في حمام مائي يغلي بدرجة 80°C لمدة 90 دقيقة ونتركه يبرد.

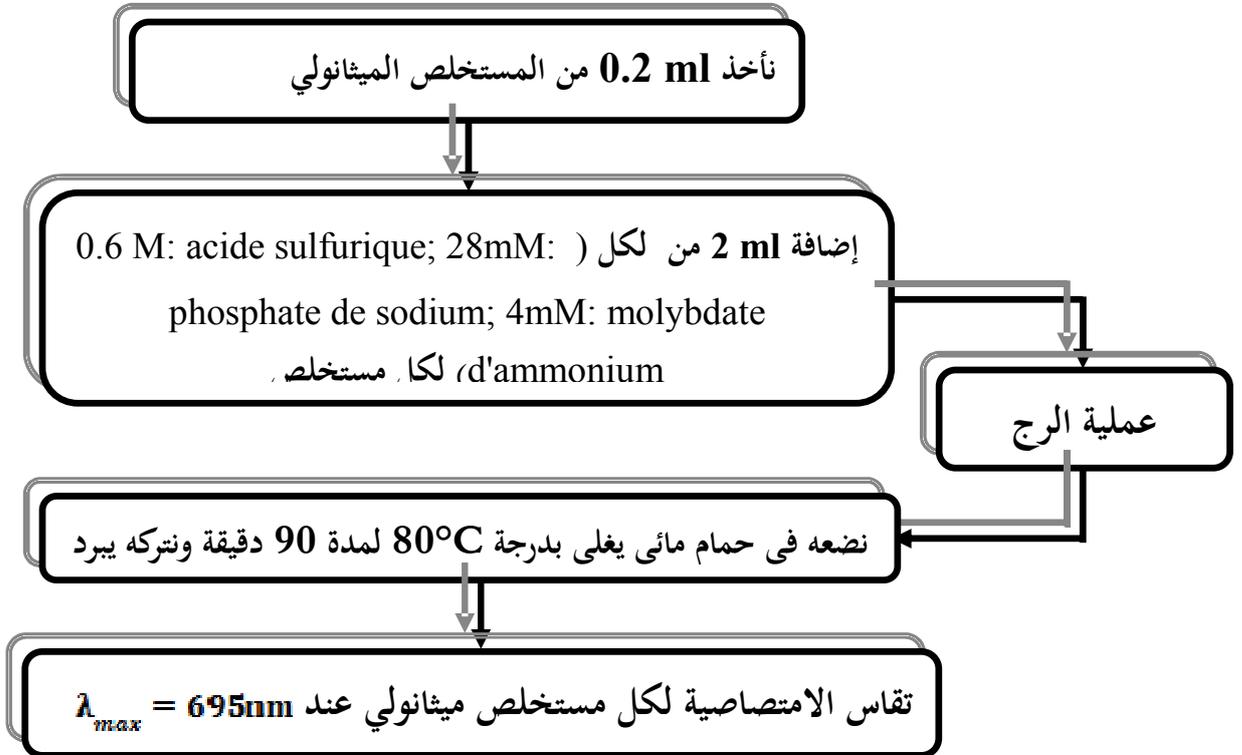
تتم القراءة الامتصاصية بجهاز (UV-Visible) عند طول الموجة $\lambda_{MAX} = 695nm$. انطلاقاً من قيم الامتصاصية (A) لحمض الغاليك, نرسم المنحنى القياسي الذي يبين تغير الامتصاصية (A) بدلالة التركيز بـ (g/l) الموضح في المنحنى رقم (6.IV).



المنحنى (IV. 6): المنحنى القياسي لحمض الغاليك (GA) Acid Gallique

● تقدير إجمالي فعالية مضادات الأكسدة في المستخلصات الميثانولية:

تم تقدير إجمالي فعالية المضادات الأكسدة للمستخلصات الممددة للبروبوليس بواسطة (Méthode of Prieto) بنفس الطريقة التي عملنا بها حمض الغاليك AG كما هو موضح في المخطط التالي:



الشكل (IV. 15): مخطط تقدير إجمالي المضادات الأكسدة في المستخلصات.

نسجل قيم الامتصاصية المتحصل عليها في الجدول التالي:

الجدول (7. IV): قيم الامتصاصية الضوئية لكل من مستخلصات العينة

العينة	r_b	r_m	r_{bj}	r_g
الامتصاصية $A_1(nm)$	1.02	0.790	0.756	0.712
الامتصاصية $A_2(nm)$	1.08	0.836	0.777	0.721

نستخدم المنحنى القياسي لحمض الغاليك لحساب تراكيز المضادات الأوكسدة في مختلف المستخلصات وذلك بإسقاط هذه النتائج على المنحنى القياسي, وذلك من اجل حساب كمية مضادات الأوكسدة في كل مستخلص.

4.VII. اختبار الفولطامتري حلقى :

في هذا القسم تم مباشرة العمل بالطريقة الفولطامبيرومترية الحلقية والموجة المربعة وبمساعدة التجهيز والمواد المدرجة سابقا وهذا بعد تحضير العينات المدروسة.

أنجزت هذه الدراسة في مخبر ترقية وتثمين الموارد الصحراوية (VTRS) في جامعة الوادي, حيث تطرقنا إلى دراسة السلوك الكهروكيميائي للمركبات المدروسة بواسطة الفولتأمبيرومتر الحلقى (CV) والموجة المربعة (SWV) في وسط يحتوي على مزيج من الإيثانول والمحلول الموقفي, وفي وجود ملح كلوريد البوتاسيوم (KCl) بتركيز (0.1 M) وذلك فوق مسرى من الكربون الزجاجي (CV) ذا قطر (1mm) (مسرى العمل) أما المسرى المرجعي فهو عبارة عن مسرى الكالومال (ECS) المشبع بـKCl, قمنا بتحديد مجال الكهروفعالية لأوكسدة مركبات متعددة الفينول على مسرى الكربون الزجاجي, حيث حدد المجال في البداية من (0-1200mV) في الجهة المصعدية ومن (0-1200mV) في الجهة المهبطية ثم حصر المجال بين قمة الأوكسدة الخاصة بكل مركب, سرعة المسح (100 mV) في النظام المفتوح.

1.4.VII. المذيب المستعمل في الدراسة الكهروكيميائية:

يتكون الوسط المدروس من مذيب (الإيثانول- محلول موقى (pH =2)) ومذاب (متعدد الفينول) أما المذيب يجب أن تتوفر فيه مجموعة من الخصائص التي نذكر منها:

الناقلية الجيدة في المجال المدروس.

يمتلك حرارة ثابتة.

يكون غير نشط كهربائياً في المجال المدروس.

يذيب المواد النشطة كهربائياً.

2.4.VII. الدراسة الكهروكيميائية للكهروليت المساعد:

من أجل الحصول على وسط ناقل للكهرباء، نضيف أملاح خاصة يصعب أكسدة شواردتها السالبة وإرجاع شواردتها الموجبة، حيث استعملنا 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 الكهروفعّالة المدروسة.

يجب أن يكون محايداً كيميائياً عند درجة حرارة ثابتة.

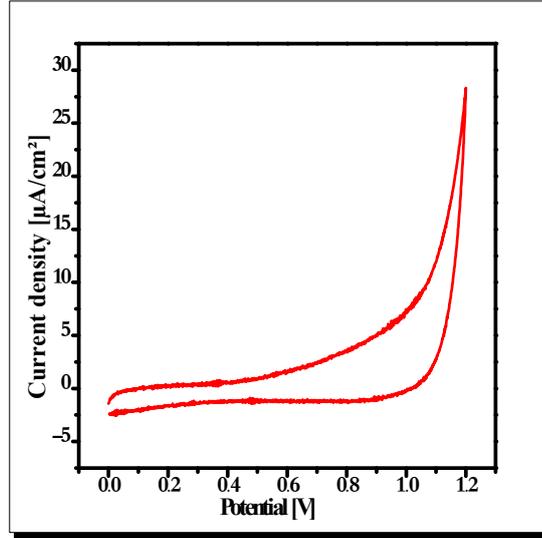
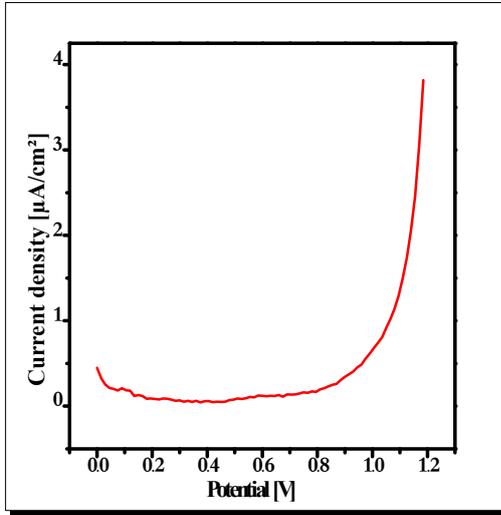
مجال الكهروفعالية للكهروليت المساعد يجب أن يكون واسعاً قدر الإمكان.

قبل مباشرة الدراسة، قمنا بتحديد مجال الكهروفعالية للكهروليت المساعد مع المذيب على مسري

الكربون الزجاجي ذا قطر 1mm (قطب العمل)، حيث حدد المجال من (0 إلى 1200 mV/ECS) في

الجهة المصعدية، سرعة مسح تساوي 100 mV/s، وذلك لرسم منحنيي الفولتأمبيرومتري الحلقي

(CV) والموجة المربعة (SWV) الخاصين بهما كما هو موضح في الشكل (7.IV):



المنحنى (B7.IV): فولتامتوغرام الموجة المربعة (SWV) للكهروليت المساعد (وسط عضوي في وجود (0.1M) KCL ; على القطب الكربون الزجاجي (CV) ; سرعة المسح 100MV/S; مجال المسح ((1200-0MV/ECS).

المنحنى (A7.IV): فولتامتوغرام حلقي (CV) للكهروليت المساعد (وسط عضوي في وجود KCL ; (0.1M) على القطب الكربون الزجاجي (CV) ; سرعة المسح 100MV/S; مجال المسح (-0 MV/ECS) ((1200.

3.4.VII تقدير الفاعلية المضادة للأكسدة بأخذ حمض الأسكروبيك كمركب قياسي:

1.3.4.VII الدراسة الكهروكيميائية لحمض الأسكروبيك:

❖ تحضير المواد وطريقة العمل:

حضرنا تركيز (40 mM) من AA، في حجم (2.5ml) من محلول موقى (pH=2) و (2.5ml) من الإيثانول. كما حضرنا الخلية الكهر وكيميائية التي تحتوي في البداية (12.5ml) على المحلول الموقى (pH = 2) و (12.5ml) الإيثانول والكهر وليت المساعد (KCl) بتركيز (0.1 M).

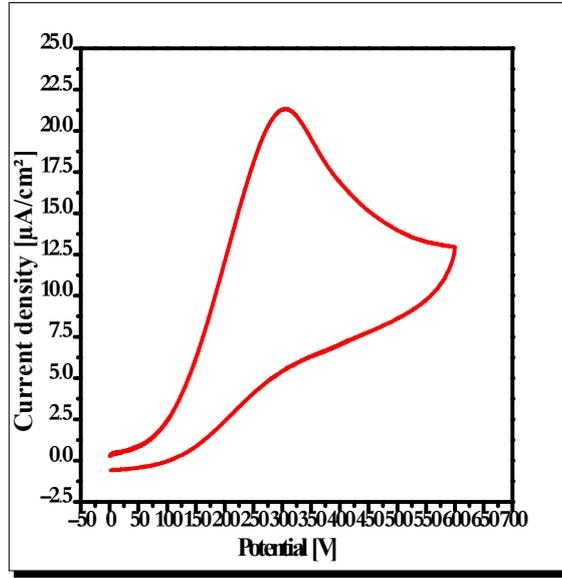
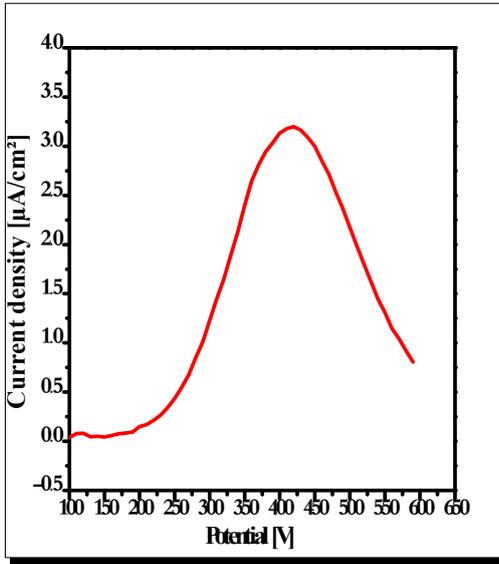
بعد كل إضافة من محلول AA والذي يتبعه تغير في التركيز نبدأ برسم المنحنى الفولط أمبيرومتريية الحلقية (CV) والمنحنى الموجة المربعة (SWV) الخاصة بحمض الأسكروبيك، حيث يتم الرسم وفق تراكيز متدرجة وبالشروط التالية:

كهرالكمون (E) من (0 إلى 600 mV) ويعود من (600 إلى 0 mV).

كهرسرعة المسح 100 mV/s.

كهردرجة حرارة المخبر $\cong 37$

تم الحصول على المنحنيات التالية:



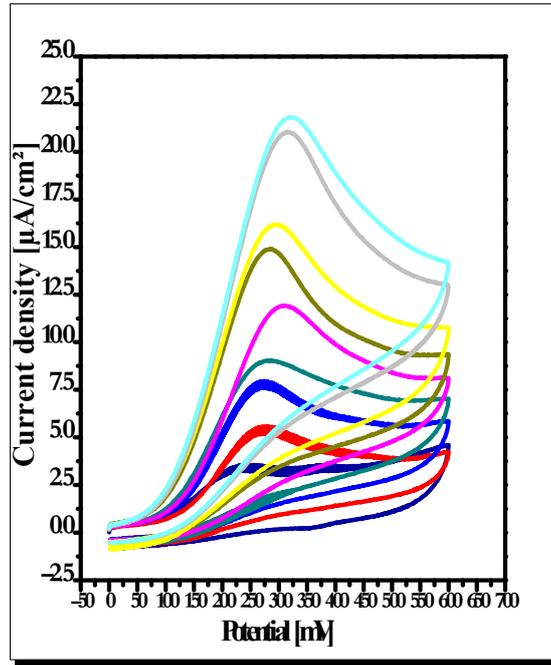
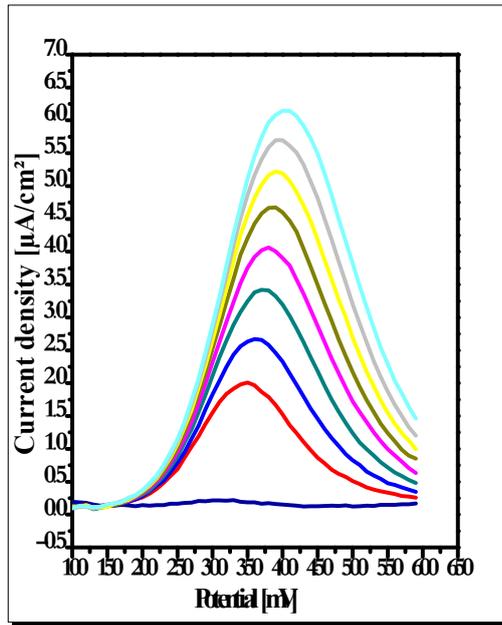
المنحنى (B8.IV): فولتامتوغرام الموجة المربعة
(SWV) لـ (1 MM) لـ (AA) (وسط عضوي
في وجود (0.1M) KCL ; على القطب الكربون
الزجاجي (CV) ; سرعة المسح 100MV/S;
مجال المسح ((600-0 MV/ECS).

المنحنى (A8.IV) : فولتامتوغرام حلقي (CV) لـ
(1 MM) لـ (AA) (وسط عضوي في وجود
(0.1M) KCL ; على القطب الكربون
الزجاجي (CV) ; سرعة المسح 100MV/S;
مجال المسح ((600-0MV/ECS).

نلاحظ في المنحنى (A8.IV) و (B8.IV) أن لدى حمض الأسكروبيك نتوء مصعدي واحد ولا وجود لنتوء مهبطي وبدل هذا على أن أكسدة حمض الأسكروبيك في هذه الشروط هي تفاعل غير عكوس

ونستطيع من هذا المنحنى أن نعرف ($E_{p/2} = 0,3V$) وهو يتطابق مع ما وجد في الدراسات السابقة [22][23].

بحسب الشروط المحددة نحصل على الفولتاموغرام الخاص بـ (CV) و (SWV) كما هو موضح في المنحنى (a9.IV) و (b9.IV):



المنحنى (b9.IV): فولتاموغرام الموجة المربعة (SWV) للتراكيز (2 - 0.1 MM) لـ (AA) (وسط عضوي في وجود (0.1M) KCL ; على القطب الكربون الزجاجي (CV) ; سرعة المسح 100MV/S; مجال المسح 600-0 MV/ECS;

المنحنى (a9.IV) : فولتاموغرام حلقي (CV) للتراكيز (2 - 0.1 MM) لـ (AA) (وسط عضوي في وجود (0.1M) KCL ; على القطب الكربون الزجاجي (CV) ; سرعة المسح 100MV/S; مجال المسح 600-0 MV/ECS).

