2013/03/14 THE.CH.10/110/13

جامعة قـــاصدي مرباح – ورقـــلة
UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA
كلـــية العلـــوم و التكنولوجيا و علوم المادة
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIE
ET SCIENCES DE LA MATIERE
قســـــــم علوم المادة
DEPARTEMENT DE SCIENCES DE LA MATIERE

مذكرة تخرج لنيل شهادة

الماجستيـــــــر في الكيمياء

تخصص: كيمـــياء تحليلية و مراقبة المحيط

من إعداد الطالب:

ربيعي عبدالكريم

تحت عنوان:

المساهمة في دراسة الفعالية المضادة للأكسدة لمستخلصات بروبوليس جنوب الجزائر بالطرق الكيميائية و الكهروكيميائية

نوقشت يوم : 13. 07. 2010

أمام لجنة المناقشة المكونة من:

أ.د.سعيدي مختار	أستاذ التعليم العالي	جامعة قاصدي مرباح بورقلة	رئيسا
أ.د.يوسفي محمد	أستاذ التعليم العالي	جامعة عمار ثليجي بالأغواط	مناقش
أ.د.دندوقي حسين	أستاذ التعليم العالي	جامعة قاصدي مرباح بورقلة	مناقش
أ.م.لخضر بلفار	أستاذ مساعد	المـــركز الجـــامعي بالـــوادي	مدعو
أ.د.العانز التهامي	أستاذ التعليم العالي	المـــركز الجـــامعي بالـــوادي	مقررا

السنـــــــة الجـــــامعية 2010/2009

بسم الله الرحمن الرحيم

الإهداء

أهدي ثمرة هذا العمل المتواضع

إلى أمتي الغالية

إلى المعلم الأكبر

والمربي الأعظم

والهادي البشير

والمصلح الجليل

المبعوث رحمة للعالمين

سيدنا محمد صلى الله عليه وسلم

إلى والدي : اللذين ربياني على مائدة القرآن ، وأرشداني لدروب الخير ، وأدبا ، وعلما ، وصبرا ، واحتسبا ، ودفعاني للبحث دفعًا ، وأنفقا كل مرتخص وغال احمال الله عز وجل ، أن يبارك فيهما ، ويرزقني برَّهما ، وأن يمدّ في عمرهما ، ويحسن خاتمتهما ، وأن يجعل ذلك في ميزان حسناتهما يوم القيامة.

إلى إخوتي وأخواتي: حميرة، محمد، عمار، فاطمة، عادل، مريم، حليمة.

إلى حميرة التي لم تدخر جهدًا في مساعدتي

إلى الذين يقاسمونني همومي وآلامي،

ويقفون معي في نوائب الزمان

وقفةَ حَريفٍ وكريم،

إحتراماً لخصالهم،

وحُبّاً لشمائلهم،

وتقْديراً لمواقفهم

ووَفَاءً لإخلاصهم

وإعتزازاً بهم.

كلمة الشكر

إمتثالاً لقوله سبحانه وتعالى: ﴿ **ولقد آتينا لقمان الحكمة أن اشكر لله ومن يشكر فإنما يشكر لنفسه ومن كفر فإن الله غني حميد** ﴾ (لقمان آية رقم 12) فأشكر الله على ما من به علي من النعم، وأشكره سبحانه على أن وفقني لهذه الدراسة فالحمد لله على ما كرم وشرف، ثم إن من شكر الله شكر القائمين على هذه الدراسة، اقتداءً بهدى المصطفى - صلى الله عليه وسلم - القائل ((**من لا يشكر الناس لا يشكر الله**)) فإني أتقدم في بداية بحثي هذا بجزيل الشكر والتقدير والعرفان إلى أساتذتي الفضلاء وأخص بالذكر الأستاذ المشرف على بحثي **الاستاذ الدكتور العانز النهامي** الذي بذل من وقته وتحمل أعباء هذا العمل بالتوجيه والنصح لي فجزاه الله خير الجزاء على ما قام به من جهود مباركة، وجعل ذلك في موازين حسناته، كما أشكر شكراً جزيلاً **الاستاذ بلفار محمد الأخضر** على عمله معي وتوجيهه لي.

و لا يفوتني أن أقدم شكري وامتناني إلى الاساتذه **بوقوادة مصطفى** و **غيابة زينب** و **دقموش مسعودة** على المساعدات المبذولة والنصائح التي أفادوني بها والمراجع التي زودوني بها.

كما لا يفوتني في هذا المقام أن أقدم شكري وأسمى عبارات العرفان والامتنان إلى **الأستاذ الدكتور سعيدي مختار** أستاذ تعليم عالي بجامعة قاصدي مرباح بورقلة على المجهودات و النصائح التي قدمها لنا والتشجيع الذي خصنا به و كذالك بقبوله رئاسة لجنة المناقشة أشكره جزيل الشكر.

أوجه خالص شكري إلى **الاستاذ الدكتور يوسفي محمد** أستاذ تعليم عالي بجامعة عمار تليجي بالأغواط، على مساعدته في التوجيه اولا و على قبوله المشاركة في لجنة المناقشة وإثراء الموضوع ثانيا.

بالمثل كذلك أسند تشكراتي الى **الاستاذ الدكتور دندوقي حسين** أستاذ تعليم عالي بجامعة قاصدي مرباح على قبوله المشاركة في لجنة المناقشة وإثرائها.

كما لا يفوتني في هذا المقام أن أقدم شكري الجزيل أيضا إلى كل من الزملاء **جمال، عمار، سهيلة، حياة، خولة و أمال**، و أتوجه بأعمق وأسمى عبارات الشكر و العرفان إلى أساتذتنا الكرام الذين أشرفوا على تكويننا والذين ساهموا وشاركوا في تأطير وتخريج دفعتنا، و الى كل زملاء دفعتي في الماجستير، وإلى كل الأصدقاء الذين لم يبخلوا علي بنصائحهم وخصوصا، **جمال غيلاني، حملاوي ادريس، بن حود عبدالحميد، شويخ نص**، والى رفقاء الدرب **قبي توفيق، رحماني عبدالله**، كما لا انسى كل زملائي في مديرية النجارة ابتداء من السيد المدير **دقمان عكاشة و باسة محمد و السيدة بن عيسى عتيقة** وفي الأخير لا يسعني إلا أن أشكر كل من ساهم في مساعدتي من قريب أو بعيد خاصة مربي النحل في جنوبنا الكبير، فجزاهم الله عنا خير الجزاء.

وصلى الله على نبينا محمد وعلى آله وصحبه أجمعين

قائمة الرموز

A_0	الامتصاصية الضوئية للجذر الحر في غياب المستخلصات
A_i	الامتصاصية الضوئية للخليط (الجذر + المستخلصات) بعد مرور زمن
AA	حمض الأسكروبيك.
ABTS	2,2 azinobis-(3-ethylbenzothialozine-6-sulphonic acid)
AEAC	Ascorbic acide Equivalent Antioxydant Capacity
ARP	Anti-Radicalaire Puissance
AI30	معامل بدلالة كثافة التيار يعبر عن قيم مضادات الاكسدة لتثبيط 30% من جذر الأوكسجين.
AI50	معامل بدلالة كثافة التيار يعبر عن قيم مضادات الاكسدة لتثبيط 50% من جذر الأوكسجين.
BHA	Buthyl Hydroxy Hnizole
BHT	Buthyl hydroxy toluéne
CV	الفولطاأمبيرومتري الحلقي
DPPH	1 ,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
DMF	ثنائي مثيل فورماميد.
FRAP	Ferric Reducing Antioxydant Power
GA	حمض الغاليك.
HPLC	الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء.
IC_{50}	تركيز المستخلص الفينولي لتثبيط 50% من الجذور الحرة.
I%	النسبة المئوية للتثبيط
LMWA	Low Molecular Weight Antioxidants
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
PR	. Power Reducing
ROS	Reactive Oxygen Species
RNS	Reactive Nitrogen Species
Sa	مساحة الموجة المصعدية.
TRAP	Total Radical-trapping Antioxidant Parameter
TCA	حمض ثلاثي كلورو أسيتيك.
Ipa	تيار النتوء المصعدي.
Ipc	تيار النتوء المهبطي.
Epa	كمون النتوء المصعدي.
Epc	كمون النتوء المهبطي.
Epa/2	كمون نصف النتوء المصعدي.
Epc/2	كمون نصف النتوء المهبطي.
ΔEp	التغير في الكمونات بين Ipc وIpa.
K_S	ثابت السرعة.

α	معامل التحول.
λ_{max}	طول الموجة الأعظمية
D_R	معامل الانتشار بوحدة(cm^2/s).
C_R	تركيز العناصر المتفاعلة بوحدة (mol/cm^3).
V	سرعة المسح (V/s).
A	مساحة سطح المسرى (cm^2).
n	العدد الإجمالي للإلكترونات المتبادلة (المتحولة).
UV	الأشعة فوق البنفسجية.

قائمة الجداول

الجدول		الصفحة
	الفصل الثاني	
جدول 1.I	بعض المركبات الفينولية المستعملة في الطب و الصيدلة	27
جدول 2.II	بعض مركبات الفلافانويدات المستعملة في الصناعة الدوائية	27
جدول 3.II	إحداثيات مناطق جني البروبوليس	32
جدول 4.II	الصفات الفيزيائية لعينات البروبوليس المدروسة	32
جدول 5.II	كمية الفينولات الناتجة عن طرق الاستخلاص المقترحة	35
جدول 6.II	نتائج مردود المادة المستخلصة	38
جدول 7.II	يوضح كمية الفينولات و الفلافانويدات في المستخلصات	40
جدول 8.II	يوضح نسب الفينولات و الفلافانويدات في المادة المستخلصة	41
جدول 9.II	بعض مصادر العوامل المؤكسدة و العوامل المضادة للاكسدة	53
جدول 10.II	نتائج إختبار DPPH لكل من مستخلصات البروبوليس ولحمض الأسكوربيك	57
جدول 11.II	نتائج اختبار القدرة الإرجاعية لمستخلصات البروبوليس	61
	الفصل الثالث	
جدول 1.III	جدول يوضح كيفية تقييم الفعالية المضادة للأكسدة	85
جدول 2.III	جدول للكمونات النصفية ($E_{p/2}$) البروبوليس حسب المناطق	94
جدول 3.III	جدول لنتائج تقدير الفعالية المضادة للأكسدة بأخذ المنحنى القياسي لحمض الأسكروبيك بدلالة مساحة الموجة المصعدية.	95
جدول 4.III	جدول لنتائج تقدير الفعالية المضادة للأكسدة بأخذ المنحنى القياسي لحمض الأسكروبيك بدلالة كثافة التيار.	95
جدول 5.III	جدول للكمونات المصعدية لمستخلصات البروبوليس حسب المناطق	101
جدول 6.III	جدول لنتائج تقدير الفعالية المضادة للأكسدة بأخذ المنحنى القياسي لحمض الغاليك بدلالة مساحة الموجة المصعدية	102

قائمة الأشكال

الشكل		الصفحة
	الفصل الأول	
شكل I. 1	عملية جني المواد الصمغية من براعم و جروح الأشجار	6
شكل I. 2	بروبوليس تم جنيه من طرف الإنسان	7
شكل I. 3	بروبوليس تم تخزينه	7
شكل I. 4	صور لزواحف قتلها النحل وحنطها بواسطة البروبوليس	10
شكل I. 5	صورة لاستخدامات البروبوليس في تقوية أماكن ترابط الأقراص	11
شكل I. 6	بعض الأشكال الصيدلانية للبروبوليس	14
شكل I. 7	الاشكال الغذائية للبروبوليس	15
	الفصل الثاني	
شكل II. 1	نموذجين لمركبين غير فينوليين	19
شكل II. 2	تصنيع الفينولات إنطلاقا من عديد الأسيتات	20
شكل II. 3	تصنيع الفينولات إنطلاقا من حمض شيكيميك	20
شكل II. 4	المركبات الفينولية من الشكل C_6 , C_6-C_1 , C_6-C_2	21
شكل II. 5	نماذج للمركبات الفينولية من الشكل C_6-C_3 , C_6-C_4	21
شكل II. 6	بعض النماذج للفينولات من الشكل : C_6-C_1-C_6 , C_6-C_2-C_6 ، ثنائي الفلافونيل	21
شكل II. 7	نماذج لأحماض البنزويك	22
شكل II. 8	أمثلة لأحماض السيناميك	22
شكل II. 9	تشكل الكومارينات	22
شكل II. 10	بعض نماذج الكومارينات	23
شكل II. 11	الهيكل الأساسي للفلافونويدات	23
شكل II. 12	أنواع مركبات الفلافونويدات	24
شكل II. 13	وحدة التانينات المتراكمة و وحدة التانينات المتحللة	25
شكل II. 14	جزيئة ليقنين	25
شكل II. 15	الاصطناع الحيوي للفينولات	28
شكل II. 16	عينات البروبوليس المدروسة	33
شكل II. 17	يوضح الاختلاف في اللوان اثناء النقع في الميثانول	37

شكلII .18	المستخلصات الناتجة بعد الترشيح	38
شكلII .19	يوضح التراكيب الرنينية في جزيء DPPH	46
شكلII .20	رسم تخطيطي يوضح مصدر مختلف الجذور الحرة المؤكسدة وأنماط التفاعلات الأكسجين المطبقة بيولوجيا	48
شكلII .21	يوضح بنيةBHA	50
شكلII .22	يوضح بنيةBHT	51
شكلII .23	يوضح بنية حمض الغاليك	51
شكلII .24	معادلة تثبيط جذر DPPH في وجود مضادات الجذور الحرة	55
	الفصل الثالث	
شكل III.1	المقادير الأساسية لمنحنى الفولطاأمبيرومتري الحلقي	72
شكل III.2	مخطط بياني مفصل للمنحنى I=f(E) لانتقال إلكترون واحد	73
شكل III.3	منحنيات الفولطاأمبيرومتري الحلقي لـــ: (أ): نظام عكوس، (ب): نظام نصف عكوس، (ج): نظام بطيء	74
شكل III.4	منحنى الفولطاأمبيرومتري الحلقي بدلالة سرعة المسح	75
شكل III.5	تفاعل أكسدة المركبات الفينولية و تشكل جذر الفينوكسيل	77
شكل III.6	حمض الغاليك و مشتقاته	78
شكل III.7	آلية أكسدة حمض الغاليك و مشتقاته	79
شكل III.8	الفولطاأمبيرومتري الحلقي لحمض الغاليك pH=2. (E) من (0 الى 1200 mV)، سرعة المسح 100 mV/s.	80
شكل III.9	المنحنى القياسي (GA)	80
شكل III.10	الفولطاأمبيرومتري الحلقي للأوكسجين في 0.1M /DMF من (Bu_4NPF_6) سرعة مسح (100 mV/s)	82
شكل III.11	الفولطاأمبيرومتري الحلقي لإرجاع الأوكسجين في وجود تراكيز متزايدة من Phloroglucinol في 0.1M /DMF من (Bu_4NPF_6) سرعة مسح (100 mV/s)	83
شكل III.12	منحنى يوضح عبارة التيار بدلالة تركيز مضادات الأكسدة	84
شكل III.13	الخلية الكهروكيميائية	87
شكل III.14	المساري	88
شكل III.15	التركيب التجريبي للأجهزة المستعملة في الفولطاأمبيرومتري الحلقي	88

قائمة المنحنيات

المنحنى		الصفحة
الفصل الثاني		
المنحنى II .1	المنحنى القياسي لـ(GA)	35
المنحنى II .2	يوضح المقارنة بين كمية الفينولات في المستخلصات الميثانولية	36
المنحنى II .3	يوضح المقارنة بين كمية الفينولات في المستخلص الميثانولي و الايثانولي للطريقة الثانية	36
المنحنى II .4	يوضح مقارنة مردود الاستخلاص حسب المناطق	39
المنحنى II .5	المنحنى القياسي لـ(Rutine)	40
المنحنى II .6	يوضح المقارنة بين كمية الفينولات و الفلافونويدات في المستخلصات الميثانولية	41
المنحنى II .7	يوضح علاقة الارتباط بين كمية الفينولات و الفلافونويدات في المستخلصات	41
المنحنى II .8	يوضح المقارنة بين نسب الفينولات و الفلافونويدات في المادة المستخلصة	42
المنحنى II .9	المنحنى القياسي لـ(AA)	56
المنحنى II .10	إختبار DPPH لمستخلصات البروبوليس	57
المنحنى II .11	مقارنة نتائج إختبار DPPH للبروبوليس	58
المنحنى II .12	يوضح علاقة الارتباط بين كمية الفينولات و الفلافونويدات ونتائج اختبار الفعالية المضادة للأكسدة(DPPH) للمستخلصات	59
المنحنى II .13	المنحنى القياسي لـ(AA)	60
المنحنى II .14	إختبار القدرة الإرجاعية لمستخلصات البروبوليس	61
المنحنى II .15	مقارنة نتائج إختبار القدرة الإرجاعية لمستخلصات البروبوليس	62
المنحنى II .16	يوضح علاقة الارتباط بين كمية الفينولات و الفلافونويدات ونتائج اختبار القدرة الإرجاعية للمستخلصات	62
المنحنى II .17	يوضح علاقة الارتباط بين نتائج اختبار DPPH ونتائج اختبار القدرة الإرجاعية للمستخلصات	63
الفصل الثالث		
المنحنى II .1	المنحنى الفولطأمبيرومتري الحلقي للكهروليت	89

المنحنى III .2	المنحنى الفولطاأمبيرومتري الحلقي لـ (1 mM) لـ (AA)	90
المنحنى III .3	المنحنيات الفولطاأمبيرومترية الحلقية لتراكيز (1 -0.1 mM) لـ (AA)	91
المنحنى III .4	المنحنى القياسي لـ (AA) Sa = F(C)	92
المنحنى III .5	المنحنى القياسي لـ (AA) Ia = F(C)	92
المنحنى III .6	المنحنيات الفولطاأمبيرومترية الحلقية لـمستخلصات	93
المنحنى III .7	مقارنة المنحنيات الفولطاأمبيرومترية الحلقية لـمستخلصات البروبوليس	94
المنحنى III .8	مقارنة نتائج الفعالية المضادة للأكسدة بالطريقة الفولطاأمبيرومترية الحلقية في حالة (AA)	96
المنحنى III .9	المنحنى الفولطاأمبيرومتري الحلقي لـ (1 mM) لـ (GA)	97
المنحنى III .10	المنحنى الفولطاأمبيرومتري الحلقي لتراكيز (1 -0.1 mM) لـ (GA)	98
المنحنى III .11	المنحنى القياسي لـ (GA) Sa = F(C)	99
المنحنى III .12	المنحنيات الفولطاأمبيرومترية الحلقية لـمستخلصات البروبوليس	100
المنحنى III .13	مقارنة المنحنيات الفولطاأمبيرومترية الحلقية لـمستخلصات البروبوليس	101
المنحنى III .14	مقارنة نتائج الفعالية المضادة للأكسدة بالطريقة الفولطاأمبيرومترية في حالة (GA)	102
المنحنى III .15	يوضح علاقة الارتباط بين نتائج اختبار التقدير الفولطاأمبيرومتري الحلقي(CV) و اختباري DPPH و (RP) للمستخلصات في حالة الاعتماد على مساحة الموجة المصعدية لـ(AA)	103
المنحنى III .16	يوضح علاقة الارتباط بين نتائج اختبار التقدير الفولطاأمبيرومتري الحلقي(CV) و اختباري DPPH و (RP) للمستخلصات في حالة الاعتماد على كثافة التيار المصعدي لـ(AA)	103
المنحنى III .17	يوضح علاقة الارتباط بين نتائج اختبار التقدير الفولطاأمبيرومتري الحلقي(CV) و اختباري DPPH و (RP) للمستخلصات في حالة الاعتماد على مساحة الموجة المصعدية لـ(GA)	104

الفهـرس

العنوان	الصفحة
مقدمـــــة	1
الفصل الأول	
I.عموميات حول البروبوليس	
I.1.مقدمـــة	4
I.2.تعريف	4
I.3.تاريخ البروبوليس	4
I.4.جني البروبوليس	6
I.5.التخزين	7
I.6.الخواص الفيزيائية والكيميائية (الظاهرية)	8
I.7.المكونات الأساسية للبروبوليس	9
I.8.دور البروبوليس في خلية النحل	10
I.9.الأهمية الطبية للبروبوليس	11
I.10.الأشكال الصيدلانية للبروبوليس	13
I.11.استعمالات أخرى للبروبوليس	14
المراجع	16
الفصل الثاني	
II. المركبات الفينولية الطبيعية و الفعالية المضادة للأكسدة	
القسم الأول : الجانب النظري	
II.1.المركبات الفينولية الطبيعية	19
II.1.1.تعريف	19
II.1.2.الإصطناع الحيوي الأولي لمركبات فينولية (مصدر المركبات الفينولية)	20
II.1.2.1.الإصطناع إنطلاقا من عديد الأستات	20
II.1.2.2.الإصطناع إنطلاقا من حمض شكيميك	20
II.1.3.أقسامها	20
II.1.4.أهمية الفينولات و الفلافونويدات	26
II.1.5. الاصطناع الحيوي للفينولات	28
II.1.6. العلاقات بين البنى الالكترونية و الخواص الكيميائية للفينولات	28
II.1.7.استخلاص المركبات الفينولية	29