1. رسم المنحنى القياسي:

بعد رسم المنحنيات CV و SW لتراكيز المركبات القياسية من 0.1-2mM, نقوم بتحديد كثافة التيار المصعدية لكل فولتاموغرام, حيث تمكنا هذه الأخيرة من رسم المنحنى القياسي لـ AA بدلالة التركيز $I_a = F(C)$.

حيث:

$$i_a = \text{كثافة التيار المصعدية } [\mu A/cm^2]$$

$$f(C) = \text{تركيز } AA [g/l]$$

4.4.VII. تقدير الفاعلية المضادة للأكسدة بأخذ حمض الغاليك كمركب قياسي:

1.4.4.VII الدراسة الكهروكيميائية لحمض الغاليك:

❖ تحضير المواد وطريقة العمل:

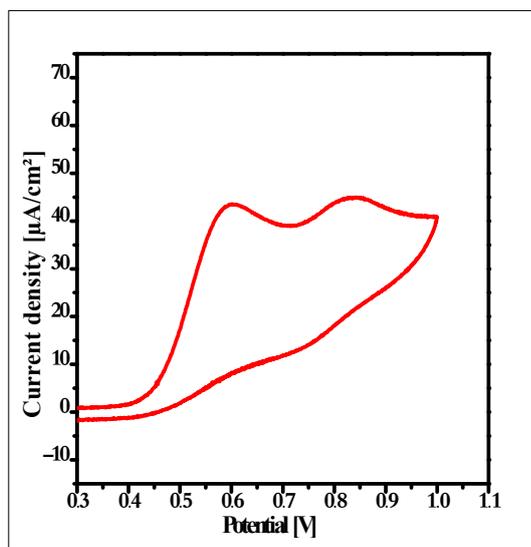
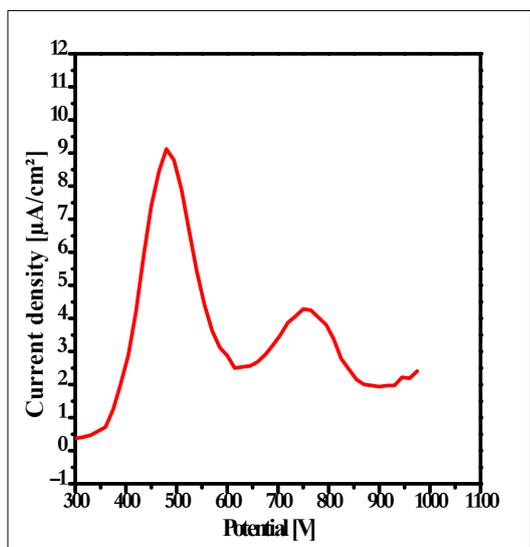
حضرنا (40 mM) من GA، في حجم (2.5ml) من محلول موقى (pH=2) و(2.5ml) من الإيثانول. كما حضرنا الخلية الكهر وكيميائية التي تحتوي في البداية (12.5ml) على المحلول الموقى (pH = 2) و(12.5ml) من الإيثانول و الكهر وليت المساعد (KCl) بتركيز (0.1 M).

نرسم المنحنيات (CV) و (SWV) لـ GA، حيث يتم الرسم وفق تراكيز متدرجة وبالشروط التالية:

كهر سرعة المسح 100 mV/s.

كهر الكمون (E) من (300 إلى 1000 mV).

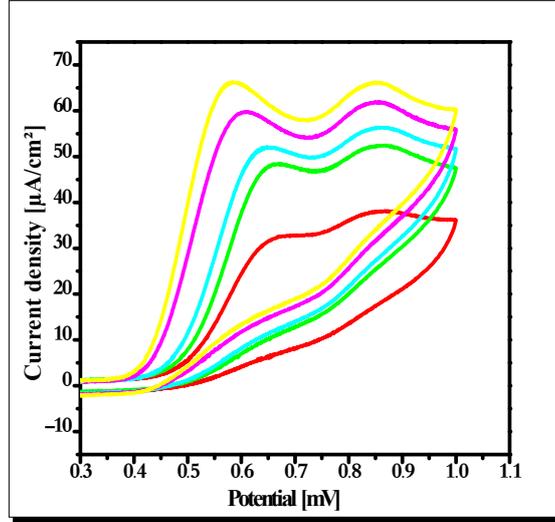
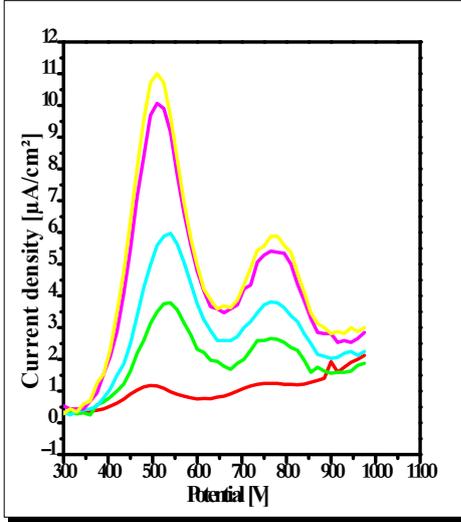
تم الحصول على المنحنى التالي لـ (1 mM) من (GA):



المنحنى (10.IV.B): فولتاموغرام الموجة المربعة المنحنى (SWV) لـ (1 MM) لـ (AG) (وسط عضوي في وجود (0.1M) KCL ; على القطب الكربون الزجاجي) (CV) ; سرعة المسح 100MV/S; مجال المسح (1000- 300 MV/ECS).

المنحنى (10.IV.A) : فولتاموغرام حلقي (CV) لـ (1 MM) لـ (AG) (وسط عضوي في وجود (0.1M) KCL ; على القطب الكربون الزجاجي) (CV) ; سرعة المسح 100MV/S; مجال المسح ((1000-300MV/ECS).

نلاحظ في المنحنى (10.IV.a) و (10.IV.b) أن لدى حمض الغاليك نتوءان مصعديان ولا وجود لنتوء مهبطي و يدل هذا على أن أكسدة حمض الغاليك في هذه الشروط هي تفاعل غير عكوس ونستطيع من هذا المنحنى أن نعرف $(E(I)p/2 = 0,601V)$ و $(E(II)p/2 = 0,836V)$ وهو يتطابق مع ما وجد في الدراسات السابقة^[48]. حيث تم الحصول على المنحنيات التالية لتراكيز (0.1 - 1 mM) من (GA) موضحة كما يلي:



المنحنى (B11.IV): فولتاموغرام الموجة المربعة
 (SWV) لـ (1 -0.1MM) لـ (AG) (وسط
 عضوي في وجود (0.1M) KCL ; على القطب
 الكربون الزجاجي (CV) ; سرعة المسح
 100MV/S; مجال المسح (-300 MV/ECS)
 1000).

المنحنى (A11.IV) : فولتاموغرام حلقي (CV)
 لـ (1 -0.1 MM) لـ (AG) (وسط عضوي في
 وجود (0.1M) KCL ; على القطب الكربون
 الزجاجي (CV) ; سرعة المسح
 100MV/S; مجال المسح ((1000-300 MV/ECS).

نلاحظ في المنحنى (a11.IV) و (b11.IV) أن الزيادة المنتظمة لتركيز حمض الغاليك في الخلية يعطي منحنيات فولتاموغرام مترية ذات مساحات وكثافة تيار كهربائي متزايدة بانتظام وهذا ما يدل على صحة الخطوات العملية المنجزة.

1. رسم المنحنى القياسي:

بعد رسم المنحنيات CV و SWV لتراكيز متدرجة ومختلفة المركبات القياسية من 0.1-2mM , نقوم بتحديد كثافة التيار المصعدية لكل فولتاموغرام, حيث تمكننا هذه الأخيرة من رسم المنحنى القياسي لـ GA بدلالة التركيز $I_a = F(C)$.

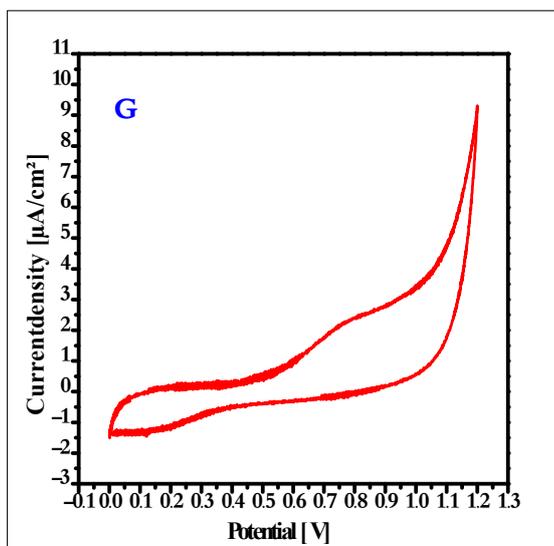
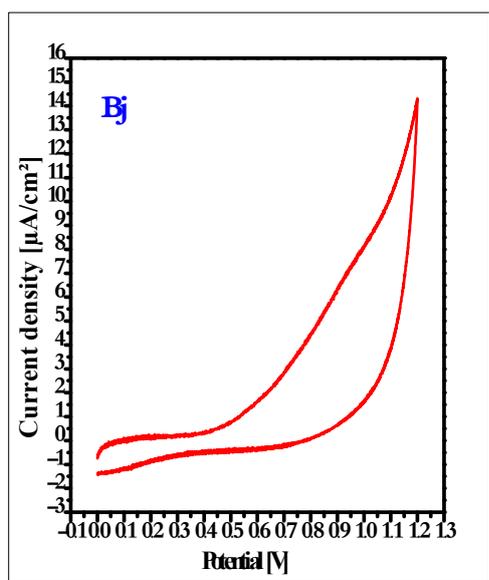
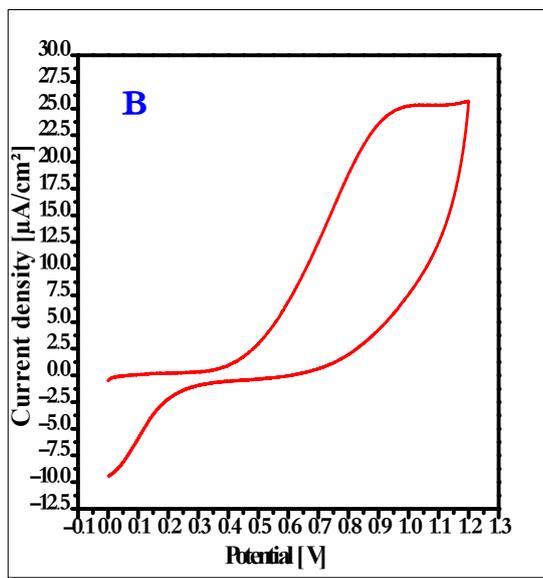
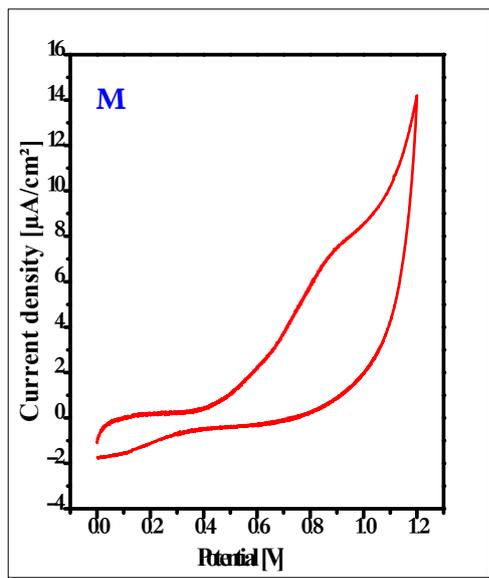
حيث:

$$i_a = \text{كثافة التيار المصعدية } [\mu A/cm^2].$$

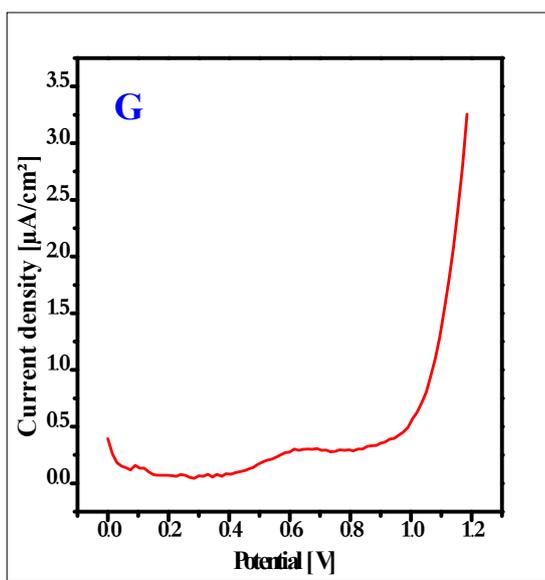
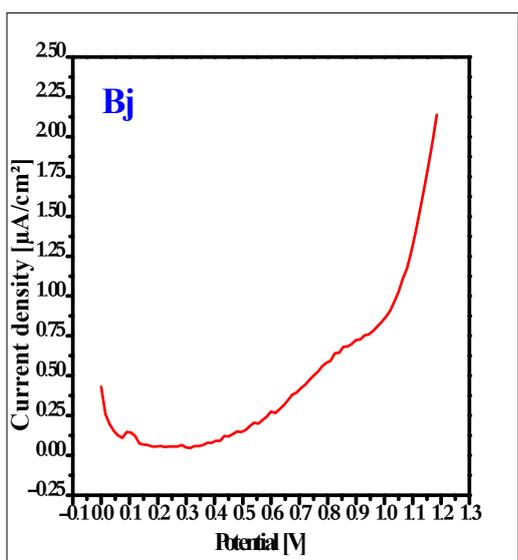
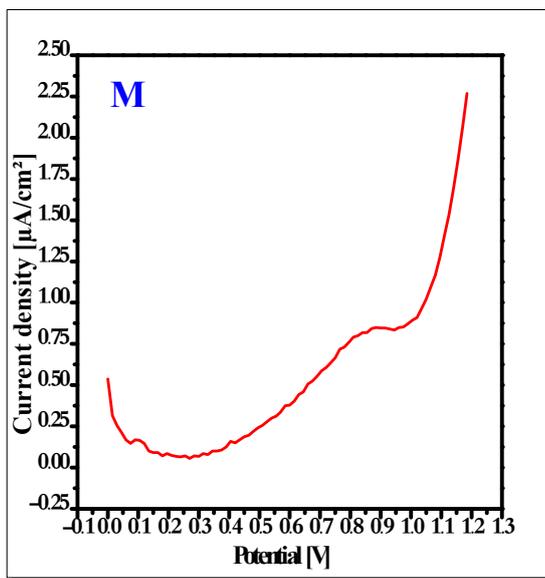
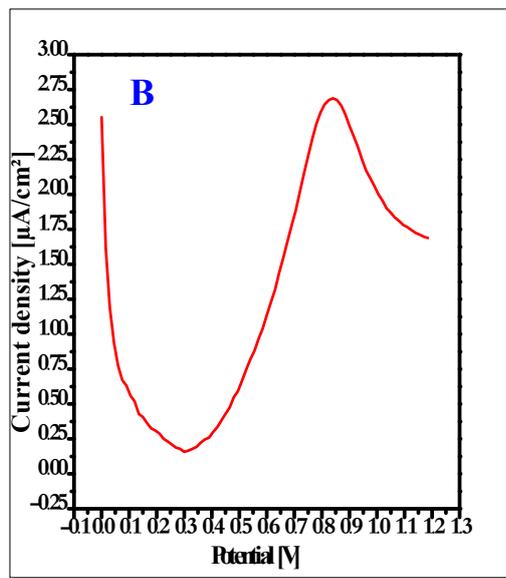
$$f(C) = \text{تركيز } AA [g/l].$$

4.4.VII. رسم المنحنيات الفولطأمبيرومترية الحلقية والمنحنيات الموجة المربعة للعينات المستخلصة:

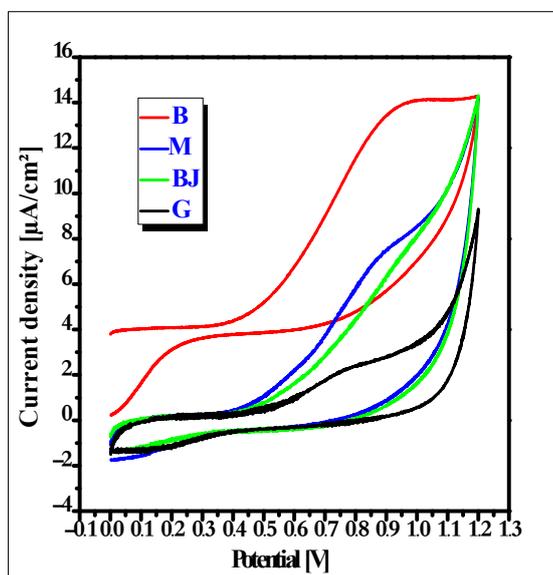
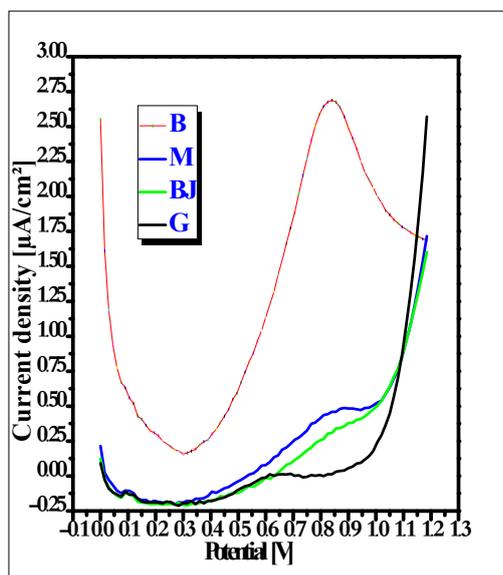
بنفس الطريقة وتحت نفس الشروط السابقة التي تعاملنا بها مع حمض الأسكروبيك نعامل مستخلصات البروبوليس لمختلف المناطق ونرسم المنحنيات الفولطأمبيرومترية الحلقية (CV) والمنحنيات الموجة المربعة (SWV) بحيث نضع كمية محددة من المستخلص موضحة كالتالي:



المنحنى (12.IV): فولتاموغرام الفولطامبيرومترية الحلقية لمستخلصات البروبوليس (وسط عضوي في وجود $0.1M$ KCl) على القطب الكربون الزجاجي (CV) ; سرعة المسح 100mv/S مجال المسح (($1200-0 \text{ mV/ECS}$).