القسم الأول : الجانب العملي

II.2.طرق العمل و المواد المستعملة 31

II.2.1.الأجهزة و الأدوات المستعملة 31

II.2.2.المواد الكيميائية 31

II.2.3.جني عينات البروبوليس 32

II.2.4.استخلاص المركبات الفينولية 33

II.2.5. تقدير كمية الفينولات الكلية و الفلافانويدات 34

II.2.6.استخلاص العينات 37

II.2.6.1.حساب قيم الفينولات الكلية في المستخلصات 39

II.2.6.2.تقدير كمية الفلافونويدات 39

II.2.7.مناقشة النتائج المتحصل عليها 42

القسم الثاني : الجانب النظري

II.3.الفعالية المضادة للأكسدة 44

II.3.1.مقدمـــة 44

II.3.2.الجذور الحرة 44

II.3.2.1.تعريف 44

II.3.2.2.أنواع الجذور الحرة حسب استقرارها 45

II.3.2.3.فعالية الجذور الحرة 46

II.3.2.4.متابعة حركية الجذور الحرة 46

II.3.2.5.الأكسدةالعضوية 46

II.3.2.6.تفاعلات الأكسدة في النظام البيولوجي 47

II.3.3.مضادات الأكسدة 49

II.3.3.1.تعريف 49

II.3.3.2.تصنيف مضادات الأكسدة 49

II.3.3.2.1.مضادات الأكسدة الطبيعية 49

II.3.3.2.2.مضادات الأكسدة الاصطناعية 50

II.3.3.3.مصادر مضادات الأكسدة 52

II.3.3.4.الحالات المرضية ذات العلاقة بالمواد المؤكسدة 52

القسم الثاني : الجانب العملي

II.4.1.الأجهزة و المواد المستعملة 54

II.4.2. تقدير الفاعلية المضادة للأكسدة 54

II.1.2.4.اختبار DPPH 54
II.2.2.4.اختبار القدرة الإرجاعية للمستخلصات البروبوليس 59
المراجع 64

الفصل الثالث

III.الدراسة الكهروكيميائية لمضادات الأكسدة

الجانب النظري

III.1.1.المقدمة 68
III.2.1.العوامل التي ساهمت في ظهور التقنية الكهروكيميائية 68
III.1.2.1.التحديات و النقائص التي واجهت استخدام الطرق التقليدية 68
III.2.2.1.مزايا الطرق الكهروكيميائية التحليلية 69
III.3.2.1.المواد التي يمكن دراستها كهروكيميائيا 69
III.3.1.الجزيئات المضادة للأكسدة 70
III.4.1.الطرق الكهروكيميائية 70
III.5.1.أسس دراسة الفولطاأمبيرومتري لمضادات الأكسدة 71
III.1.5.1.التقنية الفولطاأمبيرومترية الحلقية 72
III.2.5.1.الخصائص الكهروكيميائية للفينولات 76
III.6.1. تقدير الفعالية المضادة للأكسدة 77
III.1.6.1.الطريقة الأولى 77
III.2.6.1.الطريقة الثانية 81

الجانب العملي

III.1.2.الأجهزة و المواد المستعملة 86
III.2.2.تقدير الفاعلية المضادة للأكسدة بأخذ حمض الأسكروبيك كمركب قياسي 89
III.1.2.2.الدراسة الكهروكيميائية لحمض الأسكروبيك 89
III.3.2.تقدير الفاعلية المضادة للأكسدة بأخذ حمض الغاليك كمركب قياسي 97
III.1.3.2. الدراسة الكهروكيميائية لحمض الغاليك 97
III.4.2.مقارنة النتائج 103
المراجع 105
الخـــــاتمة 108

الملحـــــق

ملخص:

الهدف من هذه الدراسة هو تثمين مادة البروبوليس، و ذلك بتقدير الفعالية المضادة للأكسدة و المحتوى الكمي من المركبات الفينولية لعينتين من بربوليس جنوب الجزائر(الوادي، غرداية) و عينتين من خنشلة و اليابان، الاستخلاص تم بالمثانول.

تقدير المركبات الفينولية تم بطريقة فولن سيوكلتو، أما الفعالية المضادة للأكسدة فتم تقديرها باختبار (DPPH)، القدرة الارجاعية (PR) و الطريقة الفولطاأمبيرومترية الحلقية (CV).

النتائج أظهرت أن بروبوليس اليابان يحتوي على اكبر كمية من الفينولات يليه بروبوليس خنشلة ثم عينتي الوادي و غرداية، بينما أظهرت نتائج تقدير الفعالية المضادة للأكسدة أن بروبوليس خنشلة يمتلك اكبر فعالية مضادة للأكسدة يليه اليابان ثم غرداية و الوادي، كما وجد إن هناك علاقة ارتباط قوية بين الطريقة الفولطاأمبيرومترية الحلقية (CV) و اختباري (PR) و (DPPH) وصلت إلى ($R^2 = 0.95$).

الكلمات الدالة: البروبوليس، الفعالية المضادة للأكسدة، القدرة الإرجاعية، الفولطاأمبيرومتري الحلقي.

Résumé:

L'objectif de la présente étude était de l'évaluation de la capacité antioxydant et la quantité des composes phénolique sur quatre échantillons de la propolis, deux échantillons de la région du sud de l'Algérie (El oued, Ghardaïa) et deux échantillons prélevés sur les régions (Khenchela, Japon), l'extraction de propolis a été faite par le méthanol.

La teneur en composés phénoliques totaux des extraits a été analysée par la méthode de Folin-Ciocalteu tandis que l'activité antioxydant a été mesurée par les tests du radical 2,2'-diphényle-1-picryle hydrazyle (DPPH), pouvoir réductrice (PR), voltamètre cyclique (CV).

Les résultats on montré que la propolis de Japon avait la plus grande teneur en composés phénoliques, suivie de la propolis de Khenchela, El oued et Ghardaïa. Par contre, la propolis de Khenchela montrait la plus grande activité antioxydante, suivie de la propolis de Japon, Ghardaïa et El oued.

Parmi les résultats obtenus, on remarque qu'il y avait une corrélation entre la méthode (CV) et des tests (PR), (DPPH) a atteint ($R^2 = 0.95$).

Mots clés: propolis, capacité antioxydante, pouvoir réductrice ,voltamètre cyclique

مقدمـــــة عامة

مقدمة عامة: على مدى العقود الماضية اقترحت طرق عديدة لتقييم النشاط المضاد للأكسدة، و هذا بالاعتماد على عدد من التقنيات نذكر منها على سبيل المثال: اختبار(DPPH) ، اختبار(FRAP) ، اختبار(ABTS)، اختبار(ORAC)، اختبار(TRAP) و اختبار القدرة الإرجاعية (PR)، هذه الطرق تعتمد على التلوين ونزع التلوين في طول موجي معين و هي طرق طيفية.(Spectrophotométrie). لكن بالرغم من الاعتماد على هذه الطرق و التقنيات التقديرية المذكورة، فان احد لا ينكر أن لكل طريقة ايجابياتها و سلبياتها، و قد أصبح واضحا للدارسين و الباحثين أن هاته التقنيات لم تعد كافية في ظل هذا الانتشار الواسع للأبحاث و الدراسات المطروحة في هذا المجال، حيث تثبت الإحصائيات أن عدد الأبحاث بلغ حتى عام 1996 أكثر من 16080 بحث منشور، و زادت هاته النسبة بين سنتي 1997 و 2006 بـ 345 % حيث وصلت إلى 55493 بحث منشور[1]، خاصة بعد الاكتشافات التي توصلت إلى أن الجذور الحرة و المتمثلة في انواع الأكسجين النشط (ROS) هي المسئولة عن تلف المواد الغذائية، و نشوء عدة أمراض مثل: داء السكري و الالتهابات المزمنة و بعض أنواع السرطان[2][3]، مما تطلب البحث عن طرق تحليلية جديدة دقيقة و سهلة للتقدير السريع لمضادات الأكسدة، من اجل ذلك قمنا بهذا العمل.

حيث تهتم هذه الدراسة بتجربة طرق كهروكيميائية جديدة لتقدير الفعالية المضادة للأكسدة للبروبوليس و تم اختيار هذا الموضوع لعدة اعتبارات أهمها:

- تميز الطرق الكهروكيميائية بالعديد من المزايا جعلتها تتصدر طرق التحليل الكيميائي سواء الكيفي أو الكمي و تكون طريقة مقترحة كبديل للطرق التقليدية لتقدير مضادات الأكسدة، خاصة بعد التوجه العام لهذه الطرق من قبل الدارسين و الباحثين في هذا المجال.
- اختيار البروبوليس للدراسة جاء بناءا على الاهتمام المتزايد بهذه المادة في المجال الطبي، فارتأينا دراستها و تثمينها 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[4][5] و التي كان من نتائجها وضع مشروع جدي للبحث في هذا المجال تكون هذه الدراسة لبنته الأولى.

تشتمل هذه الدراسة على ثلاث فصول أساسية:

الفصل الأول :

خصص لعموميات حول البروبوليس مصدره و خصائصه الفيزوكيميائية و خصائصه الطبية العلاجية.

الفصل الثاني:

و ينقسم إلى قسمين:

القسم الأول: تم فيه نظريا التعرف على المركبات الفينولية و خصائصها، و عمليا تم فيه استخلاص البروبوليس و التقدير الكمي للفينولات و الفلافونويدات في مستخلصاته.

القسم الثاني: تم فيه نظريا التطرق للجذور الحرة و أثرها و الفعالية المضادة للأكسدة و الطرق الطيفية لتقديرها، و عمليا تم استخدام اختبارين هما اختبار(DPPH) و اختبار القدرة الإرجاعية (PR) لتقدير الفعالية المضادة للأكسدة.

الفصل الثالث:

تم فيه نظريا طرح الطرق الكهروكيميائية لتقدير الفعالية المضادة للأكسدة، وقد كان التركيز على التقنية الفولطاأمبيرومترية الحلقية (CV) التي من خلالها استطعنا عمليا أن نقدر الفعالية المضادة للأكسدة لمستخلصات البروبوليس.