المنحنى (13.IV): فولتاموغرام الموجة المربعة لمستخلصات البروبوليس (وسط عضوي في وجود $(0.1M) KCl$; على القطب الكربون الزجاجي (CV) ; سرعة المسح $100mv/S$ مجال المسح $((1200-0 mV/ECS))$.



المنحنى (B14.IV): مقارنة المنحنيات الموجة المربعة لمستخلصات البروبوليس (وسط عضوي في وجود KCL (0.1M) ; على قطب الكربون الزجاجي (CV) ; سرعة المسح 100MV/S; مجال المسح ((1200-0 MV/ECS).

المنحنى (A14.IV) : مقارنة المنحنيات الفولط أمبيرومترية الحلقية لمستخلصات البروبوليس (وسط عضوي في وجود KCL (0.1M) ; على قطب الكربون الزجاجي (CV) ; سرعة المسح 100MV/S; مجال المسح (1200-0 MV/ECS).

5.VII. الفولطامتري للأكسجين

نأخذ 10ml من محلول N,N-diméthyleformamide (DMF) يحتوي على كهروليت مساعد $0.1M \text{ Bu}_4\text{NPF}_6$ مشبع بهواء جاف لمدة عشر دقائق. في هذه الشروط افترضت أن ذوبانية الأكسجين مساوية إلى $0.94 \times 10^{-3} M$ ، تحت ضغط جزئي مساوي إلى 0.2 bar [143]. سجلت مخططات الفولطامتري لإرجاع الأكسجين بسرعة مسح مساوية إلى 0.1 Vs^{-1} ، و حدد

مجال كمون العمل من (-0.2 V) إلى (-1.2V)، مقارنة بالمسرى المرجعي هو عبارة عن مسرى الكالومال المشبع (ECS).

1.5.VII. الفولطامتري للأكسجين بوجود المستخلصات الفينولية

قدت فعالية الأسر الجذري لـ $O_2^{-\cdot}$ للمستخلصات المدروسة على أساس طريقة [144] Bourvellec et al، مع بعض التعديلات. تم فحص تأثير مختلف المستخلصات المدروسة عن طريق إضافة متعاقبة من مستخلصات ممددة (100µl) إلى محلول الأكسجين (10ml) وتراوحت التراكيز الممددة من 0 إلى 0.083g/l. بعد كل إضافة نسجل مخطط الفولطامتري لمحلول الأكسجين بسرعة مسح $0.1Vs^{-1}$. استخدم كل من حمض الاسكوريك وحمض غاليك كشواهد مرجعية. لحساب القدرة المضادة للأكسدة استعملنا المعادلة التالية:

$$\text{Scavenging effect (\%)} = (I_{P_2}^0 - I_{P_2}^s) \times 100 / I_{P_2}^0 \quad (\text{VII.8.})$$

بحيث أن:

$I_{P_2}^0$: تيار نتؤ الأنودي لأكسدة الأكسجين بدون مستخلص العينة.

$I_{P_2}^s$: تيار نتؤ الأنودي لأكسدة الأكسجين بوجود مستخلص العينة.

2.5.VII. دراسة السلوك الكهروكيميائي في وسط عضوي:

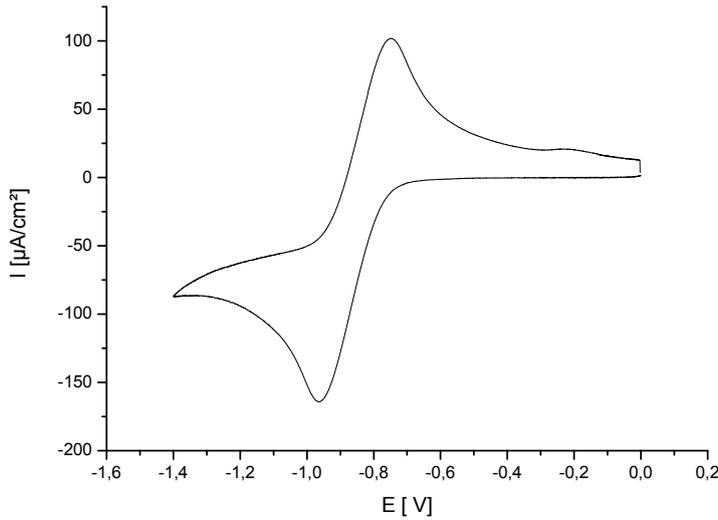
هذه الدراسة أنجزت في مخبر ترقية وتكنولوجيا الموارد الصحراوية (VTRS) في جامعة الوادي، حيث تطرقنا إلى دراسة السلوك الكهروكيميائي للمركبات المدروسة بواسطة الفولطامبيرومتر الحلقي في وسط عضوي المتمثل في N,N-diméthyleformamide (DMF):N، وفي وجود الملح بتركيز 0.1M وذلك فوق مسرى من الكربون الزجاجي (CV) carbone vitreux (CV) ذا قطر 0.1cm (مسرى العمل) أما المسرى المرجعي فهو عبارة عن مسرى الكالومال (ECS) المشبع بـ KCL. قمنا بتحديد مجال الكهروفعالية لأكسدة وإرجاع الأكسجين على قطب الكربون الزجاجي، حيث حدد المجال من (-1400-

إلى 0 mV/ECS في الجهة المهبطية ومن (0 إلى -1400 mV/ECS) في الجهة المصعدية ،
سرعة مسح تساوي 100 mV/s ، في النظام المغلق و النظام المفتوح .

3.5.VII. تحضير المحاليل وطريقة العمل :

نزن 0.988 غ من الملح المستعمل (tetra-n-butylammonium hexafluorophosphate) ونذيبها
في 25 مل من DMF ونضعه في خلية العمل . نقوم بعملية الرج لمدة 5 دقائق وذلك من أجل وفرة في
الأكسجين والعمل على مجانسة المحلول .

نعطي الأمر يبدأ التجربة حيث الشروط محددة مسبقا ، فنحصل على منحني (ملح + DMF) الذي يظهر
نتواالأكسجين الشكل (2).



الشكل (//) فولت متوجر امنتوء الاكسجين في وسط عضوي $V_{DMF} = 25$ مل ، $M_{sel} = 0.988$ غ

✓ في النظام المفتوح يكون الاكسجين في الخلية في اتزان مع الهواء الطلق وتصل اقصى قيمة لكثافة

التيار في الشروط التجريبية الى $i_{O_2} = 14 \mu A / cm^2$.

✓ في النظام المغلق يتم طرد كل الاكسجين (بالنتروجين) من الخلية ثم يتم تشبعها بالأكسجين وتصل

اقصى قيمة لكثافة التيار في الشروط التجريبية الى $i_{O_2} = 100 \mu A / cm^2$.

4.5.VII. دراسة الفعالية المضادة للأوكسدة للمحاليل القياسية في النظام المغلق و المفتوح :

1.4.5.VII دراسة فعالية حمض الغاليك :

نزن 26مغ من حمض الغاليك ونذيبه في حجم 10مل من DMF حيث تحضر بتركيز 2.6مغ/مل .

باستخدام حقنة بحجم 1 مل تتم إضافة محلول حمض الغاليك المحضر تدريجيا بحجوم مختلفة من 0.1 مل إلى 1مل بحيث يتغير التركيز في الخلية عند كل إضافة ونرسم المنحنيات الفولطأمبيرومتريية الحلقية الخاصة بكل إضافة عند نفس الشروط :

- الكمون (E) من (-1400 إلى 0 mV) ويعود من (0 إلى -1400 mV)
- سرعة المسح 100 mV/s.
- درجة الحرارة 25-26 م°

✓ وتتم عملية حساب التراكيز في الخلية كالاتي :

$$C_1 V_1 = C_T V_T$$

$$C_T = \frac{C_1 V_1}{V_T}$$

$$C_T = \frac{2.6 \times 0.1}{25.1}$$

$$C_T = 2.063 \times 10^{-3} \text{ mg/ml}$$

$$C_T = \text{التركيز الكلي في الخلية}$$

$$C_1 = \text{تركيز العينة المضاف}$$

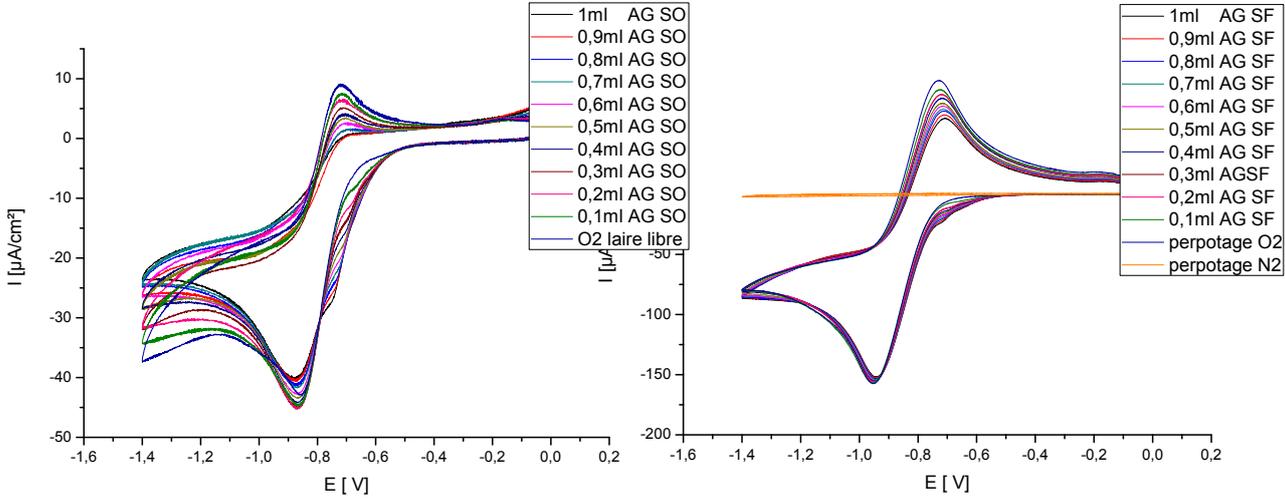
$$V_T = \text{الحجم الكلي في الخلية}$$

$$\text{حجم العينة المضاف} = V_1$$

✓ بنفس الطريقة تتم عملية حساب التركيز بالنسبة لكل حجم مضاف كما هو موضح في الجدول التالي:

$C(\text{mg/ml})$	$V(\text{ml})$
1.036×10^{-2}	0.1
2.063×10^{-2}	0.2
3.083×10^{-2}	0.3
4.094×10^{-2}	0.4
5.098×10^{-2}	0.5
6.094×10^{-2}	0.6
7.088×10^{-2}	0.7
8.062×10^{-2}	0.8
9.035×10^{-2}	0.9
0.1	1

✓ نعطي الأمر ببدأ التجربة حيث الشروط محددة مسبقا، فنحصل على الفولتاموجرام التالي:



الشكل (***) فولتاموجرام تغيرات كمية

الاكسجين على قطب الكربون الزجاجي في DMF بتركيز 0.1M باضافة (0.1→1ml) من حمض الغاليك في النظام المغلق و النظام المفتوح

$$v = 100 \text{mv/s}$$

✓ نلاحظ في الشكل (***) ان الزيادة المنتظمة لتراكيز حمض الغاليك في الخلية متناسبة عكسا مع كمية الاكسجين الموجودة حيث نلاحظ منحنيات فولطامبيرومتريية متناقصة بانتظام مما يدل على دقة الطريقة ونلاحظ ان إضافة 1مل من حمض الغاليك امتص كمية كبيرة من الأكسجين مما يدل على فعاليته في تثبيط الاكسجين .

➤ رسم المنحنى القياسي:

بعد رسم المنحنيات الفولطامبيرومتريية الحلقية للتراكيز، نقوم بتحديد كثافة التيار المصعدية

لكل فولتاموجرام لرسم منحنى قياسي لحمض الغاليك بدلالة التركيز $i_p = f(C)$.

C: تركيز حمض الغاليك (mg/ml).

i_p : كثافة التيار المصعدية [$\mu A/cm^2$].

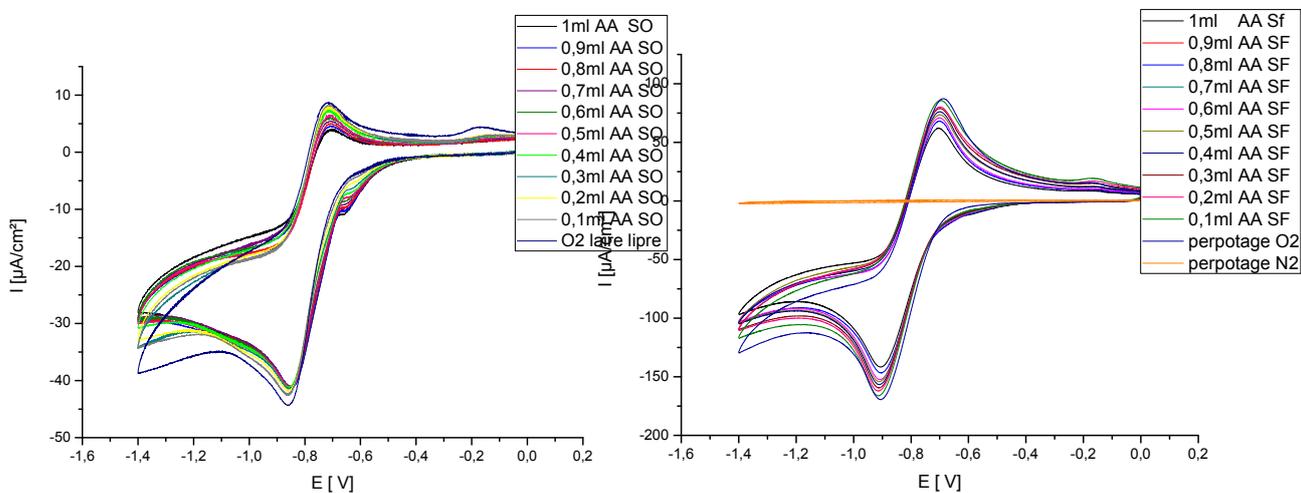


الشكل (//) المنحنى القياسي لحمض الغاليك في النظام المغلق (◇) و النظام المفتوح (◇)

$$i_p = f(C)$$

نلاحظ أن نتائج المنحنى القياسي لحمض الغاليك جاءت دقيقة بحيث بلغ ($R^2=0,9945$) و هو ما يجعل هذه التقنية دقيقة من حيث النتائج المستخرجة من هذه المنحنيات ونلاحظ انه كلما يزيد تركيز حمض الغاليك في الخلية تقل كمية الاكسجين المتواجدة.