وفي الأخير نختم عملنا بمقارنة النتائج المتحصل عليها على مستويين:

- مقارنة بين الطرق الطيفية و الطريقة الفولطاأمبيرومترية الحلقية.
- مقارنة بين نتائج التقدير الكمي و الفعالية المضادة للاكسدة لبروبوليس الجنوب الجزائري و المناطق الأخرى.

وفي الأخير تم إنهاء الدراسة بعون الله ببعض التوصيات و تذييلها بملحق.

المراجـــع

4. م.خ. بلفار، بوليفينولات البروبوليس (دراسة- فصل- تحليل)، مذكرة مهندس دولة 2004، جامعة قاصدي مرباح بورقلة.

5.م.خ. بلفار، م.ب.بن ساسي، دراسة مقارنة بيت مستخلصات العكبر(البروبوليس) و المضادات الحيوية المستعملة ضد البكتيريا الممرضة للجهاز البولي،حوليات كلية العلوم و علوم المهندس، جامعة قاصدي مرباح ورقلة، Vol.1N° 3/2009.

المراجع الأجنبية:

1.L.M. Magalhaes, M.A. Segundo, S. Reis, J.L.F.C. Lima, *Anal. Chim. Acta*. 613(2008)1–19.

2.M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M.T.D. Cronin, M. Mazur, J. Telser, *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 39(2007)44.

3. M.Valko, , C.J.Rhodes, , J.Moncol, , M.Izakovic, M.Mazur, *Chemico-biological interactions.* 160(2006)1-40.

الفصل الأول

عمومیات حول البروبولیس

1.I.مقدمـــة:

تنتج العديد من النباتات صموغ ومواد راتنجية في أماكن الجروح أو حول البراعم أو الأوراق الجديدة[1]، هذه المواد تقي من الابتلال بالماء كما أنها تحمي من المهاجمة بواسطة البكتريا والعفن و الخميرة والفطريات و الحشرات والأعداء الأخرى[2][3]، وغالباً ما يجمع نحل العسل هذه المواد ويستخدمها بعد معالجتها بافرازاته داخل الخلية حيث تكسب عش النحل حماية مثل التي تحمي بها النبات، هذه هي مادة البروبوليس[4].

2.I.تعريف:

البروبوليس عبارة عن مواد صمغية راتنجية، ذات لون يتدرج من الأصفر حتى البني القاتم و يعود الاختلاف في اللون إلى انعكاس مدى التباين في مصادر جمعه [5]، رائحته مميزة مريحة كخليط من البراعم والعسل والشمع والفانيلا، و عند حرقها ينبعث منها دخان ذو رائحة عطرية ممتعة جدا ذكية تشبه روائح الراتنجات العطرية مثل الجاوي [6] [1]. لاذع المذاق، لزج الملمس، سهل الخلط مع شمع النحل.
كما يعرف البروبوليس أيضا بعدة أسماء منها العكبر و علك النحل و صمغ النحل وغراء النحل وسذاب النحل والصمغ الشمعي والراتنجي و الدنج و السميطة [1] [6].

يحمل النحل المواد المجنية إلى الخلية، ويحولها إلى جزيئات بواسطة بعض إفرازاته الذاتية (شمع و إفرزات لعابية خاصة) [7] لتلعب دورا رئيسا في سد الشقوق داخل الخلية وتصليح وتلميع وتعقيم المساحات الداخلية للنخاريب أثناء التبييض؛ وتحنيط جثث الكائنات الدخيلة مثل القوارض الصغيرة وغيرها, هذا التطهير من شأنه أن يمنع كل عمليات التعفن داخل الخلية[8].

3.I.تاريخ البروبوليس:

يقول الخبراء إن البروبوليس موجود منذ أكثر من 45 مليون عام، وأنه استخدم من قبل الإنسان منذ ألاف السنين[9]. لكن معرفة البروبوليس أقل قدما من معرفة العسل ويعتقد أنه عرف عند المصريين القدامى[10]، حيث أشارت النقوش المرسومة على جدران المعابد الفرعونية أنهم استخدموا البروبوليس للحفاظ على الصحة و الجمال كما استخدموه كمضاد حيوي طبيعي و مضاد للبكتيريا[11][12][13]. كما ثبت استخدامه في التحنيط، ولعلهم اكتسبوا ذلك من ملاحظتهم تحنيط النحل لجثث الكائنات التي تدخل خليته ولا يستطيع إخراجها بعد قتلها.

و كان أرسطو أول من كتب عن البروبوليس وأول من سماه "Propolis" و هي كلمة يونانية الأصل تتألف من مقطعين:

Pro : تعني قبل **Polis** : المدينة, وهو مدخل خلية النحل[9].

فالنحل البري يستعمل البروبوليس لإحكام مداخل خليته وسد الشقوق لمنع الحشرات، والهوام، وكذلك الهواء البارد من دخول الخلية.

و تحدث أرسطو في كتابه تاريخ الحيوان: البروبوليس دواء لأمراض الجلد والجروح والتقيحات[14].

كما استعمل أبوقراط البروبوليس كمرهم في علاج الجروح والقروح.وبعد أربعة قرون كتب الطبيب الروماني الشهير " ليني" عن فوائد البروبوليس في شفاء القروح وتخفيف التورمات وتطرية المناطق القاسية. واستعمل البروبوليس في القرون الوسطى كمادة مضادة لالتهابات جوف الفم ومضاد لتسوس الأسنان[9].

وقبل حوالي ألف سنة تقريبا ناقش الرومانيان :ديوسكوريد (Dioscoride) – بليني (Pline) مصدر هذه المادة وكتبا في شأنها: تنزع الشوك وكل ما يدخل الجلد, تنقص من التورم، وتلين تصلب الجلد، تنقص ألآم العصبة وتداوي القروح والدمل. [15]

وفي القرن الثاني جاء دور الطبيب (Gatien) ليتطرق إليها في أبحاثه وهذا قبل الفيلسوف والطبيب المسلم ابن سينا الذي كتب في صددها في القرن الحادي عشر: لديها قدرة على نزع حدود الأسهم والشوك بشكل فائق النظير[9][16]. و في بداية القرن الماضي زادت شعبية هذه المادة بشكل باهر حيث لم تكتشف المضادات الحيوية، وكان العلاج يتم بوضع مادة البروبوليس مباشرة على الجروح و التورمات.

و في السنوات الأخيرة استهوى البروبوليس فؤاد الباحثين بسبب اكتشاف خواصه المضادة للجراثيم، والمضادة للأكسدة، والمضادة للقروح، إضافة إلى فعاليته كمضاد للأورام السرطانية، حيث ان خلال الثلاثين سنة الأخيرة أجريت بحوثا تحليلية وصيدلية وطبية لهذه المادة في كل أصقاع العالم، و استطاعوا إن يحصروا الأهمية الكبرى للبر وبوليس في مركبات كيميائية متعددة الفينول. [17]

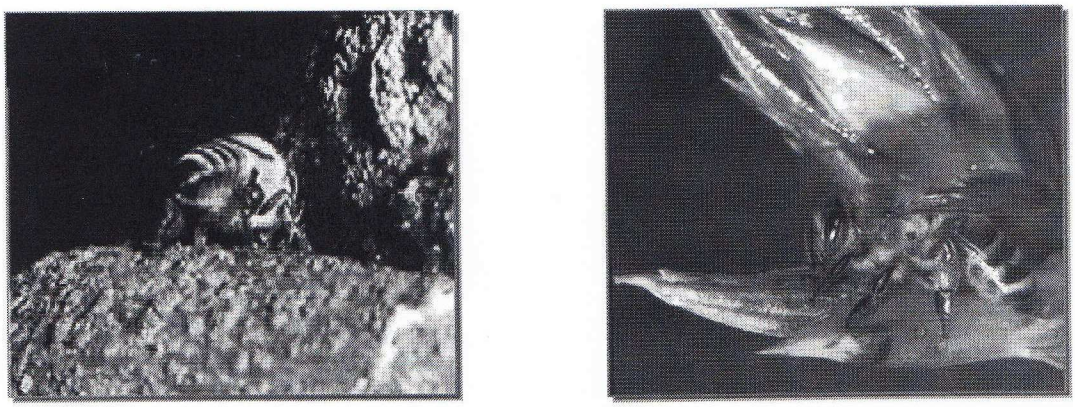
وقد نجح العلماء في تحديد التركيب الكيميائي لهذه الفينولات المتعددة (وهذا حسب مصادر جنيه) وعزل المواد الفعالة المسئولة عن نشاطه العلاجي[18].

I.4.جني البروبوليس:

هذه العملية يقوم بها عدد معين من النحلات العاملة الجامعة للرحيق هذه الأخيرة متخصصة في هذه المهمة ولا تقوم بغيرها[19] (الشكل (I.1))، و يتراوح إنتاج الخلية من 10 إلى 30 غ في السنة[20].

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

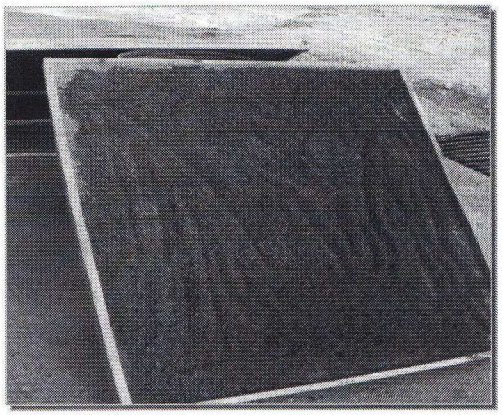
- **فصلي:** يكون الجني حسب الحالات في بداية فصل الربيع وخصوصا عند نهاية الإزهار أو عند اقتراب الخريف وبدء النحل في تهيئة المستوطنة لفصل الشتاء.
- **جغرافية المكان:** الخلايا الموجودة في المناطق الغابية تنتج البروبوليس باستمرار أكثر من الخلايا الموجودة في المناطق السهلية.
- **المناخ:** (درجة الحرارة) النحل الجامع للبروبوليس يكون أكثر نشاطا خلال الأيام الحارة (درجة الحرارة > 20°) وفي الساعات الأكثر تعرضا لهذه الحرارة (10سا – 15:30 سا) وهذا لأن المواد الصمغية تكون صلبة جدا خارج هذه الساعات ولايمكن جنيها [20].



الشكل (I.1): عملية جني المواد الصمغية من براعم و جروح الأشجار

كما يمكن أن يقوم الإنسان بعملية الجني بواسطة تقنيات متعددة ككشط أطر وجدران الخلية وفي درجات حرارة منخفضة حيث تكون المادة صلبة وقابلة للتفتت وتنفصل بسهولة عن الجدران. (الشكل (I.2)).