2.4.5.VII. دراسة فعالية حمض الاسكوريك :



يحضر بنفس الطريقة السابقة لحمض الغاليك ويعامل بنفس الطريقة نتحصل على المنحنيات التالية:

الشكل (***) فولتاموغرام تغيرات كمية الاكسجين على قطب الكربون الزجاجي في DMF بتركيز 0.1M باضافة (0.1→1ml) من حمض الاسكوريك في النظام المغلق و النظام المفتوح

$$. v = 100mv/s$$

➤ رسم المنحنى القياسي:

نقوم بتحديد كثافة التيار المصعدية لكل منحنى حتى نحصل على منحنى قياسي لحمض الاسكوريك

$$. p = f(C)$$

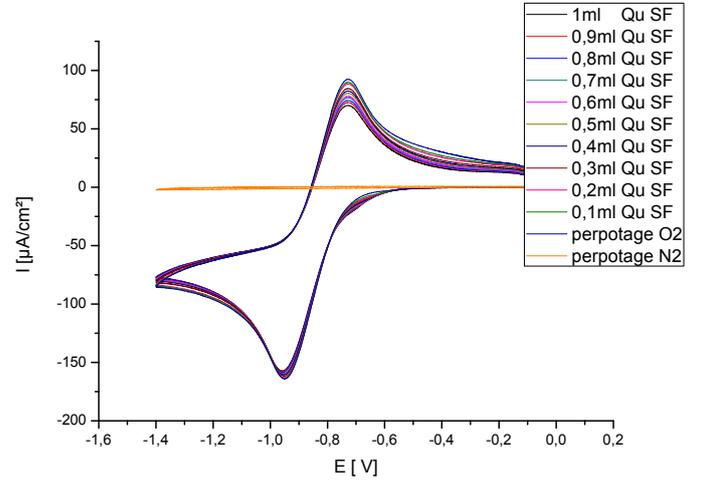
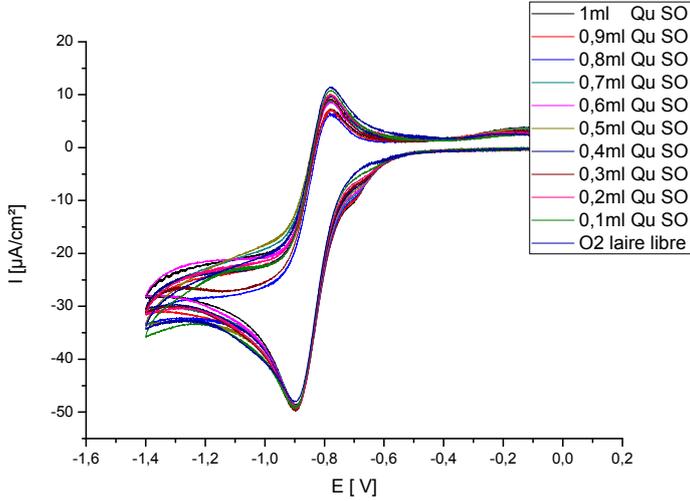


الشكل (//) المنحنى القياسي لحمض الاسكوريك في النظام المغلق (■) و النظام المفتوح (■)

$$i_p = f(C)$$

نلاحظ أن المنحنى القياسي لحمض الاسكوريك كان دقيق بحيث بلغ ($R^2=0,985$).

3.4.5.VII. دراسة فعالية الكريستين :



➤ الشكل (***) فولتاموغرام تغيرات كمية الاكسجين على قطب الكربون الزجاجي في DMF بتركيز 0.1M باضافة (0.1→1ml) من الكريستين في النظام المغلق و النظام المفتوح
 ➤ $v = 100\text{mv/s}$

➤ رسم المنحنى القياسي:

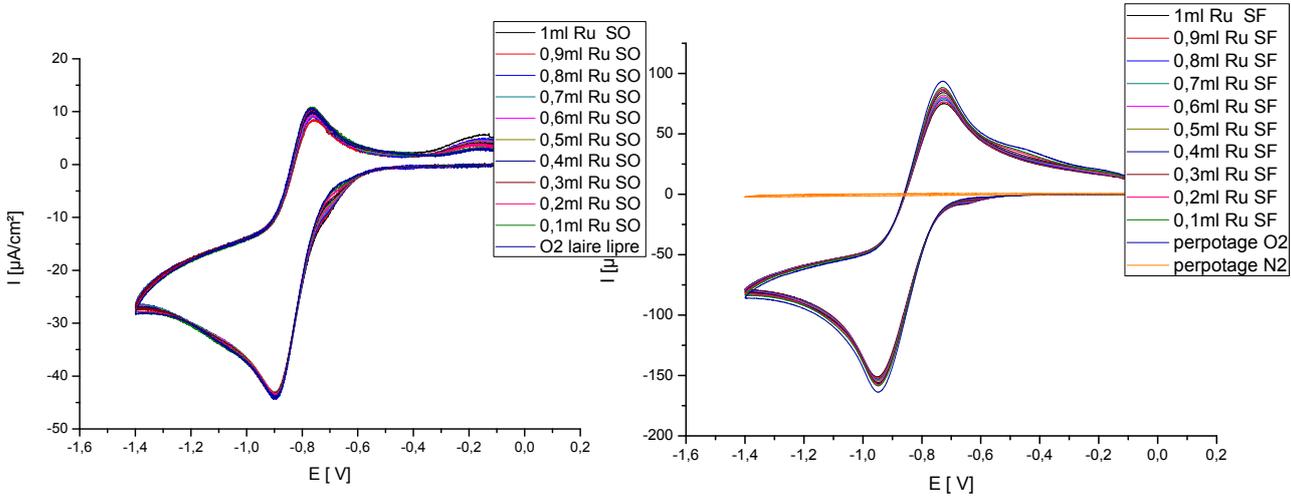
نقوم بتحديد كثافة التيار المصعدية لكل منحنى حتى نحصل على منحنى قياسي للروتين بدلالة التركيز $i_p = f(C)$.



الشكل (//) المنحنى القياسي للكرستين في النظام المغلق (■) و النظام المفتوح (■)

$$i_p = f(C)$$

4.4.5.VII. دراسة فعالية الروتين :



الشكل (***) فولتاموغرام تغيرات كمية الاكسجين على قطب الكربون الزجاجي في DMF بتركيز

0.1M باضافة (0.1→1ml) من الروتين في النظام المغلق و النظام المفتوح

$$. v = 100mv/s$$

➤ رسم المنحنى القياسي:

نقوم بتحديد كثافة التيار المصعدية لكل منحنى حتى نحصل على منحنى قياسي للروتين بدلالة التركيز $i_p = f(C)$.

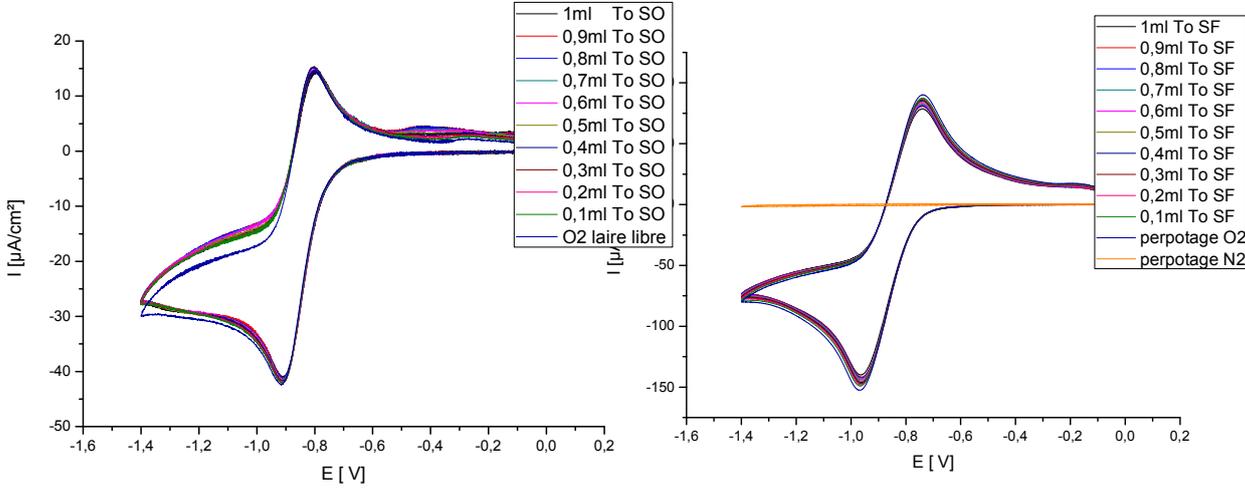


الشكل (//) المنحنى القياسي للروتين في النظام المغلق (■) و النظام المفتوح (□)

$$i_p = f(C)$$

نلاحظ أن المنحنى القياسي للروتين كان دقيق بحيث بلغ $(R^2=0,9978)$.

5.4.5.VII. دراسة فعالية الطوكوفيرول :



➤ الشكل (***) فولتاموغرام تغيرات كمية الاكسجين على قطب الكربون الزجاجي في DMF بتركيز 0.1M باضافة (0.1 → 1ml) من دلتا طوكوفيرول في النظام المغلق و النظام المفتوح

➤ $v = 100mv/s$

➤ رسم المنحنى القياسي:

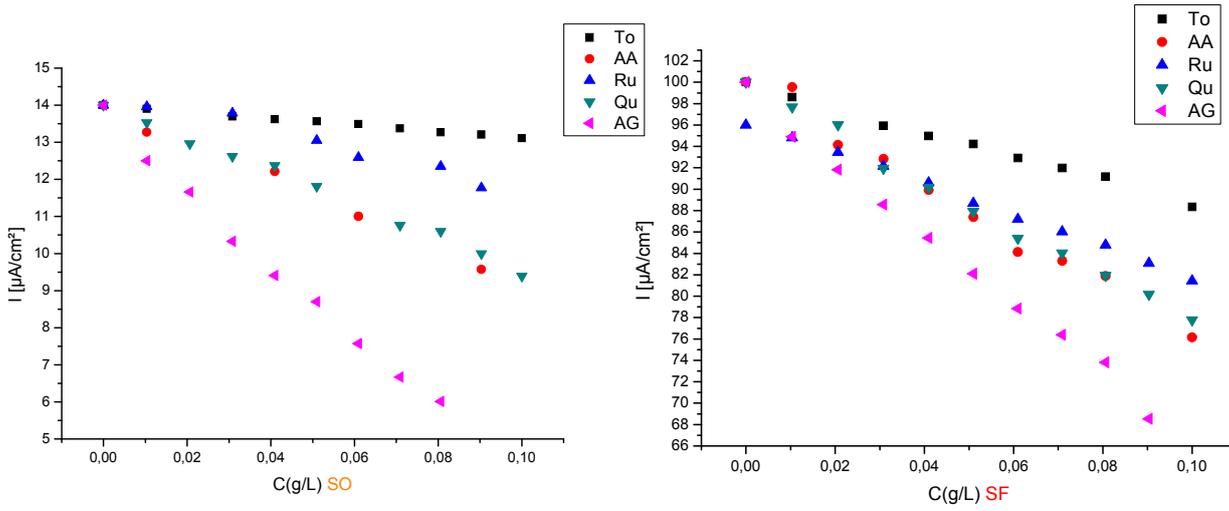
نقوم بتحديد كثافة التيار المصعدية لكل منحنى حتى نحصل على منحنى قياسي للطوكوفيرول بدلالة

التركيز $i_p = f(C)$.

الشكل (//) المنحنى القياسي دلتا طوكوفيرول في النظام المغلق (■) و النظام المفتوح (■)

$$i_p = f(C)$$

نلاحظ أن المنحنى القياسي للطوكوفيرول كان دقيق بحيث بلغ $(R^2=0,995)$.



الشكل (//) مقارنة فعالية المحاليل القياسية في النظام المغلق (SF) و النظام المفتوح (SO)

$$F = f(C)$$

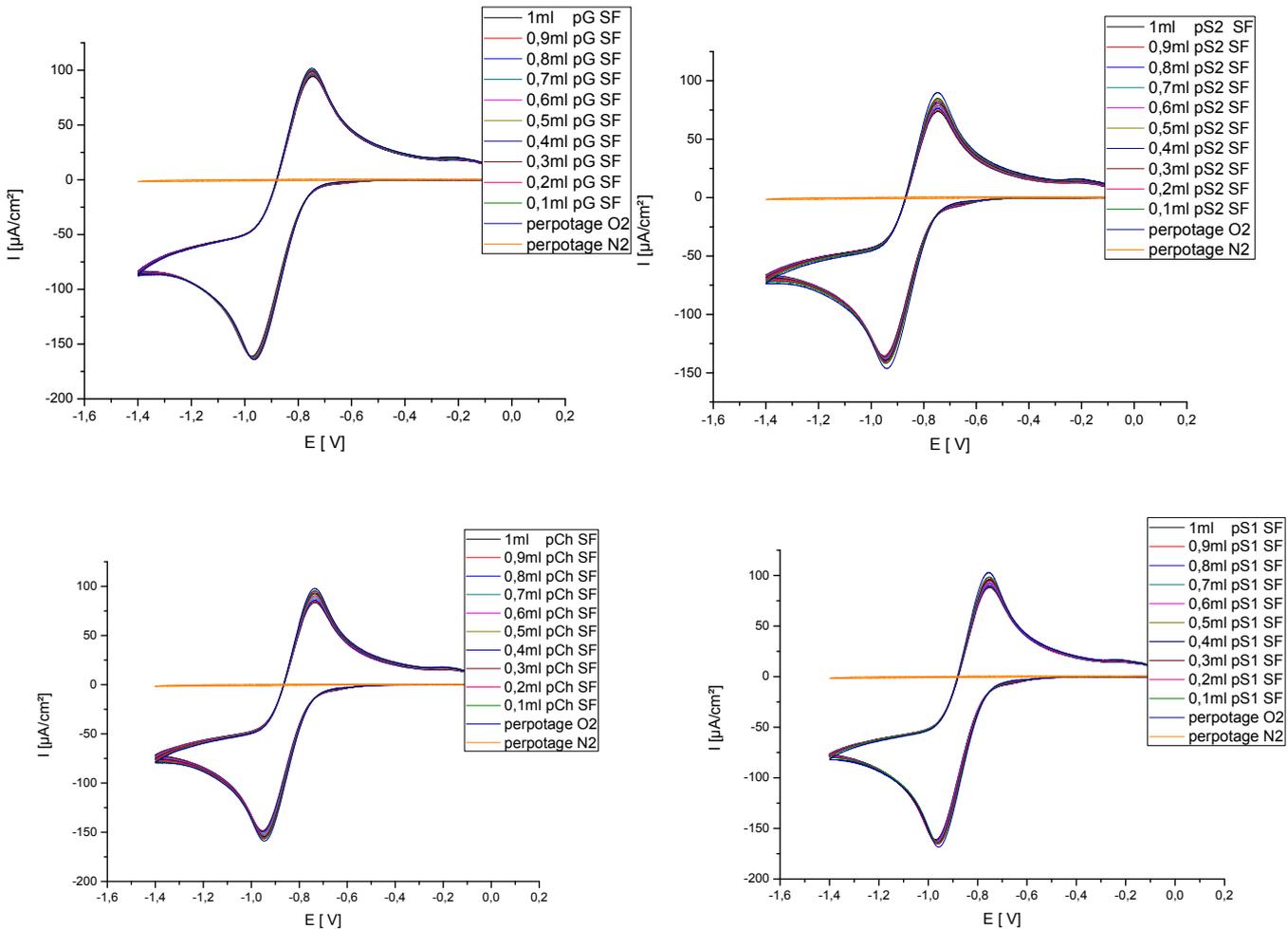
الجدول () مقارنة ميل المنحنيات القياسية في النظام المغلق و النظام المفتوح

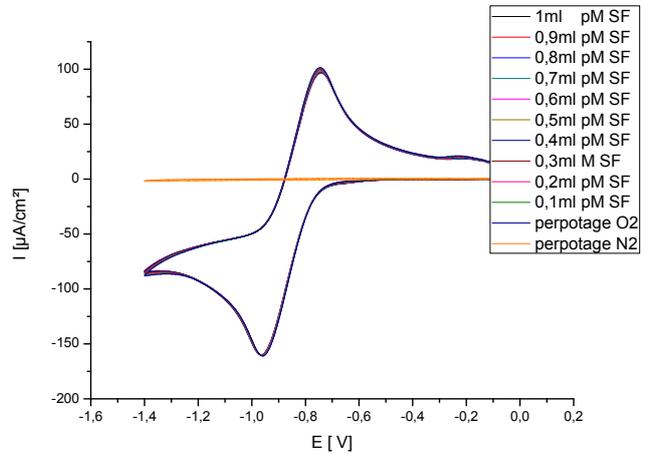
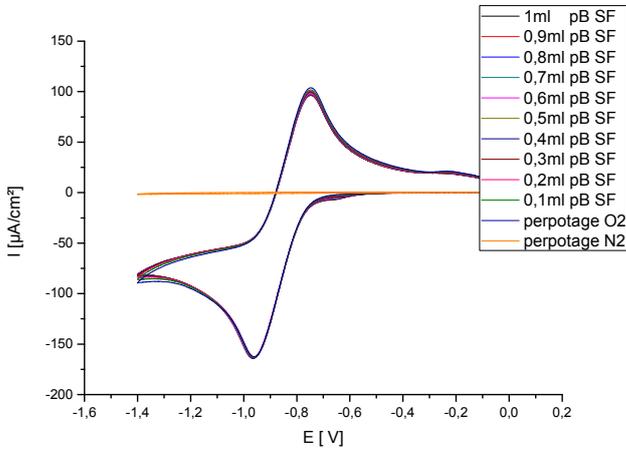
المركب	●	حمض الغاليك	●	حمض	●	الكريستين	●
				الاسكريك			
الميل SF	●	-309.19	●	-241.62	●	-221.99	●
الميل SO	●	-98.037	●	-44.568	●	-47.831	●

- ✓ من خلال مقارنة الميل للمحاليل القياسية نحدد الاكثر فعالية والواضح ان المركب الاكثر فعالية هو حمض الغاليك ثم حمض الاسكوربيك، الكرسيتين، الروتين و دلتا طوكوفرول على الترتيب في النظام المغلق و المفتوح حيث تتناسب الفعالية المضادة للأوكسدة عكسا مع قيمة الميل .
- ✓ من خلال مقارنة الميل في النظامين نستنتج ان النظام المغلق اقل ميل أي اكثر فعالية .
- 5.5.VII. دراسة الفعالية المضادة للأوكسدة للعينات في النظام المغلق والمفتوح :**

بنفس الطريقة و تحت نفس الشروط السابقة التي تعاملنا بها مع المحاليل القياسية نعامل مستخلصات البروبوليس المختلفة و نرسم المنحنيات الفولطأمبيرومترية الحلقية لتحديد الفعالية المضادة للأوكسدة.

1.5.5.VII دراسة فعالية عينات البروبوليس :





الشكل (***) فولتاموغرام تغيرات كمية الاكسجين على قطب الكربون الزجاجي في DMF بتركيز 0.1M باضافة (0.1→1ml) من كل عينة بروبوليس في النظام المغلق و النظام المفتوح

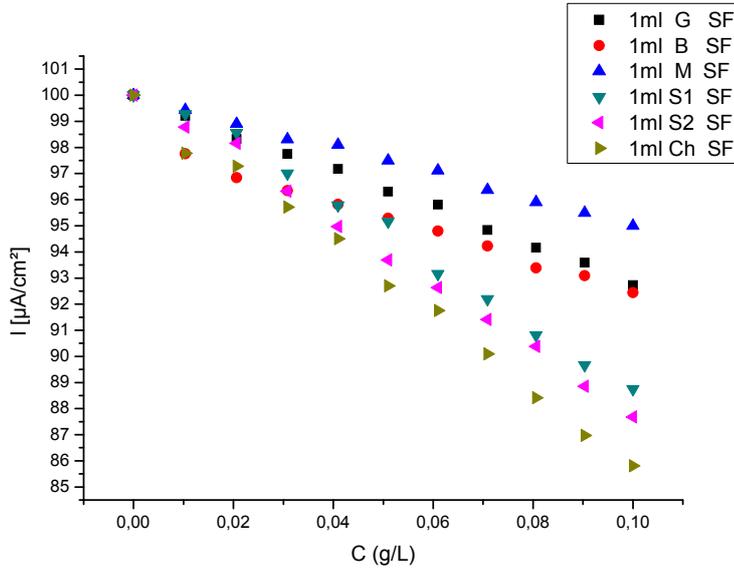
$$v = 100 \text{mv/s}$$

المنحنيات القياسية

الشكل () منحنيات تغيرات فعالية مضادات الاكسدة , كثافة التيار (i) بدلالة التركيز (C) لعينات البروبوليس المدروسة $S_1(\blacksquare)$, $S_2(\blacksquare)$, M(\blacksquare), G(\blacksquare), B(\blacksquare), Ch(\blacksquare)







الجدول (8.V): قيم الميل لعينات البروبوليس

pG	Pm	pB	pCh	pS_2	pS_1	العينة
-71.352	-49.62	-57.311	-140.69	-124.38	-114.71	الميل
0.9980	0.9967	0.9955	0.9957	0.9974	0.9982	R^2

✓ من خلال مقارنة قيم الميل لعينات البروبوليس نحدد الأكثر فعالية منها حيث تتناسب الفعالية المضادة للأوكسدة عكسا مع قيمة الميل ونستنتج ان عينات البروبوليس ذات فعالية مضادة للأوكسدة حيث ترتب فعالية المركبات كالاتي $pM < pB < pG < pS_1 < pS_2 < pCh$.

الفصل الثامن

نتائج و مناقشة

1.2.2.V الدراسة الكهروكيميائية للمستخلصات:

تحت نفس الشروط السابقة التي تعاملنا بها مع حمض الأسكروبيك عملنا مستخلصات البروبوليس لمختلف المناطق حيث قمنا برسم المنحنيات الفولطأمبيرومتريية الحلقية (CV) والمنحنيات الموجة المربعة (SWV) بحيث نضع كمية محددة من المستخلص موضحة في الفصل السابق المتمثلة في المنحنيات (13.IV) و(14.IV), وكذلك من خلال المنحنيات (a15.IV) و (b15.IV) ثبت أن لكل مستخلص من مستخلصات البروبوليس خصائصه الكهروكيميائية وهذا ما يسهل علينا مقارنة هذه الخصائص وربطها بموضوع الدراسة, إذ يأتي بروبوليس بومرداس أولاً يليه غرداية ثم بجاية ومستغانم وهي نتائج معقولة تطابق نتائج السابقة.

1. تقدير الفاعلية المضادة للأكسدة للمستخلصات بأخذ حمض الأسكروبيك كمركب قياسي:

اعتمدنا في هذه الدراسة الطرق الكهروكيميائية حيث تم تطبيق تقنيات (CV) و(SWV) لتقدير الفعالية المضادة للأكسدة, والتي تتميز بسهولة وفعاليتها ومدى حساسيتها, وباستعمال حمض الاسكروبيك كفينول مرجعي, حيث أظهر هذا التحليل أن كثافة التيار تتناسب طرذاً مع تركيز حمض الاسكروبيك والمنحنى (a11.V) و(b11.V) بشكل خطي ($R^2=0.994$) عند التقنية (CV) أما بالنسبة لتقنية (SWV) بلغت دقتها ($R^2=0.993$) وهو يعبر عن المحتوى المضاد للأكسدة في كل مستخلص بعدد (mg) لكل 1g من الوزن الجاف للعينة.

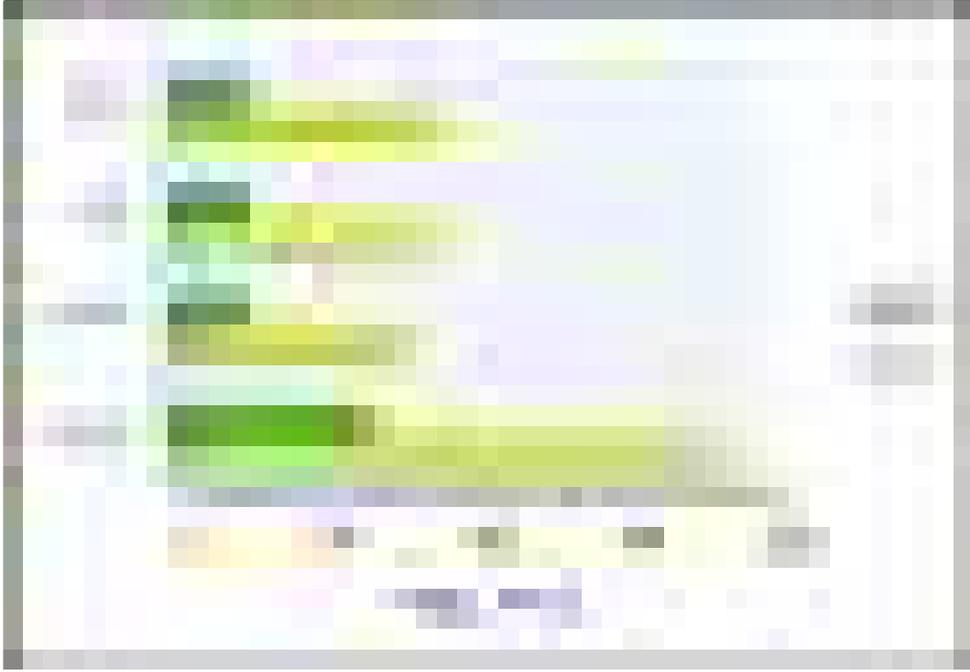
دونا النتائج المتحصل عليها في الجدول (7. V) و(8. V) التالي:

الجدول (7.V): جدول لنتائج تقدير الفعالية المضادة للأوكسدة بأخذ المنحني القياسي لحمض الأسكروبيك بدلالة كثافة التيار بتطبيق تقنية (CV).

العينة	المستخلصات الميثانولية	الفعالية المضادة للأوكسدة المكافئة (AA) بـ (mg/g)
R _B	بومرداس	177.251*
R _M	مستغانم	74.568
R _{BJ}	بجاية	81.794
R _G	غرداية	82.617

الجدول (8.V): جدول لنتائج تقدير الفعالية المضادة للأوكسدة بأخذ المنحني القياسي لحمض الأسكروبيك بدلالة كثافة التيار بتطبيق تقنية (SWV).

العينة	المستخلصات الميثانولية	الفعالية المضادة للأوكسدة المكافئة (AA) بـ (mg/g)
R _B	بومرداس	62.688*
R _M	مستغانم	22.197
R _{BJ}	بجاية	22.754
R _G	غرداية	23.062



المنحنى (13.V): مقارنة نتائج الفعالية المضادة للأوكسدة بدلالة كثافة التيار بالطرق الكهروكيميائية لـ (AA).

● مناقشة النتائج:

من خلال النتائج المدونة في الجدولين (7.V) و (8.V) أعلاه و الممثلة بالمنحنى (13.V) يمكن أن نستنتج ما يلي:

إن الفعالية المضادة للأوكسدة لبروبوليس بومرداس هي مرتفعة نسبيا بالمقارنة بباقي العينات فقد بلغت (177.251 mg/g) بينما كانت قيم فعالية المضادة للأوكسدة لبروبوليس غرداية و بجاية متقاربة حيث لم يتجاوزا (82.617 mg/g) و (81.794 mg/g) على الترتيب، أما بروبوليس مستغانم فقد كان الأقل من ناحية الفعاليته إذ لم تتجاوز نصف فعالية بروبوليس بومرداس قدرت بـ (74.568 mg/g). أما عند تقدير الفعالية بدلالة المنحنى القياسي لكثافة التيار بتقنية (SWV) فإن الترتيب يبقى كما هو عليه ما عد القيم التي جاءت في معظمها تقارب ثلث قيم النتائج المتحصل عليها من المنحنى القياسي الأول المطبق بتقنية الفولتأميبرومتري الحلقي (CV)، حيث بلغت فعالية بروبوليس بومرداس (62.688 mg/g) كأكبر قيمة ولم تتجاوز فعالية بروبوليس مستغانم (22.197 mg/g) كأقل قيمة.

نستطيع هنا الحكم على اقرب القيم للفعالية الحقيقية للمستخلصات حتى ولو لم يتم دراسة هذه المستخلصات بواسطة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) حسب ما قام به الباحثون في بداية أبحاثهم ووجدا أن اقرب القيم هي تلك التي اخذ فيها المنحني القياسي المطبق بتقنية الفولتأميرومترى الحلقي وقد كانت هذه التقنية أدق من تقنية الفولتأميرومترى (SWV).

رغم الفروق في الفعالية المضادة للأكسدة لمستخلصات البروبوليس إلا إن النتائج المتحصل عليها تظهر جليا أنها قيم معتبرة.

2. تقدير الفاعلية المضادة للأكسدة للمستخلصات بأخذ حمض الغاليك كمركب قياسي:

تم تقدير الفعالية المضادة للأكسدة للمستخلصات الميثانولية, وباستعمال حمض الغاليك كفينول مرجعي، حيث أظهر هذا التحليل أن كثافة التيار تتناسب طرذا مع تركيز GA الموضحة في المنحنيات (a12.V) و (b12.V) بشكل خطي حيث بتطبيق تقنية (CV) بلغت دقتها ($R^2=0.998$), أما باستخدام تقنية (SWV) ($R^2=0.996$) وهو يعبر عن المحتوى المضاد للأكسدة في كل مستخلص بعدد (mg) لكل 1g من الوزن الجاف للعينة.

دونا النتائج المتحصل عليها في الجدول (9. V) و (10. V) التالي:

الجدول (9.V): جدول لنتائج تقدير الفعالية المضادة للأكسدة بأخذ المنحني القياسي لحمض الغاليك بدلالة كثافة التيار بتطبيق تقنية (CV).

العينة	المستخلصات الميثانولية	الفعالية المضادة للأكسدة المكافئة (GA) بـ (mg/g)
R _B	بومرداس	104.897*
R _M	مستغانم	43.984
R _{BJ}	بجاية	48.351
R _G	غرداية	48.559

الجدول (10.V): جدول لنتائج تقدير الفعالية المضادة للأكسدة بأخذ المنحني القياسي لحمض الغاليك بدلالة كثافة التيار بتطبيق تقنية (SWV).

العينة	المستخلصات الميثانولية	الفعالية المضادة للأكسدة المكافئة (GA) بـ (mg/g)
R _B	بومرداس	58.609*
R _M	مستغانم	23.240
R _{BJ}	بجاية	24.727
R _G	غرداية	27.127



المنحني (14.V): مقارنة نتائج الفعالية المضادة للأكسدة بدلالة كثافة التيار بالطرق الكهروكيميائية لـ (GA).

مناقشة النتائج:

من خلال النتائج المدونة في الجدولين (7.V) و (8.V) أعلاه و الممثلة بالمنحنى (14.V) يمكن أن نستنتج ما يلي:

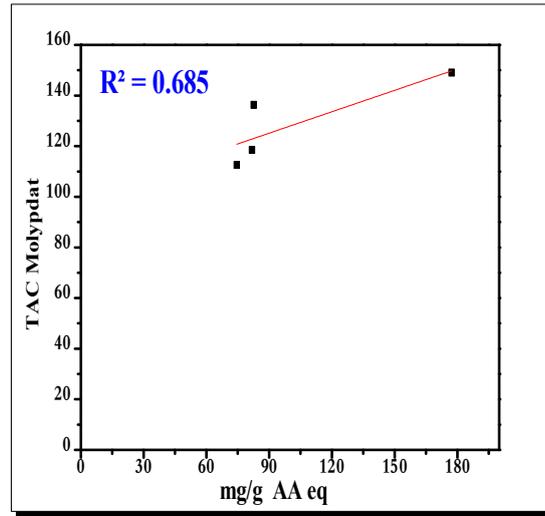
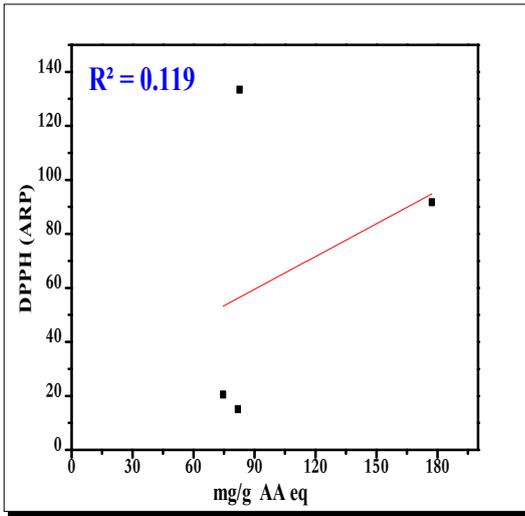
من الواضح في الجدولين (9.V) و (10.V) والمنحنى (13.V) إن الفعالية المضادة للأكسدة لمستخلصات البروبوليس في هذا الجزء جاءت متقاربة بتطبيق تقنية الفولتأمبيرومترى الحلقي فقد بلغت قيمتها القصوى (104.897 mg/g) من اجل مستخلص بومرداس بينما كانت (27.127 mg/g) لغرداية، ولم تتجاوز قيم بجاية ومستغانم (48.351 mg/g) و(43.984 mg/g) على التوالي.

أما عند تطبيق الفولتأمبيرومترى الموجة المربعة فإن الترتيب يبقى كما هو عليه ما عد القيم التي جاءت في معظمها تقارب نصف قيم النتائج المتحصل عليها من المنحنى القياسي الأول المطبق بتقنية الفولتأمبيرومترى الحلقي (CV)، حيث بلغت فعالية بروبوليس بومرداس (58.609 mg/g) كأكبر قيمة ولم تتجاوز فعالية بروبوليس مستغانم (23.240 mg/g) كأقل قيمة.