وتحدثت بعض المصادر على أن أفضل نوعية للبروبوليس المجني مباشرة بعد فصل الإزهار مباشرة، أي في فصل الصيف [20].

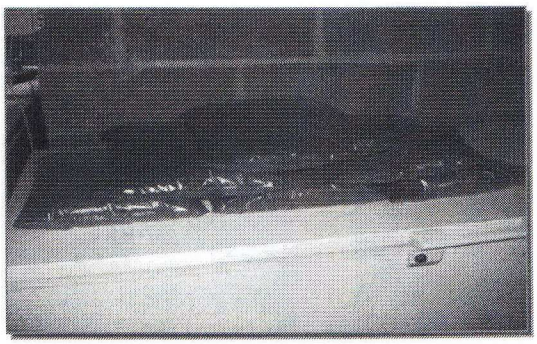


الشكل (2.I): بروبوليس تم جنيه من طرف الانسان

5.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) [21].

بعض التجارب أثبتت أن تخزين هذه المادة لفترة طويلة لا ينقص من كمية المركبات الكيميائية المكونة لها ولا من فعاليتها ضد البكتيريا (الشكل **(3.I)**).



الشكل (3.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 [22].

I.6.الخواص الفيزيائية والكيميائية (الظاهرية) [23]:

البروبوليس يظهر على شكل مادة مواصفاتها مايلي:

- ذات متانة متغيرة بتغير درجة الحرارة صلبة وتتفتت عند 15م° وطرية وقابلة للتشكيل في حدود 30م°.
- إذا سخنت بلطف في حمام مائي فإنها تنقسم إلى قسمين مميزين؛ قسم لزج يسقط إلى الأسفل وقسم سائل (cire de propolis) يطفو على السطح يستعمل هذا الجزء بكثرة في مجال تربية النحل.
- لونها يتغير حسب مصدرها من الأصفر الفاتح إلى البني الداكن تقريبا أسود مرورا بالسلسلة اللونية المنتشرة(حمراء.. خضراء....الخ)
- مذاقها لاذع وفي بعض الأحيان مر.
- البنية الميكروسكوبية للبروبوليس أصبحت معروفة حاليا نتيجة عمل مهم وجديد لـ (Colette Jeanson Et Philippe Marchenay) اللذان قاما بواسطة ميكروسكوب كهربائي بمسح على عينات من أنحاء فرنسا بأكملها والنتائج أثبتت دوما الحصول على نفس البنية المجهرية.
- مادة البر وبوليس لا تذوب في الماء ولكن تذوب جزيئا في الأستون، الكحولات، النشادر، البنزين، الكلوروفورم، ثلاثي كلوروإيثلين أو مزيج مناسب من مختلف هذه المذيبات.

I.7.المكونات الأساسية للبروبوليس:

يعتبر البروبوليس مادة طبية ذات مصدر نباتي و بالتالي كانت مثلها مثل النباتات الطبية حيث خضعت لدراسات من قبل الكيميائين النباتيين و الصيادلة و البيولوجيين، و يعتمد تركيب البروبوليس على

النباتات المحلية و الخصائص الجغرافية و المناخية للموقع، هذه الحقيقة تفسر التنوع الكبير لتركيبه و خاصة في المنطقة الاستوائية.

ذلك لا يمنع أن تكوين البروبوليس الأساسي يحتوي على الكثير من المواد المتواجدة بصفة ثابتة ومستقرة نسبيا مهما تنوع المصدر[24]، و ذلك راجع للنحل الذي يضيف بعض الافرازات اللعابية و الشمع للمادة الصمغية الخام، حيث أمكن معرفة النسب التالية[25]:

- 50 – 55% مواد راتنجية؛
- 25 – 35% شمع العسل؛
- 10% زيوت طيارة؛
- 5% لقاح أو غبار الطلع (الموجود في كل أجزاء الخلية كذالك)؛
- 5% مواد مختلفة عضوية ومعدنية.

وإلى حد الساعة تم فصل والتعرف على العديد من المكونات نذكر منها مايلي [26].

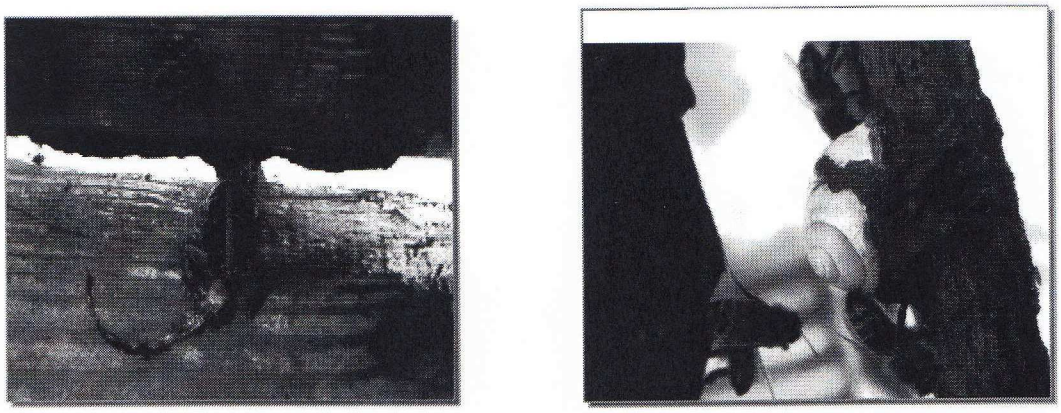
benzoic acid، Gallic acid، Caffeic acid، Ferulic acid، oleic acid، Cinnamic acid، Cinnamilidenacetic acid، Chlorogenic acid، Dicaffeoyl quinic acid، Chrysin، pinocembri، (أساس اللون الأصفر للبروبوليس)، Apigenin ، Quercetin، vanillin، p-Coumaric-methyl-butenyl ester ، Galangin، pinobanksin، p-Coumaric benzyl ester، Dicaffeoyl quinic acid، Kaempferide، Artepillin C، p-Coumaric، Isoferulic، Coumaric acid methyl ester، Isorhamnetin[27] [28].

بالاضافة الى المعادن: الألمنيوم، البار يوم، الكالسيوم، الكروم، الكوبالت، النحاس، الكبريت، الحديد، النيكل، الرصاص، السلسيوم، الستروتنيوم، التيتان، الفاناديوم، الزنك[20].

8.I.دور البروبوليس في خلية النحل:

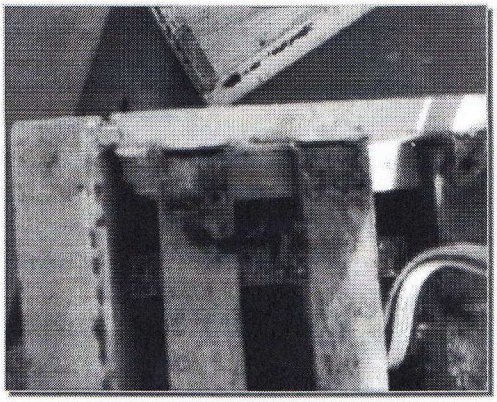
يستطيع النحل أن يحافظ على الخليه خالية من الأمراض على الرغم من كونها بيئة مثالية لتكاثر البكتريا و الطفيليات، هذه البيئة ذات درجة حرارة و رطوبة مرتفعتين بالإضافة إلى وفرة لثاني اوكسيد الكربون طوال السنة، و ترجع هذه الحصانة لمادة البروبوليس التي ينتجها، فالبروبوليس مضاد بكتيري [29][30] وصاد فطري [31][32] ومعطّل فيروسي[20][33] و مضاد للأكسدة[5] ، إضافة إلى أن عالم النحل عالم حضاري صغير نظيف ، إذ يقوم النحل بتنظيف الخلية و تعقيمها بواسطة البروبوليس.

- حيث يستخدم النحل البروبوليس في تحنيط الحشرات التي يمكن أن تتسلل إلى داخل الخلايا، حتى و لو كانت المتسللة حيوانات صغيرة مثل الفئران و السحالي حيث يقتلها أولاً بلسعها، ثم يقوم بلفها بالبروبوليس حيث يمنعها من التحلل، ثم يغطي هذه المادة بطبقة من الشمع حتى لا تلوث جو الخلية[34](**الشكل (4.I)**).



الشكل (4.I): صور لزواحف قتلها النحل وحنطها بواسطة البروبوليس [57]

- كما يستخدم النحل البروبوليس في سد الشقوق داخل الخلية و تضييق مدخلها في الشتاء.
- لصق الإطارات الخشبية مع بعضها البعض و تثبيت الأقراص الشمعية في سقوف الجحور أو الكهوف أو حتى الأشجار التي يسكنها (الشكل **(5.I)**).



الشكل (5.I): صورة لاستخدامات البروبوليس في تقوية أماكن ترابط الأقراص

- صقل و تنعيم الأجزاء الداخلية بالخلية.
- طلاء الجدر الداخلية للعيون السداسية الخاصة بالحضن.
- تقوية أماكن ترابط الأقراص.
- يقدم حماية طبيعية للنحل نظراً لطبيعته اللزجة حيث يقوم باصطياد الكائنات الدقيقة.
- حماية الخلية من الابتلال بالماء.

9.I.الأهمية الطبية للبروبوليس:

كثرت الأبحاث المنشورة عن البروبوليس و المحاضرات العلمية في الفترة ما بين 1980 حتى 1995 كانت حوالي 350 بحث و كانت تتناول التركيب الكيميائي و علاقتة بعلم الأدوية و استخداماتة الطبية و أكثر الدراسات عددا هي للولايات المتحدة الأمريكية بـ 32 بحث و ألمانيا 29 بحث و قد قامت كبرى الشركات الأمريكية بإنتاج كبسولات من البروبوليس[13].

في هذا الإطار يعتبر البروبوليس مضاد حيوي مهم وممتد إلى العديد من أنواع البكتريا[12].

حيث بينت الأبحاث أن مركبات البروبوليس تمنع تكاثر خمسة أنواع من بكتيريا (Staphylococcus) بالإضافة إلى نوع من السلمونيلا وأربعة أنواع من الفيروسات، بالإضافة إلى ذلك فإن مستخلص البروبوليس يزيد في فعالية بعض المضادات الحيوية هذا من جهة ومن جهة أخرى أثبتت تجارب تأثير محاليل البروبوليس على ستة أنواع من الجراثيم الشهيرة التي كثيرا ما تصيب الإنسان وتجعله أسير الفراش . وهي المكورات العنقودية، والإيشيريشا القولونية، والمكورات العقدية، والمكورات المعوية (Entercoccus Faecalis)، وعصية القيح الزرقاء (Pseudomonas) ، والـ (Bacillus

(subtilis، حيث تبين ان فعالية محاليل البروبوليس التي كانت تحتوي على نسبة من الفلافانويدات تزيد عن (1 %) فقط كانت قادرة على محاربة الجراثيم ولها خواص مضادة للجراثيم الستة التي تم دراستها[9].