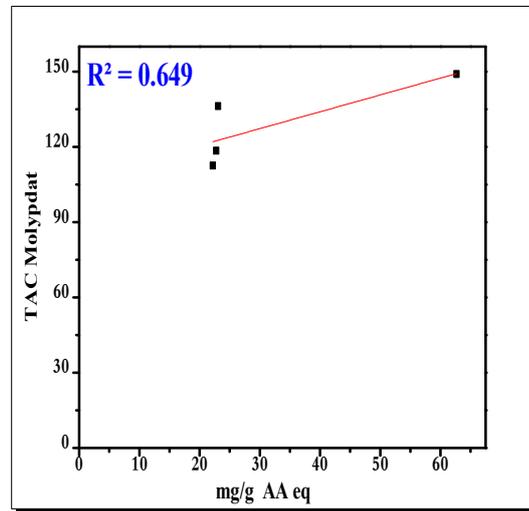
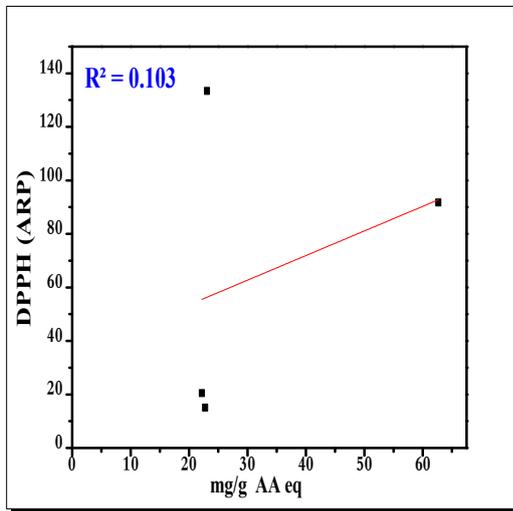
أن السبب في اختلاف النتائج المتحصل عليها بـ (AA) و (GA) هو الاختلاف في الوسط والشروط التي وضع فيها كل من المركبين، مثل الحموضة ومجال المسح.

3. مقارنة النتائج:

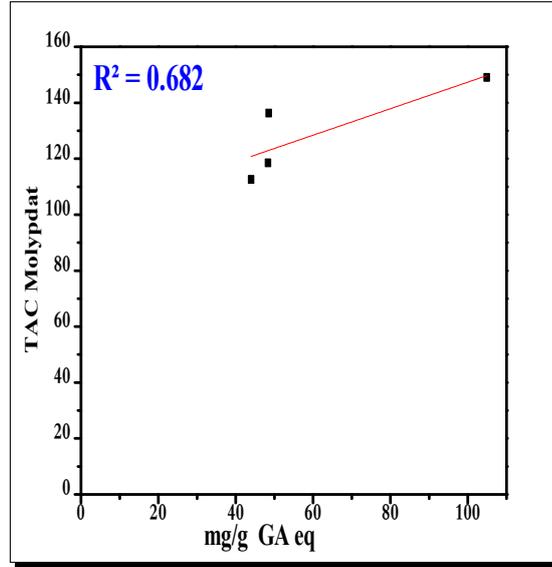
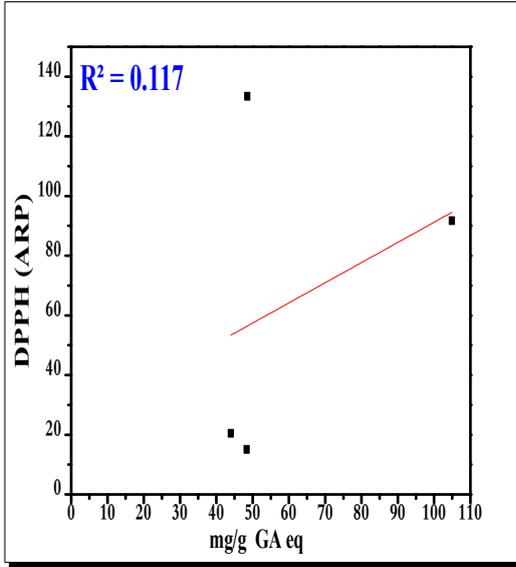
من اجل الخروج بنتائج مقنعة من حيث اعتماد الطريقة الفولتأمبيرومترية الحلقيّة (CV) والموجة المربعة (SWV) كطريقة لتقييم الفعالية المضادة للأكسدة تمت مقارنة النتائج المتحصل عليها والتي تمثل نتائج الطرق الطيفية بهذه النتائج والتي هي نتائج الطريقة الفولتأمبيرومترية الحلقيّة والموجة المربعة وذلك بناء على مدى الترابط بين هاته النتائج.



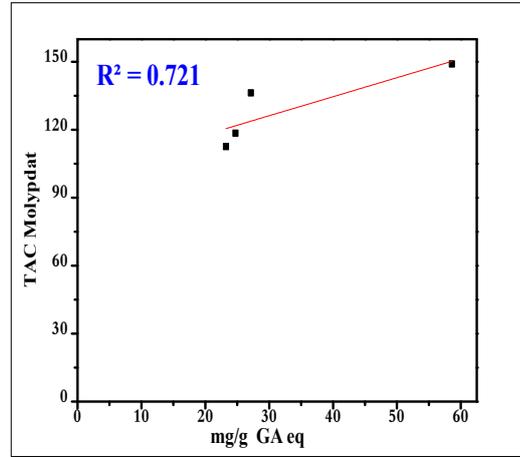
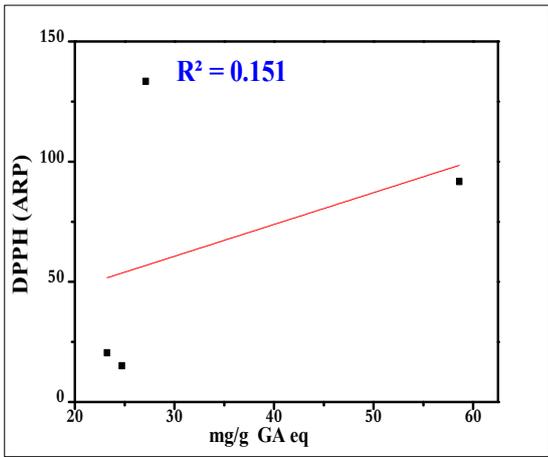
المنحنى (15.V): يوضح علاقة الارتباط بين نتائج اختبار التقدير الفولطأمبيرومترى الحلقي (CV) واختباري DPPH واختبار الموليبيدات للمستخلصات بدلالة كثافة التيار لـ (AA).



المنحنى (16.V): يوضح علاقة الارتباط بين نتائج اختبار التقدير الفولطأمبيرومترى (SWV) واختباري DPPH واختبار الموليبيدات للمستخلصات بدلالة كثافة التيار لـ (AA).



المنحنى (17.V): يوضح علاقة الارتباط بين نتائج اختبار التقدير الفولطأمبيرومترى الحلقي (CV) واختباري DPPH واختبار الموليبيدات للمستخلصات بدلالة كثافة التيار لـ (GA).



المنحنى (18.V): يوضح علاقة الارتباط بين نتائج اختبار التقدير الفولطأمبيرومترى (SWV) واختباري DPPH واختبار الموليبيدات للمستخلصات بدلالة كثافة التيار لـ (GA).

يظهر من المنحنيات أعلاه إن هناك علاقة ترابط بين الطرق الفولطأمبيرومترية الحلقيّة (CV) و (SWV) والطرق الطيفية المتمثلة في اختباري (DPPH) والموليبيدات (TAC) حيث أن:

أكبر ترابط وجد بين الطريقة الفولطأمبيرومترى الحلقيّة (CV) واختبار الموليبيدات (TAC) في حالة اخذ حمض الاسكوريبيك كأساس مرجعي ($R^2=0.685$)، أما علاقة الترابط بين الطريقة

الفولطأمبيرومترية الحلقية (CV) واختبار (DPPH) فقد كانت أقل ما يمكن حيث بلغت ($R^2=0.119$)، أما بالنسبة لعلاقة الترابط بين الطريقة الفولطأمبيرومترية (SWV) واختبار (DPPH) في حالة المنحنى القياسي لـ (AA) لم تتجاوز ($R^2=0.103$)، لكن كانت علاقة الارتباط أكبر ما يمكن بين الطريقة الفولطأمبيرومترية (SWV) واختبار (TAC) حيث وصلت قيمتها ($R^2=0.649$).

بأخذ حمض الغاليك كأساس مرجعي قدرت علاقة الارتباط بين (CV) و (DPPH) بـ ($R^2=0.117$) وكانت أقل ما يمكن على العكس من علاقة الارتباط بين (CV) و (TAC) حيث بلغت قيمتها ($R^2=0.682$)، أما بالنسبة للتقنية الموجة المربعة فقد كانت علاقة الارتباط أكبر ما يمكن بينها وبين (TAC) حيث تجاوزت ($R^2=0.721$)، أما بالنسبة لعلاقة الارتباط بين (SWV) و (DPPH) كانت ضعيفة نسبياً و قدرت بـ ($R^2=0.151$).

من خلال هذه النتائج نستطيع أن نقول أن هناك علاقة ترابط قوية بين الطرق الكهروكيميائية والطرق الطيفية خاصة اختبار الموليبيدات (TAC) وهذا ما يشجع على التوجه نحو هذه الطريقة كطريقة تعطي نتائج سريعة و أقل تكلفة، ومبدئياً يمكننا الحكم بأن أدق طريقة هي الطريقة الفولطأمبيرومترية الحلقية (CV) و (SWV) وهذا يبقى محصور على مستوى هذه الدراسة إلى أن يتم إجراء دراسات أخرى تساهم في تطوير و تأكيد النتائج المتحصل عليها.

الفولطأمترية للأكسجين بوجود المستخلصات البروبوليس :

2-2-3-V تحديد إجمالي الفعالية المضادة للأكسدة بحساب المقدار TAC:

بنفس الطريقة التي قدرت بها الفعالية المضادة للأكسدة الكلية (TAC) للمركبات القياسية نحسب قدرة عينات البروبوليس بتركيز (0.1g/l) على تثبيط الجذور الحرة.

الجدول (10.V): تقدير فعالية مضادات الأكسدة للعينات البروبوليس (TAC)

TAC	ip_{as}	ip_{a0}	المركب
11.250%	88.750	100	pS_1
12.315%	87.685	100	pS_2
14.187%	85.813	100	pCh
7.5630%	92.437	100	pB
5.0010%	94.999	100	Pm
7.7810%	92.219	100	pG



المنحنى (10.V): تغيرات (TAC) لعينات البروبوليس

✓ من خلال تحديد (TAC) نسبة تثبيط العينات للجذر الحر نلاحظ ان فعالية العينات بتركيز (0.1g/l) المضادة للأوكسدة معتبرة و تختلف فيما بينها .حيث في عينات البروبوليس تصل اعلى نسبة لتثبيط الجذر الحر الى (14.187%) .

المراجع

- [1]. Hammond, G. E., Pamela, White, J., (2011): A Brief History of Lipid Oxidation. *J Am Oil Chem Soc.* 88:891-897.
- [2]. Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M., (2001): Antioxidants in food First. published, Wood head Publishing Ltd and CRC Press LLC.
- [3]. Ferrari, C. K. B., (2007): Functional foods and physical activities in health promotion of aging people. *Maturitas*, 58: 327-339.
- [4]. Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., (1999): Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd ed., Oxford University Press: New York, USA, pp 10-121.
- [5]. Albert, C. J., Crowley, J. R., Hsu, F-F., Thukkani, A. K., Ford, D. A., (2001): Reactive chlorinating species produced by myeloperoxidase target the vinyl ether bond of plasmalogens. *J Biol Chem*, 276:23733-41.
- [6]. Fang, Y., Yang, S., Wu, G., (2002): Free Radicals Antioxidant and Nutrition, *Nutrition*, 18: 872-879.
- [7]. Pham-Huy, L. A., He, H., Pham-Huy, C., (2008): Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int. J. Biomed. Sci*, 4: 89-96.
- [8]. Halliwell, B., (1997): Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutr. Rev*, 55: 44-52.
- [9]. Lichtenthaler, R., Marx, F., Kind, O. M., (2003): Determination of antioxidative capacities using an enhanced capacity (TOSC) assay. *Eur. Food Res. Technol*, 216:166-173.
- [10]. Poli, G., Leonarduzzi, G., Biasi, F., Chiarpotto, E., (2004): Oxidative stress and cell signalling. *Curr. Med. Chem*, 11: 1163-1182
- [11]. Abdel-Hameed, E. S. S., (2009): Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian Ficus species leaf samples. *Food Chem*, 114: 1271-1277.
- [12]. Ames, B. N., (1979): Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer. *Science*, 204: 587-593.
- [13]. Halliwell, B., (1996): Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. *Free Radical Research*, 25: 57-74.
- [14]. Diaz, M. N., Frei, B., Vita, J. A., & Keaney, J. F., (1997): Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *N. Engl. J. Med*, 337: 408-416.
- [15]. Aruoma, O. I., (1998): Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *J.Am. Oil. Chem. Soc*, 75: 199-212.
- [16]. Baublis, A. J., Clydesdale, E. M., & Decker, E. A. (2000): Antioxidants in wheat-based breakfast cereals. *Cereal Foods World*, 45: 71-74.
- [17]. Lachance, P. A., Nakat, Z., Jeong, W.S., (2001): Antioxidants:an integrative approach. *Nutrition*, 17: 835-8.
- [18]. Benzie, I. F. F., (2003): Evolution of dietary antioxidants. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 136: 113-26.
- [19]. Ferrari, C. K. B., Torres, E. A. F. S., (2003): Biochemical pharmacology of functional foods and prevention of chronic diseases of aging. *Biomed. Pharmacother*, 57:251-260.
- [20]. Willcox, J. K., Ash, S. L., Catignani, G. L., (2004): Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*, 44:275-95.
- [21]. Opara, E. C., and Rockway, S. W., (2006): Antioxidants and Micronutrients. *Dis*

Mon, 52:151-163.

- [22]. Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C., (2007): Free Radicals in Biology and Medicine (4th ed.). Oxford, UK: Clarendon Press.
- [23]. Seifried, H. E., Anderson, D.E., Fisher, E.I., Milner, J.A., (2007): review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J. Nutr. Biochem*, 8: 567-79.
- [24]. de Magalhães, J. P., and Church, G.M., (2006): Cells discover fire: Employing reactive oxygen species in development and consequences for aging. *Experimental Gerontology*, 41:1-10.
- [25]. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., Telser, J., (2007): Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Review. *Int. J. Biochem. Cell Biol*, 39: 44-84.
- [26]. Sen, S., Chakraborty, R., Sridhar, C., Reddy, Y. S. R., D., B., (2010): Free Radicals, Antioxidants, Diseases And Phytomedicines: Current Status And Future Prospect. *Int. J. Pharm. Sci. Review. Res*, 3: 91-100.
- [27]. Frankel, E. N., Lipid Oxidation. *Pray. Lipid Res. Vol* 19. pp. 1-22 .Pergamon Press Ltd 1980. Printed in Great Britain.
- [28]. Russell, G. A., (1957): Deuterium-isotope effects in the autoxidation of aralkyl hydrocarbons. Mechanism of the interaction of peroxy radicals, *J. Am. Chem. Soc*, 79: 3871-3877.
- [29]. Howard, J. A., and Ingold, K. U., (1968): The self-reaction of sec-butyl-peroxyl radicals: confirmation of the Russell mechanism. *J. Am. Chem. Soc*, 90: 1056-1058.
- [30]. Ďuračková, Z., (2008): Oxidants, antioxidants and oxidative stress. In: Mitochondrial Medicine. Mitochondrial Metabolism, Diseases, Diagnosis and Therapy. A Gvozdjáčková (ed), Springer, Amsterdam, pp 19-49.
- [31]. Ursini, F., Tubaro, F., Rong, J., and Sevanian, A., (1999): Optimization of nutrition: Polyphenols and vascular protection. *Nutrition Reviews*, 57: 241-249.
- [32]. Oliboni, L. S., Dani, C., Funchal, C., Henriques, J. A., and Salvador, M., (2011): Hepatoprotective, cardioprotective, and renal-protective effects of organic and conventional grapevine leaf extracts (*Vitis labrusca* var. Bordo) on Wistar rat tissues. *An.Braz. Acad. Sci*, 83: 1403-1411.
- [33]. B. Halliwell, J. Gutteridge (Eds.), Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford University Press, New York, 1999, pp. 105–245.
- [34]. Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., and Kalayci, O., (2012): Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal*, 5: 9-19.
- [35]. Wang, W., Ballatori, N., (1998): Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. *Pharmacol Rev*, 50: 335-356.
- [36]. Larson, R. A., (1988): The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, 27: 969-978.
- [37]. Shahidi, F., Janitha, P. K., & Wanasundara, P. D. (1992): Phenolic antioxidants. *Critical Reviews of Food Science & Nutrition*, 32: 67-103
- [38]. Osawa, T. (1994): Novel natural antioxidants for utilization in food and biological systems. In I. Uritani, V. V. Garcia, & E. M. Mendoza (Eds.), Postharvest biochemistry of plant food-materials in the tropics (pp. 241-251). Tokyo, Japan: Japan Scientific Societies Press.
- [39]. Mark Percival. (1998): “Antioxidants”. *Clinical Nutrition Insights*, 31: 01-04.