- كما أثبتت التجارب أن أنواع البكتيريا المسببة للأمراض أكثر حساسية لتأثير البروبوليس من المضادات الحيوية العادية مثل: البنسلين، تتراسكلين، امبسلين، مونوميسين[35].
- كما يعتبر مخدر عنيف جدا وأكثر فعالية من الكوكايين وفضلا على ذلك تأثيره يكمن في بعض الآثار الثانوية[36].
- له خاصية بالغة الأهمية لتجديد النسيج الخلوي وتأثيرات حسنة على بعض الآليات التي تؤدي إلى تقوية الأرضية ضد الهجوم على البكتيريا بصفة عامة[37][38].
- كما يستعمل في علاج الأوعية والشرائيين الدموية وحالات فقر الدم وخفض نسب الكولسترول في الدم وحالات الضغط العالي[39].

ودلت الأبحاث الطبية التي لا تزال متواصلة لحد الساعة لهذه المادة عن قيم علاجية كبيرة نذكر منها:

- يستخدم في الالتهاب الكبدي الفيروسي[40]، و ذلك كمضاد للفيروس، و منبه لإنتاج الإنتروفين.
- يستخدم كمداوي عام للقروح و التهابات الأمعاء.
- يستخدم في حالة التهاب الأمعاء الناتج عن التسمم.
- يساعد في تأخير أو إعاقة تكاثر الخلايا السرطانية. حيث أكدت أبحاث السرطان قدرة أحماض ألكافييك الموجودة في البروبوليس على تثبيط نمو الخلايا السرطانية إذ يعمل على تعزيز قدرات جهاز المناعة بشكل عام و الخلايا الليمفاوية بشكل خاص، و تحثها على إفراز العامل المضاد و الذي يقضي على الخلايا المصابة بالسرطان، فأحماض ألكافييك تختار الخلايا المصابة بالسرطان وتتلفها أو تمنع انتشارها دون أن تُلحق أي ضرر بالخلايا السليمة، على عكس الأدوية الكيمائية التي تقضي على الخلايا المصابة والسليمة على حد سواء[41][42]، كما اثبت فعاليته كمضاد لسرطان الجلد الخطير المعروف باسم الملانوم (الورم الملاني)[43] و أيضا فعال ضد سرطان القولون[44].
- وبينت دراسات حديثة أن أحماض ألكافييك وحمض الفيروليك استر (Ferulic acid) تقاوم سرطان الثدي والورم القتامي[45].
- مقوي عام حيث يزيد النشاطات الطبيعية و النشاطات الذهنية [35].
- ينبه الجهاز المناعي و يهدئ الحساسية [35].

- أمراض الغدة الدرقية [35].
- إدرار البول و زيادة إفراز العصارة المرارية [35].
- التهابات الأذن والأنف والحنجرة[35].
- أمراض الفم (الأسنان[46]، اللثة، الرائحة الكريهة[47]).
- أمراض الرئة والنزلات الصدرية الحادة(السل)[48].
- أمراض الكلى والمثانة بشكل أخص[49].
- الأمراض التناسلية[50] (خاصة غدة البروستاتة عند الرجال والتشنجات المهبلية عند النساء).
- الالتهابات الجلدية (حروق درجة أولى، ضربات الشمس، كل الآثار الطويلة و الصعبة) حيث استعمل البروبوليس لمعالجة الجروح والحروق والتسلخات الجلدية الملوثة بالجراثيم والفطريات، وأعطى نتائج مذهلة في القضاء التام على الجراثيم وفي سرعة التئام الجروح وتكوين أنسجة جديدة بدلا من تلك التالفة. كما تم علاج حروق شديدة في فئران كانت ملوثة بجرثومة السيدوموناس (Seudomonas) المقاومة للمضادات الحيوية بمرهم يحتوي على البروبوليس بنسبة (3%) فتحقق شفاؤها تماما خلال يومًا دون حدوث تأثيرات جانبية.
- ازالة الجسأة (الكلس) في القدم (وهي الجزء المتصلب في الجلد).
- التهابات العين [35].
- الحالات العصبية (القلق) [51].
- السكري[52].
- يفيد في حالة كسر العظام حيث يساعد على إعطاء شفاء أفضل للمريض.
- الروماتيزم[53].
- مضاد لداء فقدان المناعة السيدا[54][55].

10.I.الأشكال الصيدلانية للبروبوليس:

وهنا يجدر بنا أن نشير أن العلاجات التي تعتمد على البروبوليس تستوجب التقنية و المراقبة الطبية، والبروبوليس لا يجب أن يؤخذ كمادة نقية وعلى هيئتها وهذا لوجود شوائب كثيرة يجب التخلص منها قبل أي استعمال، فالبروبوليس المحضر طبيا يكون على أشكال عدة:

مرهم للجلد أو عجين للمضغ أو شكل كبسولات شرجية، أو مضغوطات للتناول عن طريـــق الفـــم أو شراب على شكل مستخلص أو محلول للتقطير (**الشكل (6.I)**) [56].

وهناك أشكال أخرى كمعجون الأسنان ، والكريمات ، وغسول الشعر ، و الصابون ، والمحلول المائي وغيرها .

الشكل (6.I): بعض الأشكال الصيدلانية للبروبوليس[57]

وبينت الأبحاث الأخيرة أن للبروبوليس حظوة كبيرة في ميدان الطب وكذا ميدان التجميل ففي الأول يقوي المناعة ويزيد البروتينات في الدم بتجديدها وكمضاد للحمى والالتهابات.
وفي الميدان الثاني يستعمل مضاد للالتهابات نازع للرائحة الكريهة مجدد لخلايا الجلد ومثبت لدرجـــة رطوبته مزيل للنقاط السوداء وحب الشباب[35].

11.I.استعمالات أخرى للبروبوليس:

1.11.I.التغذية: يستخدم البروبوليس كعامل منكه مفضل في الطعام ويمكن أن يضاف إلى المواد الغذائية نظرا للرائحة و النكهة الذي يتمتع بها و خير مثال على ذلك الحلويات و المشروبات (الشكل **(6.I)**)، كما يستعمل في برامج الحمية الغذائية.

الشكل (7.I): الاشكال الغذائية للبروبوليس[57]

2.11.I.الصناعة: كما أن للبروبوليس استعمالات في الصناعة نذكر منها:

- ✓ تلميع الذهب والفضة بمسحها بالمحلول الكحولي للبروبوليس.
- ✓ تلميع الجلود بزيت مذاب به البروبوليس حيث يعطيها لمعاناً متميزا.
- ✓ مقاومة الصدأ في الأدوات والمعدات وذلك بطلائها به.
- ✓ طلاء و لصق الأخشاب، حيث اكتشف حديثا أن أكثر آلات الكمان النفيسة في العقدين الماضيين (بما فيها الآلات التي صنعها الإيطالي الشهير ستواديفاري) كانت قد عوملت و ألصقت بالبروبوليس . ويقال أن هذا الغراء هو المسئول أيضا عن تميز صوت هذه الآلات[9] [19].

المراجـــع

1. V.Bankova, S. L. D.Castro , M. C. Marcucci,. *Apidologie*, 31 (2000) 3–15.
2. V.Scazzocchio, F.D. D'Auria, D. Alessandrini, E. Pantanella, *Microbiological research,*161 (2006) 327-33.
3. E.Crane, Beekeeping: Science, Practice and World Recourses, Heinemann, London, 1988.
4. T.P. Cushnie, A.J. Lamb, Int. *J. Microbiol. Agents*, 261 (2005) 343–356.
5. P.G. Pietta, *J. Nat. Prod*, 63 (2000) 1035–1046.
6. R. Farre, I. Frasquet, A. Sánchez,. *Ars Pharmaceutica*, 45 (2004) 21-43.
7. A. Sales,. Alvarez, *Journal of Hazardous Materials* A137 (2006) 1352–1356.
8. M. Tamas, J. Martinesku, F. Jonesku, *Stud. Cercet. Biochim.* 22 (1979) 207.
9. Z.A.Makashvili,.From the history of propolis. In Remarkable hive product : Propolis.APIMONDIA, Bucharest, (1978).
10. M.Eleni,. S.Eleftherios,. C.Ioanna,. *Food Chemistry* 103 (2007) 375–380
11. M. C.Marcucci,. *Apidologie* 26(1995) 83–99.
12. A. H.Banskota, , Y.Tezuka, , I. K.Adnyana, , E.Ishii, , K.Midorikawa, , K.Matsushige, , *Phytomedicine* 8 (2001)16–23.
13. S.Castaldo,F. Capasso, Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, 73(2001)S1–S6.
14. M. Vanhalen and R. Vanhaelen-Fastré, *J.Pharm. Belg.*,34(1979)207.
15. N. Ohta, G. Ruvata, H. Akahon and T. Watanabe, *Agr.Biol.Chem.* 43 (1979) 1415.
16. D. Strack and J. Krause, *J. Chromatogr.*,156 (1978)359
17. J. Fisher and T. Wheatan, *J. Agr.Food Chem.*,24 (1976) 898
18. L. Wulf and C. Nagel, *J. Chromatogr.*, 116 (1976) 271.
19. P. Lavie, in A Remarkable Hive Product :Propolis, Apimondia, Bucharest, (1978), 41.
20. R.Krell Value-added products from beekeeping. FAO Agricultural Services Bulletin N°. 124. Rome 1996.
21. E. Schneidewinde, H. Kala, B. Linzer and J. Metzner, *Pharmazia,*30 (1975) 803.
22. V. Bankova, S. Popov and N. Marekov, *J. Nat. Prod.*, 46 (1983) 471

23. S. Nikolov, E. Georgieva, V. Vasilev, S. Todorov and S. Drianska, in Proceedings of The International Congress of Apiculture, Grenoble, 8-14 Sptember 1975, Apimondia, Bucharest, 1976, p. 235.