- [40]. Shahidi, F., (2000): Antioxidants in food and food antioxidants. *Nahrung*, 44: 158-163.
- [41]. Javanmardi, J., Stushnoff, C., Locke, E., Vivanco, J. M., (2003): Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. *Food Chemistry*, 83: 547-550.
- [42]. Pala, F. S., and Gürkan, H., (2008): The role of free radicals in ethiopathogenesis of diseases. *Advances in Molecular Biology*, 1: 1-9.
- [43]. Chahardehi, A. M., Ibrahim, D., and Sulaiman, S. F., (2009): Antioxidant activity and total phenolic content of some medicinal plants in Urticaceae family. *J. Applied Bio. Sci*, 2: 01-05.
- [44]. Lisu, W., Jui-Hung, Y., Hsiao-Ling, L., et Wul, M. J., (2003): Antioxidant effect of methanol extracts from Lotus Plumule and Blossom (*Nelumbo nucifera* Gertn). *J. food Drug Anal*, 11(1) : 60-66.
- [45]. Kim, D.k., et Lee, C. Y., (2004): Comprehensive Study on Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) of Various Polyphenolics in Scavenging a Free Radical and its Structural Relationship. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44 : 253-273.
- [46]. Butnariu, M., and Grozea, I., (2012): Antioxidant (Antiradical) Compounds. *J Bioequiv Availab*, 4:107-109
- [47]. Devasagayam, T. P. A, Tilak, J. C., Bloor, K. K., Sane, K. S., Ghaskadbi, S.S., Lele, R.D., (2004): Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects. *JAPI*, 52:794-804.
- [48]. Gordon, M. H., (1990): The mechanism of antioxidant in vitro. "Food antioxidants": Ed. HUDSON B.J.F. pp: 1-18
- [49]. Nawar, W. F., (1996): Lipids. In: Fennema O, editor. Food chemistry. 3rd ed. New York: Marcel Dekker, Inc. p 225-320.
- [50]. Decker, E. A., (2002): Antioxidant Mechanisms. In: Food Lipids, Chemistry, Nutrition, and Biotechnology.(ed) Akoh, C.C., Min, D. B., .Marcel Dekker, Inc. New York, Basel. pp 535-560
- [51]. Brewer, M. S., (2011): Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 10:221-247.
- [52]. Ward, N. C., Hodgson, J. M., Croft, K. D.; Burke, V.; Beilin, L. J., Puddey, I. B., (2005): The combination of vitamin c and grape-seed polyphenols increases blood pressure: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J. Hypertens*, 23: 427-434.
- [53]. Hasnain, B. I.; Mooradian, A. D., (2004): Recent trials of antioxidant therapy: What should we be telling our patients? *Cleve. Clin. J. Med*, 71:327-334.
- [54]. Brown, B. G., Zhao, X-Q., Chait, A., et al. (2001): Simvastatin and niacin, antioxidant vitamins, or the combination for the prevention of coronary disease. *N Engl J Med*, 345: 1583-1592.
- [55]. Cheung, M. C., Zhao, X. Q.; Chait, A., Albers, J. J.; Brown, B. G., (2001): Antioxidant supplements block the response of hdl to simvastatin-niacin therapy in patients with coronary artery disease and low hdl. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*, 21: 1320-1326.
- [56]. Kim, Y. I., (2006): Does a high folate intake increase the risk of breast cancer? *Nutr*.

Rev, 64: 468-475.

- [57]. Omenn, G. S., Goodman, G. E., Thornquist, M. D., Balmes, J., Cullen, M. R., Glass, A.; Keogh, J. P.; Meyskens, F. L. J. r, Valanis, B., Williams, J. H. J. r.; Barnhart S, Cherniack, M. G., Brodtkin, C. A., Hammar, S., (1996): Risk factors for lung cancer and for intervention effects in caret, the beta-carotene and retinol efficacy trial. *J. Natl. Cancer Inst*, 88:1550-1559.
- [58]. Albanes, D., Heinonen, O. P., Taylor, P. R., Virtamo, J., Edwards, B. K., Rautalahti, M., Hartman, A. M., Palmgren, J., Freedman, L.S., Haapakoski, J.; *et al.* (1996): Alpha-tocopherol and beta-carotene supplements and lung cancer incidence in the alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study: Effects of base-line characteristics and study compliance. *J. Natl. Cancer Inst*, 88: 1560-1570.
- [59]. The Alpha-Tocopherol Beta Carotene Cancer Prevention Study Group. (1994): The effect of vitamin e and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. The alpha-tocopherol, beta carotene cancer prevention study group. *N. Engl. J. Med*, 330:1029-1035.
- [60]. Bjelakovic, G.; Nikolova, D.; Simonetti, R.G.; Gluud, C. (2004): Antioxidant supplements for prevention of gastrointestinal cancers: A systematic review and meta-analysis. *Lancet*, 364: 1219-1228.
- [61]. Myung, S. K., Kim, Y., Ju, W., Choi, H. J., Bae, W. K., (2010): Effects of antioxidant supplements on cancer prevention: Meta-analysis of randomized controlled trials. *Ann. Oncol*, 21:166-179.
- [62]. Childs, A., Jacobs, C., Kaminski, T., Halliwell, B., Leeuwenburgh, C., (2001): Supplementation with vitamin c and n-acetyl-cysteine increases oxidative stress in humans after an acute muscle injury induced by eccentric exercise. *Free Radic. Biol. Med*, 31: 745-753.
- [63]. Peternelj, T. T., Coombes, J. S., (2011): Antioxidant supplementation during exercise training: Beneficial or detrimental? *Sports Med*, 41: 1043-1069.
- [64]. Pryor, W. A., Godber, S. S., (1991): Noninvasive measures of oxidative stress status in humans. *Free Radic. Biol. Med*, 10: 177-184.
- [65]. N. J., Miller, C., Rice-Evans, M. G., Davies, V., Gopinathan, A., Milner, (1993): A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates, *Clin. Sci*, 84: 407- 412
- [66]. Benzie, I. F. F., Strain, J. J., (1996): The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay, *Anal. Biochem*, 239: 70-76.
- [67]. Rimbach G, Hohler D, Fischer A, Roy S, Virgili F, Pallauf J, Packer L(1999): Methods to assess free radicals and oxidative stress in biological systems. *Arch Tierernahr*, 52: 203-22.
- [68]. Prior RL, Cao G (1999): In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radic Biol Med*, 27:1173-1181.
- [69]. Rice-Evans C (2000): Measurement of Total Antioxidant Activity as a marker of antioxidant status in vivo: procedures and limitations. *Free Rad Res*, 33:S59-S66.
- [70]. Jimare, M. T., Benito, Ojeda, C. B., and Rojas, F. S., (2008): Process Analytical Chemistry: Applications of Near Infrared Spectrometry in Environmental and Food Analysis:An Overview. *Applied Spectroscopy Reviews*, 43: 452-484.

- [71]. Campanella, L., Bonanni, A., Bellantoni, D., Favero, G., & Tomassetti, M., (2004): Comparison of fluorimetric, voltammetric and biosensor methods for the determination of total antioxidant capacity of drug products containing acetylsalicylic acid. *J Pharma Biom Anal*, 36: 91-99.
- [72]. Cheng, Z., Ren, J., Li, Y., Chang, W., & Chen, Z. (2002): Phenolic antioxidants: Electrochemical behavior and the mechanistic elements underlying their anodic oxidation reaction. *Redox Report*, 7: 395-402.
- [73]. Korotkova, E. I., Avramchik, O. A., Kagiya, T. V., Karbainov, Y. A., Tcherdyntseva, N. V., (2004): Study of antioxidant properties of a water-soluble Vitamin E derivative-tocopherol monoglucoside (TMG) by differential pulse voltammetry. *Talanta*, 63: 729-734.
- [74]. Pournaghi-Azar, M. H., Hydarpour, M., & Dastango, H., (2003): Voltammetric and amperometric determination of sulfite using an aluminum electrode modified by nickel pentacyanonitrosylferrate film application to the analysis of some real samples. *Analytica Chimica Acta*, 497: 133-141.
- [75]. Ali, S. S., Kasoju, N., Luthra, A., Singh, A., Sharanabasava, H., Sahu, A., Bora, U., (2008): Indian Medicinal Herbs as sources of antioxidants. *Food Research International*, 41: 1-15.
- [76]. Jacob, V., Michael, A., (1999): Nutritional antioxidants :Mechanism of action, analyses of activities and medicinal applications. *Nutrition*.49: 1-7
- [77]. Babu, B. H., Shylesh, B. S., Padikkala, J., (2001): Antioxidant and hepatoprotective effect of *Ailanthus icicifocus*. *Fitoterapia*, 72: 272-277.
- [78]. Robak, J., Gryglewski, R. J., (1998): Flavanoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem. Pharmco*, 137 : 837-841.
- [79]. Jayaprakash, G. K., Singh, R. P., Sakariah, K. K., (2001): Antioxidant activity of grape seed extracts on peroxidation models in vitro. *J.Agric.food Chem*, 55: 1018-1022.
- [80]. Kanner, J., Frankel, E.N., Grant, R., German, J.B., Kinsella, J.E., (1994): Natural antioxidants in grapes and wines. *J.Agric.Food.Chem*, 42: 64-69.
- [81]. Choi, H. R., , Choi, J. S. Han, Y. N, Bae, S. J., and Chung, H. Y., (2002): Peroxynitrile scavenging activity of herb extracts, *Phytother Res.*, 16: 364-367.
- [82]. Kinsella, J. E., Frankel, E., German, B., Kanner, J., (1993): Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Technol*, 47, 85-89.
- [83]. Pieroni, A., Janiak, V., Durr, C. M., Ludeke, S., Trachsel, E., Heincrich, M., (2002): In vitro antioxidant activity of ethnic Albanians in Southern Italy. *Phytother Res*, 16: 467-473.
- [84]. Ho, K. Y., Huang, J. S., Tsai, C. C., Lin, T. C., Lin, C. C., (1999): Antioxidant activity of tannin component from *Vaccinium vitisidaea*. *Pharm Pharmacol*, 51: 1075-1078.
- [85]. Chiaki, S., Naomi, O., (1998): antioxidative polyphenols isolated from *Theobroma coca*. *J.Agric food Chem*, 46: 454-457.
- [86]. Kimura, Y., Okudu, T., (1984): Studies on activities on tannins and related compounds. *Planta Med*, 50: 473-476.
- [87]. Mermelstein, N. H., (2010): Dealing with antioxidant assay, Food Safety And Quality. *FoodTechnology*, 64: 72-76.
- [88]. Sirisha, N., Sreenivasulu, M., Sangeeta, K., Chetty, C. M.,(2010): Antioxidant Properties of Ficus Species. *Int.J. PharmTech Res.* 2: 2174-2182
- [89]. Milardović, S., Ivekovic, D., Grabarić, B. S., (2006): A novel amperometric method

- for antioxidant activity determination using DPPH free radical. *Bioelectrochemistry*, 68: 175-180
- [90]. Blois, M. S., (1958): Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, 181: 1199-1200.
- [91]. Eklund, P. C., Langvik, O. K., Warna, J. P., Salmi, T. O., Willfor, S. M., & Sjöholm, R. E., (2005): Chemical studies on antioxidant mechanisms and free radical scavenging properties of lignans. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 21: 3336-3347.
- [92]. Molyneux, P., (2004): The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity Songklanakarin. *J. Sci. Technol*, 26: 211-219
- [93]. Erel, O., (2004): A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*, 37:277-285.
- [94]. Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J, Gopinathan, V., Milner, A., (1993): A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci*, 84: 407-12.
- [95]. Miller, N. J., Rice-Evans, C. A. (1994): Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods Enzymol*, 234:279-293.
- [96]. Miller, N. J., Rice-Evans, C. A. (1996): Spectrophotometric determination of antioxidant activity. *Redox Report*, 2:161-171.
- [97]. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., (1999): Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*, 26:1231-7.
- [98]. Miller, N. J., Sampson, J., Candeias, L. P., Bramley, P. M., Rice-Evans, C. A., (1996): Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *Fed Eur Biochem Soc Lett*, 384:240-2.
- [99]. Campos, A. M., Escobar, J., Lissi, E. A., (1996): The total reactive antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity (TAR) of *Ilex paraguayensis* extracts and red wine. *J Braz Chem Soc*, 7:43-9.
- [100]. Laight, D. W., Gunnarsson, P. T., Kaw, A. V., Anggard, E. E., Carrier, M. J., (1999): Physiological microassay of plasma total antioxidant status in a model of endothelial dysfunction in the rat following experimental oxidant stress in vivo. *Environ Toxicol Pharmacol*, 7:27-31.
- [101]. Arnao, M. B., Cano, A., Acosta, M., (1999): Methods to measure the antioxidant activity in plant material. A comparative discussion. *Free Rad. Res*, 31: 589-596.
- [102]. Lemanska, K., Szymusiak, H., Tyrakowska, B., Zielinski, R., Soffers, A. E., Rietjens, I. M., (2001): The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones. *Free Radic Biol Med*, 31: 869-881.
- [103]. Asghar, M. N., and Kha, I. U., (2008): Measurement of antioxidant activity with trifluoperazine dihydrochloride radical cation. *Brazilian J Medi Biol Res*, 41: 455-461.
- [104]. Chen, Si-xue., and Schopfer, P., (1999): Hydroxyl-radical production in physiological reactions A novel function of peroxidase. *Eur. J. Biochem*, 260:726-735.
- [105]. Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C., (1992): Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS Lett*, 307: 108-112.
- [106]. Brawn, K., & Fridovich, I., (1980): Superoxide radical and superoxide dismutases: threat and defense. *Acta Physiol. Scand. Suppl*, 492: 9-18.
- [107]. Tien, M., Svingen, B. A., & Aust, S. D., (1982): An investigation in to the role of hydroxyl radical in xanthine oxidase-dependent lipid peroxidation. *Arch.*

Biochem. Biophys, 216: 142-151.

- [108]. Stadtman, E. R., (1993): Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annu. Rev. Biochem*, 62: 797-821.
- [109]. Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., (1990): Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease; an overview. *Methods in Enzymology*, 186: 1-85.
- [110]. Halliwell, B., & Gutteridge, J.M.C., (1986): Oxygen free radical and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch. Biochem. Biophys*, 246, 501-514.
- [111]. McCord, J. M., & Day, E. D., (1978): Superoxide-dependent production of hydroxyl radical catalyzed by iron-EDTA complex. *FEBS Lett*, 86: 139-142
- [112]. Sivakumar, C. V., and Meera, I, (2013): Antioxidant and Biological Activities of Three Morphotypes of *Murraya koenigii* L. from Uttarakhand. *J Food Process Technol*, 4: 1-7
- [113]. Ebrahimzadeh, M. A, Nabavi, S. F, Nabavi SM (2009): Antioxidant activities of methanol extract of *sambucus ebulus* L. flower. *Pak. J. Biol. Sci*, 12: 447-450.
- [114]. Dehpour, A. A., Ebrahimzadeh, M.A, Nabavi S. F., Nabavi S. M., (2009): Antioxidant activity of methanol extract of *Ferula assafoetida* and its essential oil composition. *Grasas Aceites*, 60: 405-412.
- [115]. Kumar, R., and Hemalatha, S., (2011): *In-vitro* antioxidant activity of alcoholic leaf extract and subfractions of *Alangium lamarckii* Thwaites. *J. Chem. Pharm. Res*, 3:259-267
- [116]. Kumar, T. S., Shanmugam, S., Palvannan, T., and Kumar, V. M. B.. (2008): Evaluation of Antioxidant Properties of *Elaeocarpus ganitrus* Roxb. Leaves. *Iranian J Pharma Res*, 7: 211-215.
- [117]. Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M., (1999): Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal. Biochem*, 269: 337-341.
- [118]. Konyalioglu, S., Saglam, H., Kivcak, B., (2005): Alpha-Tocopherol, Flavonoid, and Phenol Contents and Antioxidant Activity of *Ficus carica* Leaves. *Pharm. Biol*, 43: 683-686.
- [119]. Jayaprakasha, G. K., Jaganmohan, R. L., Sakariah, K. K., (2004): Antioxidant activities of flavidin in different in vitro model systems. *Bioorg. Med. Chem*. 12: 5141-5146.
- [120]. Korotkova, E. I., (2000): New method of determining antioxidant activity. *J. Phys. Chem*, 74:1544-1546.
- [121]. Korotkova, E. I.; Karbainov, Y. A.; Shevchuk, A. V.,(2002): Study of antioxidant properties by voltammetry. *J. Electroanal. Chem*. 518: 56-60.
- [122]. Korotkova, E.I., Karbainov, Y.A., Avramchik, O.A., (2003): Investigation of antioxidant and catalytic properties of some biologically active substances by voltammetry. *Anal. Bioanal.Chem*, 375: 465-468.
- [123]. Korotkova, E. I., Avramchik, O. A., Kagiya, T. V., Karbainov, Y. A., Tcherdyntseva, N. V., (2004): Study of antioxidant properties of a water-soluble Vitamin E derivative-tocopherol monoglucoside (TMG) by differential pulse voltammetry. *Talanta*, 63: 729-734.
- [124]. Kohen, R., Tirosh, O., Kopolovich, K., (1992): The reductive capacity index of saliva obtained from donors of various ages Exp. *Gerontol*, 27:161-168.