24. H. R., Schulten, N. Simmleit and R. Mueller, *Anal. Chem.*,61(1989)221.

25. R. P. Mantovani et al. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* 14 (2008) 365.

26. W. Greenaway, J. May, T. Scaysbrook, F.R. Whatley, *Zeitschrift fur Naturforschung C* 46 (1990) 111–121.

27. V. Bankova, *J. Nat. Prod.*, 52(1990) 821.

28. T.KUSUMOTO, , R.H.MIYAMOTO, S.DOI, , S.HIROYUKI, , H.YAMADA, *Chem. Pharm. Bull*, 49(2001)1207-9.

29. M.Kartal, , S.Yildiz, , S.Kaya, , S.Kurucu, , G.Topcu, *Journal of Ethnopharmacology*, 86(2003)69–73.

30. A.Kujumgiev,I.Tsvetkova, , Y.Serkedjieva, V.Bankova, , R.Christov, S.Popov, *Journal of Ethnopharmacology*,64(1999)235–240.

31. E.Strehl, R.Volpert, , E. F. Elstner, *Zeitschrift fur Naturforschung C*, 49 (1994) 39–43.

32. L.Wang, , S.Mineshita, , I.Ga, T.Shigematsu, T.Matsuno, *Japanese Journal of Pharmacological Therapeutics*, 24 (1993) 223–224.

33. M.Amoros, E.Lurton, J.Boustie, L.Girre, F.Sauvager, M.Cormier, *Journal of Natural Products*, 64 (1994)235–240.

34. W.Brumfitt, J.T.M. Hamilton-Miller, I.Franklin,. *Microbios* 62(1993)19-22.

35. F. Dominique « La Propolis et son utilisation en Pharmacie »(Thése de doctorat en chimie no79 Clermont 1 (1982)).

36. R. Christov and V. Bankova, *J. Chromatogr.* 623 (1992) 182-185.

37. Dr. Castel Alain « Propolis et Art dentair » (No spécial Apitherapie 1981p. 52-56)

38. N.B.TAKAISI-KIKUNI, H.SCHILCHER. *Planta Med.* 60(1994) 222-7.

39. H.U.Fuliang, H.R.Hepburn, H.Xuan, M.Chen, S.Daya, S.E.Radloff. *Pharmacol Res.* 51(2)(2005)147-52.

40. S.M.Drogovoz, A.I.Tikhonov, V.V.Slyshkov, S.I.Sal'nikova. *Eksp Klin Farmakol.* 57(4)(1994)39-42.

41. M.R.Ahn, K.Kunimasa, T.Ohta, S.Kumazawa, M.Kamihira, , K.Kaji, , Y.Uto, H.Hori, H.Nagasawa, T.Nakayama, *Cancer Letters.* , 252 (2007) 235–243.

42. T.Kimoto, S.Arai, M.Aga, T.Hanaya, M.Kohguchi, Y.Nomura, , M.Kurimoto, *Gan-To-Kagaku-Ryoho*, 23 (1996)1855–1859.

43. C.N.Chen, C.L.Wu , J.K.Lin. *Cancer Letters*, 245 (2007) 218–231.

44. K. Shimizu, S.K.Das , T.Hashimoto, Y.Sowa, T.Yoshida, T.Sakai , Y.Matsuura, K.Kanazawa, *Mol Carcinog*.44(4) (2005) 293-9.

45. R.Padmavathi, P.Senthilnathan, D.Chodon, D.Sakthisekaran. *Life Sci*(2005)

46. M.F.Hayacibara, H.Koo, P.L.Rosalen , S.Duarte, E.M.Franco, W.H.Bowen, M.Ikegaki, J.A.Cury. *J Ethnopharmacol.*101(1-3)(2005) 110-5.

47. A.Uzel, K.Sorkun, O.Oncag, D.Cogulu, O.Gencay, B.Salih. *Microbiol Res*.160(2) (2005)189-95

48. S.Scheller, S.Dworniczak, K.K.Waldemar, M.Rajca, A.Tomczik, J.Shani, *Zeitschrift fur Naturforschung C*, 54 (1999)549-53.

49. Y.J.Li, J.L.Lin , C.W.Yang, C.C. Yu . *Am J Kidney Dis*.46(6) (2005) 125-9.

50. M.Amoros, E.Lurton, J.Boustie, L.Girre, F.Sauvager, M.Cormier, *Journal of Natural Products*, 57 (1994) 644–647.

51. C.Noelker, M.Bacher, P.Gocke, X.Wei, T.Klockgether, Y.Du, R.Dodel. *Neurosci Lett.* 383(1-2)(2005)39-43.

52. H.Okutan, N.Ozcelik, HR.Yilmaz, E.Uz. *Clin Biochem*.38(2)(2005)191-6.

53. F.Hu, H.R.Hepburn, Y.Li, M.Chen, S.E.Radloff, S.Daya. *J Ethnopharmacol.* 100(3) (2005) 276-83.

54. G.Gekker, S.Hu. M.Spivak , James R. Lokensgard, Phillip K. *Journal of Ethnopharmacology*, 102 (2005) 158–163

55. J.Ito, , F.R.Chang, H.K.Wang, Y.K.Park, M.Ikegaki, N.Kilgore, K.H.Lee, *Journal of Natural Products*, 64 (2001) 1278–1281.

56. L. Wulf, C. Nagel, *J. Chromatogr.*, 116 (1976) 271.

57. http://www.jordanbru.info/artical.htm

الفصل الثاني

المركبات الفينولية الطبيعية
و
الفعالية المضادة للأكسدة

الجزء الأول

المركبات الفينولية الطبيعية

الجانب النظري 1

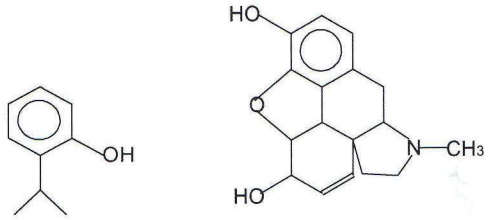
II.1.المركبات الفينولية الطبيعية:

II.1.1.تعريف:

تشكل المركبات الفينولية المستخلصة من النباتات حيزا كبيرا في حقل المنتجات الطبيعية نظرا لكثرة عددها ولتباين هياكلها، الأمر الذي يستدعي دراستها في مراجع متخصصة على هيئة مجموعات وفقا لهذه الهياكل.

والعنصر الأساسي المميز لها هو وجود حلقة بنزينية واحدة على الأقل، حاملة لمجموعة هيدروكسيلية حرة أو مرتبطة بوظيفة أخرى (إيثر، أستر، سكر) غير أن تعريفا كيميائيا صرفا للفينولات بهذه الطريقة يعد غير كاف لتشخيص المركبات الفينولية النباتية [1] ،إذ أن هناك منتجات أيضية ثانوية أخرى تشمل هذا التعريف أيضا ولكنها تنتمي إلى مجموعات كيميائية نباتية مختلفة مثل بعض القلويدات (كالمورفين Morphin) وبعض التربينات (كالتيمول Thymol) الشكل رقم **(1.II)** التي تضم في بنائها حلقة بنزينية ومجموعة هدروكسل فينولية مما يستوجب إدخال شرط الاصطناع الحيوي لحصر حدود هذه المجموعة [2]، وعليه ليكون تعريف المركبات الفينولية أكثر ضبطا ،يستوجب أن يكون على النحو التالي :

مشتق غير آزوتي حاوي على حلقة بنزين أو أكثر تحمل مجموعة هدروكسيل حرة أو مرتبطة بوظيفة أخرى تكونت حلقاتها العطرية إما من حمض شيكيميك أو عديد الأستات[3] [4].

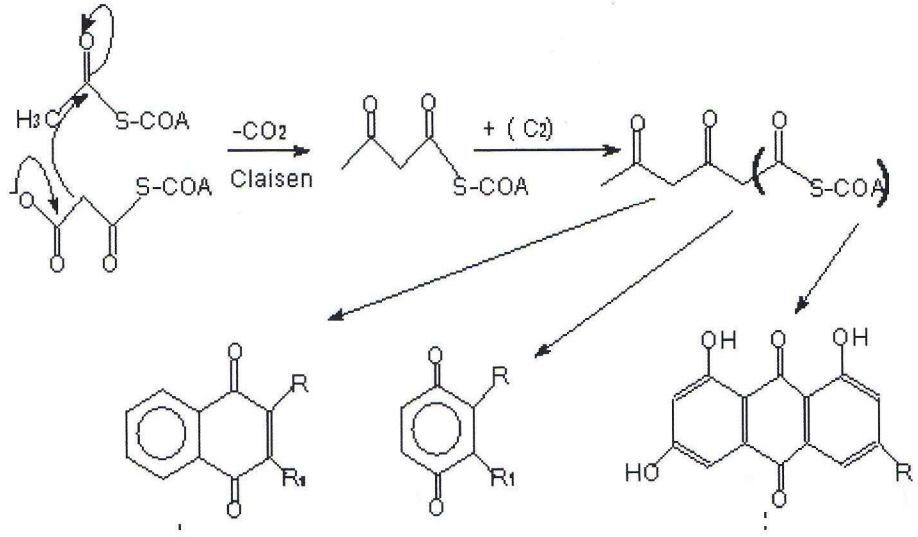


Thymol Morphie

الشكل (1.II):نموذجين لمركبين غير فينوليين

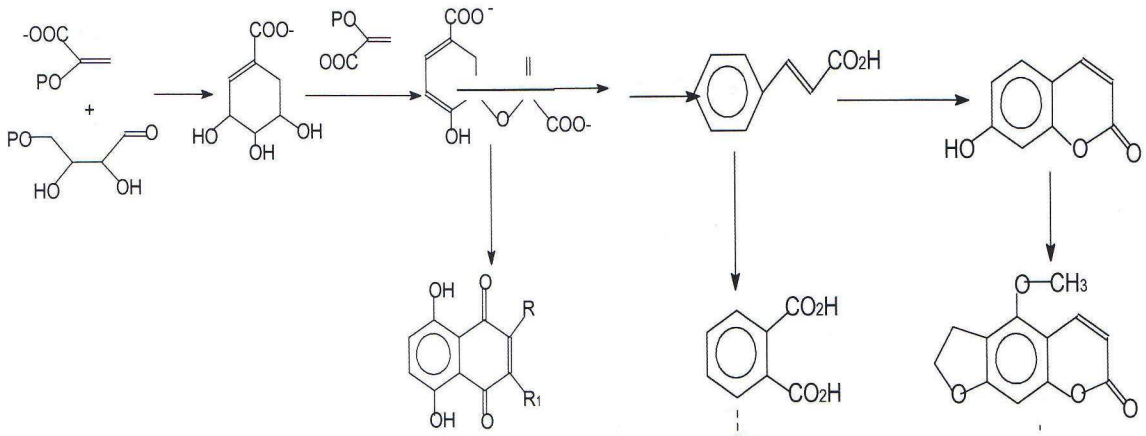
II.2.1.الإصطناع الحيوي الأولى لمركبات فينولية (مصدر المركبات الفينولية)