- [125]. Kohen, R., Tirosh, O., Gorodetsky, R., (1992): The biological reductive capacity of tissues is decreased following exposure to oxidative stress: a cyclic voltammetry study of irradiated rats. *Free Radic. Res. Commun*, 17: 239-248.
- [126]. Kohen, R., (1993): The use of cyclic voltammetry for the evaluation of oxidative damage in biological samples. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, 29: 185-193.
- [127]. Chevion, S., Roberts, M.A., Chevion, M., (2000): The use of cyclic voltammetry for the evaluation of antioxidant capacity. *Free Radic. Biol. Med*, 28:860-870.
- [128]. Chevion, S., Berry, E., Kitrossky N., Kohen R., (1997): Evaluation Of Plasma Low Molecular Weight Antioxidant Capacity By Cyclic Voltammetry. *Free Rad Biol Med*, 22: 411-421
- [129]. Kilmartin, P.A., Zou, H., Waterhouse, A.L., (2001): A cyclic voltammetry method suitable for characterizing antioxidant properties of wine and wine phenolics. *J Agric Food Chem*, 49(4):1957-65.
- [130]. Kilmartin, P.A., Hsu, C.F., (2003): Characterization of polyphenols in green, oolong, and black teas, and in coffee, using cyclic voltammetry. *Food Chem*, 82: 501-512.
- [131]. Piljac, J., Martinez, S., Stipc'evic, T., Petrovic, Z., Metikos'-Hukovic, M., (2004): A Cyclic Voltammetry Investigation of The phenolic Content of Croation Wines. *Am. J. Enol. Vitic*, 55:417-422.
- [132]. Sousa, W. R.; da Rocha, C., Cardoso, C.L.; Silva, D. H. S.; Zanoni, M.V.B., (2004): Determination of the relative contribution of phenolic antioxidants in orange juice by voltammetric methods. *J. Food. Comp. Anal.* 17: 619-633.
- [133]. Ruffien-Ciszak A, Gros P, Comtat M, Schmitt AM, Questel E, Casas C, [Redoules D](#). (2006): Exploration of the global antioxidant capacity of the stratum corneum by cyclic voltammetry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 40:162-167.
- [134]. Brand-williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT* 28:25-30
- [135]. Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Maamrim S, Djireb F, Stocker P (2006) Phenolic extracts from various Algerian plants as strong inhibitors of porcine liver carboxylesterase. *J Enzym Inhib Med Chem* 21:719-726
- [136]. Cano A, Hernández-Ruiz J, García-Cañas F, Acosta M, Arnao MB (1998) An endpoint method for estimation of the total anti-oxidant activity in plant material. *Phytochem Anal* 9:196-202
- [137]. Rojo, C., Álvarez-Figueroa, M. J., Soto, M., Cañete, A., Pessoa-Mahana, López-Alarcón, C., (1998): Scavenging Activity Of Diclofenac Interaction With ABTS Radical Cation And Peroxyl Radicals. *J. Chil. Chem. Soc.*, 54:58-62
- [138]. van den Berg, R., Haenen, G., van den Berg, H., Bast, A., (1999): Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chem*, 66: 511-517.
- [139]. Jin, M., Cai, Y. X., Li, J. R., Zhao, H., (1996): 1, 10-Phenanthroline-Fe²⁺ oxidative assay of hydroxyl radical produced by H₂O₂/Fe²⁺. *Prog. Biochem. Biophys.* 23: 553-555.
- [140]. Hong-Yu, L., Bin, W., Chun-Guang, Y., You-le, Q., and Chuan-ling, S., (2010): Evaluation of antioxidant activities of five selected brown seaweeds from China. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4: 2557-2565

- [141]. Oyaizu, M., (1986): Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Jpn J Nutr*, 44:307-315
- [142]. Nabasree, D., Bratati, D., (2007): Antioxidant activity of some leafy vegetables of India:A comparative study. *Food Chemistry*, 101(2), 471-474.
- [143]. Dapremont-Avignon, C., Calas, P., Commeyras, A., Amatore, C., (1991): Synthesis of Perfluoroalkyl Carboxylic Acids by Reaction of Perfluoroalkyl Iodides with Electrogenerated Superoxide Ion. *J. Fluorine Chem.* 51: 357-379.
- [144]. Bourvellec, C. L., Hauchard, D., Darchen, A., Burgot, J. L., and Abasq, M. L., (2008): Validation of a new method using the reactivity of electrogenerated superoxide radical in the antioxidant capacity determination of flavonoids. *Talanta*, 75: 1098-1103.

الخلاصة العامة

الخلاصة

كانت منتجات العسل محل اهتمام الإنسان منذ القدم، وذلك لاحتوائها على مركبات فعالة طبيعية تختلف فيما بينها في البنية والتأثيرات البيولوجية وكذلك آليات التأثير، وتعتبر عديدات الفينول وخاصة الفلافونويدات والأحماض الفينولية ذات تأثيرات مزيحة للجذور الحرة ومضادة للأكسدة.

إن المركبات القياسية ذات فعالية مضادة للأكسدة عالية لكونها عبارة عن مركبات فينولية والتي بدورها مسؤولة عن تثبيط الجذور الحرة، حيث تعتبر هي المسؤولة عن الفعالية المضادة للأكسدة.

من خلال هذه الدراسة نأمل أن نحقق بعض الأهداف لتتضمن مادة البروبوليس على قدرته العلاجية، الصيدلانية والغذائية من خلال دور عديدات الفينول في معرفة البروبوليس ذات أعلى تأثير مضاد للأكسدة.

تمحورت دراستنا هذه حول أربعة عينات من بروبوليس وذلك قصد دراسة مستخلصاتها الميثانولية حيث يهتم هذا العمل بإجراء دراسة مقارنة على مستويين هما المحتوى الكمي للمواد الفعالة والتي تمثل المركبات الفينولية والفعالية المضادة للأكسدة والتي تمثل القدرة على تثبيط الجذور الحرة هذه من جهة، من جهة أخرى اهتمت هاته الدراسة أيضا بتجربة طرق جديدة لتقدير الفعالية المضادة للأكسدة تعتمد على التقنية الفولطأمبيرومتريية الحلقية (CV) والفولتأمبيرومتري (SWV).

وكمحلة أولى في دراستنا هذه قمنا باستخلاص المركبات الفينولية من عينات البروبوليس طبقا لطريقة النقع في الميثانول لإعطاء أكبر مردود ممكن (إختيار طريقة استخلاص مناسبة مع إختيار المذيب).

بعد استخلاص البروبوليس بالطريقة المختارة تم تقدير كمية الفينولات الكلية اعتمادا على طريقة Singleton-Rossi (1956) بواسطة اختبار Folin-Ciocalteu reagent لمستخلصات الميثانولية للبروبوليس حيث نلاحظ أنها تحتوي على كميات كبيرة جدا من الفينولات حيث بلغت أقصى كمية سجلتها يومرداس وصلت إلى $262,338 \text{ mg/g}$ كذا الفلافونويدات التي بلغت 210.884 mg/g أما بقية المستخلصات وهما غرداية ومستغانم فكانت كميتهما 185.074 mg/g من الفينولات و mg/g 85.827 من الفلافونويدات و 86.213 mg/g من الفينولات و 14.718 mg/g من الفلافونويدات على

التوالي، أما أقل نتيجة ف سجلها بروبوليس بجاية حيث كانت 81.141 mg/g للفينولات و mg/g 23.972 من الفلافانويدات، يظهر جليا من خلال النتائج غنى مادة البروبوليس بالمركبات الفينولية ويظهر هذا التفاوت في النسب نظرا لاختلاف طبيعة المناخ.

وفي المرحلة الثانية قمنا بدراسة الفعالية المضادة للأكسدة للمستخلصات الفينولية وتم ذلك بواسطة أربعة اختبارات هي اختبار (DPPH)، اختبار الموليبيدات (TAC)، تقنية (CV) وتقنية (SWV). وتبين لنا أن جميع المستخلصات تملك فعالية معتبرة وخاصة مستخلص بومرداس و غرداية، حيث تم إجراء مقارنة النتائج المتحصل عليها بمركبات قياسية هي حمض الأسكوربيك (AA) وحمض الغاليك (GA).

تمت مقارنة نتائج الاختبارين (DPPH) و إختبار الموليبيدات (TAC) بنتائج الطريقة (CV) وتقنية (SWV) ووجد أن هناك شبه تطابق في ترتيب المستخلصات إذ احتل بروبوليس بومرداس الصدارة يليه غرداية ثم بجاية ومستغانم، أما فيما يخص قيم (كمية) المواد المضادة للأكسدة (LMWA) فهناك اختلاف واضح يعكس خصائص كل طريقة إلا أننا وجدنا أن طريقة (CV) وتقنية (SWV) تعطي نتائج متقاربة من حيث القيم فقد استعملنا في هذه الطريقة مركبين قياسيين (AA) و (GA) ذو وسط حمضي (pH=2)، رغم هذا فقد جاءت النتائج متقاربة مما يعطي انطباع أن هذه الطريقتين أكثر دقة، و من أجل الخروج بنتائج مقنعة من حيث اعتماد الطريقة (CV) وتقنية (SWV) كطريقة لتقييم الفعالية المضادة للأكسدة تمت المقارنة وذلك بناء على مدى الترابط بين هاته النتائج. حيث وجد إن أكبر ترابط بين الطريقة (CV) واختبار الموليبيدات (TAC) في حالة اخذ (GA) كأساس مرجعي ($R^2=0,999$)، أما علاقة الترابط بين الطريقة (CV) و اختبار (DPPH) فقد كانت أقل ما يمكن في حالة الاعتماد على المنحنى القياسي لـ (AA) بدلالة كثافة التيار حيث بلغ ($R^2=0,118$).

كنتيجة أكيدة لهذا العمل الذي يقوم على تجربة دقيقة ونتائج مؤكدة، نستطيع أن نقول أن طريقة (CV) وتقنية (SWV) هي طرق ذات كفاءة عالية لتقدير الفعالية المضادة للأكسدة (LMWA) للمواد الطبيعية، فتحضير العينة للدراسة بواسطة (CV) وتقنية (SWV) بسيط وسريع ولا يتطلب إجراءات معقدة، كما إن منحنى (CV) وتقنية (SWV) يمكننا من استنتاج اختبار للعينة الكلية دون الحاجة لتقييم كل مركب من مركباتها على حده، هذا ما يسهل علينا إجراء دراسات موسعة تشمل العديد من المستخلصات والمركبات حيث لا يطرح في هذه الطريقة الزمن ولا التكلفة ولا الوسط ولا طبيعة العينة أي مشكلة.

ومما سبق ذكره فإننا نأمل أن هذه الدراسة لا تنتهي عند إستخلاص المركبات الفينولية الخام وفعاليتها المضادة للأكسدة، بل يجب أن تتعداها إلى معرفة الصيغ الكيميائية المسؤولة عن هذه الفاعلية. وفي الأخير وكنتيجة أكيدة لهذا العمل لا يسعني إلا أن أقول إن تثمين مادة البروبوليس واستغلالها، وعليه فإننا نوصي كل من الباحثين والمهتمين بإجراء المزيد من الدراسات حول إستخدام البروبوليس وغيره من منتجات النحل، والتي يمكن إستخلاص مكوناتها ودراسة خواصها وقيمتها الغذائية لتمكين الصناعات في بلادنا من التطور والإزدهار، كذلك تكثيف أبحاثهم في هذا المحور والمتعلق بتقدير مضادات الأكسدة بالطرق الكهروكيميائية لعدة اعتبارات أهمها أن هناك توجه عالمي غير اعتيادي لهذه الدراسات خاصة على مستوى الدول: روسيا، الولايات المتحدة الأمريكية والكيان الإسرائيلي هذا الأخير الذي له حصة الأسد من هاته الأبحاث، ذكرت هذا لأهمية الموضوع وسعة المجالات التي يمكن إن يستخدم فيها.

و اعتمادا على النتائج المتحصل عليها في دراسة قدرة مستخلصات البروبوليس على تثبيط الجذر الأيوني سبيروكسيد ($O_2^{\bullet-}$)، التي لها تأثير قوي عند استخدامها كمضادات للأكسدة في عدد من التفاعلات الكيميائية التي تنتج الهيدروجين بيروكسيد، بدراسة فعالية هذه المركبات لمناطق مختلفة في الجزائر تبين ان قيم اجمالي فعالية هذه المواد المضادة للأكسدة (TAC) جد عالية حيث بلغ البعض منها فعالية المركبات القياسية و اختلفت هذه الفعالية من منطقة لأخرى حيث كانت اقصى فعالية مضادة للأكسدة في عينات البروبوليس في منطقة الشرق (سوق اهراس) و تليها منطقة الوسط (بومرداس) و الجنوب (غرداية)، تقريبا كانت لهما نفس الفعالية و اخيرا منطقة الغرب (مستغانم)، و لإثبات صحة السلم تم تقدير فعالية بعض المركبات القياسية و اثبات فعاليتها حيث بلغت اقصى فعالية لحمض الغاليك يليه حمض الاسكوربيك ثم الكريستين و الروتين و اخيرا α -توكوفيرول حيث تطابقت هذه النتائج مع اغلب طرق تقدير فعالية المواد المضادة للأكسدة الأخرى.

المركبات القياسية ذات فعالية مضادة للأكسدة عالية لكونها عبارة عن مركبات فينولية و التي بدورها مسؤولة عن تثبيط الجذور الحرة، فيمكن القول ان تواجد المركبات الفينولية في هذه المواد بكثرة يمكن ان يكون هو المسؤول عن الفعالية المضادة للأكسدة.

بتقدير كمية الفينولات الكلية اعتمادا على طريقة Singleton-Rossi (1956) بواسطة اختبار Folin-Ciocalteu reagent لمستخلصات خلية النحل نلاحظ انها تحتوي على كميات كبيرة جدا من الفينولات حيث بلغت اقصى كمية 293.1mg/g في عينات البروبوليس عند عينة بومرداس (pB)، و كان معامل

الارتباط بين الفعالية المضادة للأكسدة و كمية الفينولات جد صغير حيث بلغ $R^2 = 0.0001$ عند عينات البروبوليس .

ومن هذه الملاحظات يمكننا القول ان فعالية هذه المواد المضادة للأكسدة لا تعتمد على كمية الفينولات المتواجدة فيها و انما تعتمد على خصائص اخرى مثل صيغة المركب الفينولي ،او تواجد مركبات اخرى غير الفينولات مسؤولة عن الفعالية المضادة للأكسدة.

بتقدير اجمالي فعالية المواد المضادة للأكسدة لبعض من مستخلصات البروبوليس و حبوب اللقاح لمناطق مختلفة في الجزائر و اثبات فعالية أغلب المركبات القياسية تم اثبات فعالية سلم لبعض المواد المضادة للأكسدة ،و يبقى استكمال هذا السلم بالمواد الغذائية المختلفة ذات الفعالية المضادة للأكسدة و معرفة المركب الكيميائي المسؤول عن الفعالية المضادة للأكسدة خطوة أولى لأعمال مستقبلية إن شاء الله .

الملاحق

Evaluation of Antioxidant Capacity of Propolis Collected in Various Areas of Algeria Using Electrochemical Techniques

Mohamed Lakhder Belfar^{1,2,*}, Touhami Lanez², Abdekarim Rebiai², Zineb Ghiaba¹

¹ Laboratoire V.P.R.S, Université de Ouargla, BP 511 route de Ghardaia.30000 Ouargla, Algeria.

² University of El-Oued, VTRS Laboratory, B.P.789, 39000, El-Oued, Algeria.

*E-mail: mbelfar@gmail.com

Received: 12 April 2015 / Accepted: 9 September 2015 / Published: 30 September 2015

The present study examined the antioxidant activity of methanolic extracts of propolis samples from different regions of Algeria. Total phenol content (TPC) was determined by using Folin-Ciocalteu Reagent. Total flavonoid content (TFC) was determined by using aluminum chloride method. Resulting ranged between (210.884±0.754-19.626±0.301 mg/100g) and (262,338±0.810-81.141±0.538 mg/100g) crude extract of propolis, respectively. Thereafter, evaluate propolis' antioxidant activity, measured by using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging and Total antioxidant activity was measured, based on the phosphomolybdenum assay (PM). A novel system to evaluate the Algerian propolis' antioxidant activity is reported. The methods use a cyclic and square wave voltammetry. These techniques are realized to compare the results from spectroscopic method and to electrochemically characterize the propolis polyphenols. Our results justify the use of as a natural source of antioxidant compounds could be used in the prevention of free radical-related diseases.

2. Abdelkerim Rebiai, Lanez Touhami, and Mohamed Lakhder Belfar. "Total polyphenol contents, radical scavenging and cyclic voltammetry of Algerian propolis." International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 6 (2014): 395-400.

المشاركات في الملتقيات الوطنية

1. Rebiai, A., Lanez, T., & Belfar, M. L. Determination of caffeic acid and gallic acid in Algerian bee pollen by HPLC method. 4 Phytochem & BioSub Conference. At Bechar, Algeria (2013).