II.1.2.1.الإصطناع إنطلاقا من عديد الأستات: كما هو موضح في الشكل(2.II) [5]



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

II.2.2.1.الإصطناع إنطلاقا من حمض شكيميك: كما هو موضح في الشكل(3.II) [5]



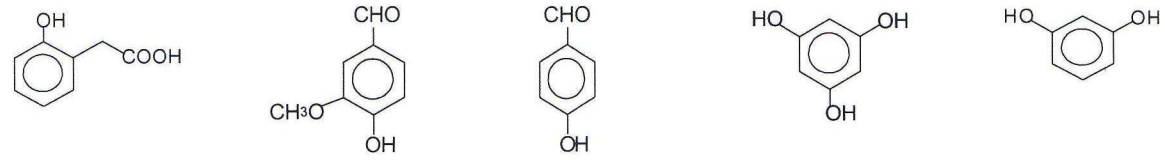
الشكل (3.II): تصنيع الفينولات إنطلاقا من حمض شيكيميك

II.3.1.أقسامها: يمكن تقسيم المركبات الفينولية الطبيعية تبعا لتوجدها وتعقيداتها و حسب Harborne et simmonds (1964) إلى[1][6]:

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

II.1.3.1. عائلة المركبات الفينولية قليلة الانتشار:

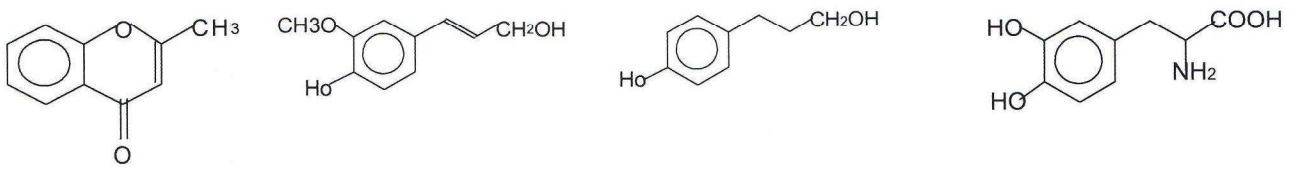
أ- المركبات الفينولية من الشكل C_6 , C_6-C_1 , C_6-C_2: وهي مركبات ذات هياكل بسيطة قليلة الانتشار في الطبيعة الشكل **(4.II)**، وتعد في معظم الأحيان مكونات للزيوت الطيارة وهي في الغالب كحولات، ألدهيدات، كيتونات.



Ac.o-hydroxy phénylacétique | Vanilline | p.hydroxy benaldehyde | Phloroglucinol | Résorcinol

الشكل (4.II): المركبات الفينولية من الشكل C_6 , C_6-C_1 , C_6-C_2

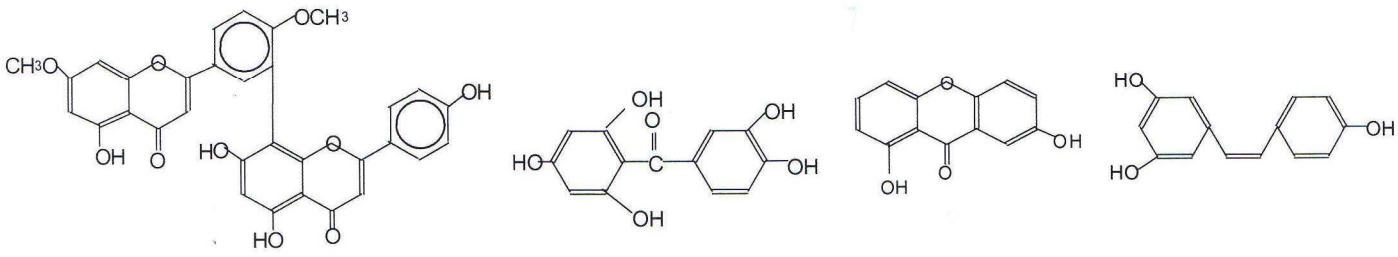
ب- المركبات الفينولية من الشكل C_6-C_3 , C_6-C_4 : بعض الهياكل موضحة في الشكل **(5.II)**.



Chromone | Alcool coniférique | Tyrosol | 3.4-dihydroxphénylalamine

الشكل(5.II): نماذج للمركبات الفينولية من الشكل C_6-C_3 , C_6-C_4

ج. المركبات االفينولية من الشكل: C_6-C_1-C_6 , C_6-C_2-C_6 ،: بعض منها في الشكل **(6.II)**

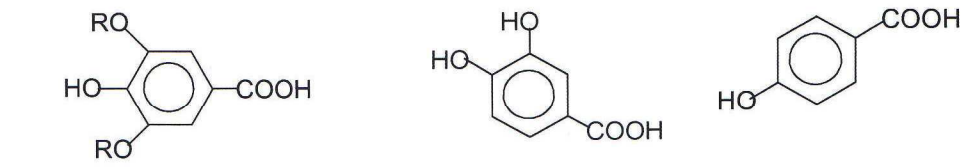


Genkgétine | Maclurine | Euxanthono | Resvératrol

الشكل(6.II): بعض النماذج للفينولات من الشكل: C_6-C_1-C_6 , C_6-C_2-C_6 ، ثنائي الفلافونيل

II.2.3.1.المركبات الفينولية الواسعة الانتشار:

أ. أحماض بنزويك C7 و أحماض سيناميك C9: نوضح في الشكلين **(7.II)** **(8.II)** مختلف أقسام هذه المركبات .



R=H Ac.gallique

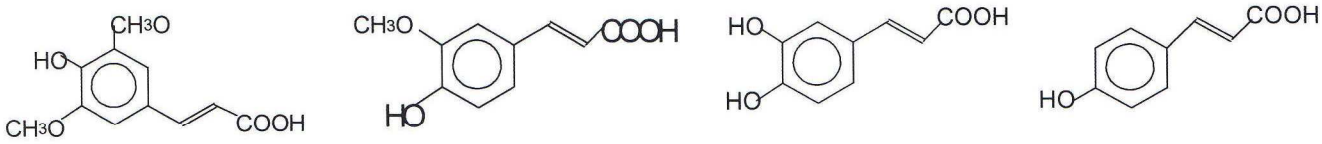
R=CH_3 Ac.syringique

Ac-protocatéchiqu

Ac-P-hydroxy benzoique

الشكل(7.II): نماذج لأحماض البنزويك

أحماض السيناميك أربعة مركبات لا يخلو أي عنصر نباتي من إحداها على الأقل:



Ac.sinapique

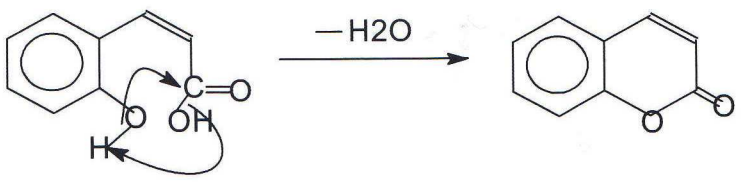
Ac.ferullque

Ac.cafeique

Ac.p-coumarique

الشكل(8.II): أمثلة لأحماض السيناميك

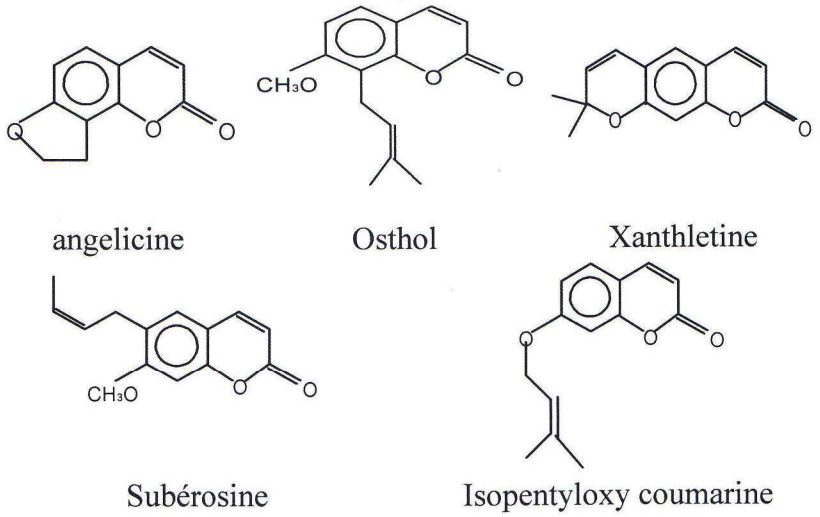
ب. الكومارينات: تتشكل حلقتين سداسيتين إحداهما عطرية والأخرى مغايرة ذات البنية C_6-C_3 شكلها العام وكيف تتكون وبعض الامثلة موضح أدناه في الشكلين **(9.II)** و**(10.II)**:



Ac.o-hydroxy cinnamique

Coumarine

الشكل(9.II): تشكل الكومارينات



angelicine Osthol Xanthletine

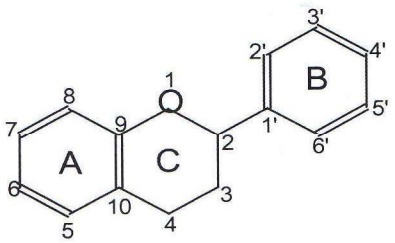
Subérosine Isopentyloxy coumarine

الشكل(10.II): بعض نماذج الكومارينات

ج.الفلافونويدات :

تعريف: كلمة الفلافونويدات مشتقة من اللفظ اللاتيني (Flavous) التي تعني اللون الأصفر وهي عبارة عن صبغات ملونة تنتشر في معظم الأصناف النباتية (إلا أن وجودها قليل في الطحالب، السرخس) خاصة عند كاسيات البذور تتمركز بصفة خاصة في الجزء الهوائي من النبات على شكل مركبات ذات أساس سكري (وجود السكر في الجزيئة يكسبها القدرة على الإذابة في الماء) أو على شكل مركبات حرة في الفجوات والسيتوبلازما والأغشية الليفية، تم استخراج أكثر من 4000 فلافانويد طبيعي[7][8][9].

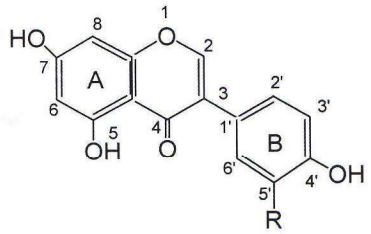
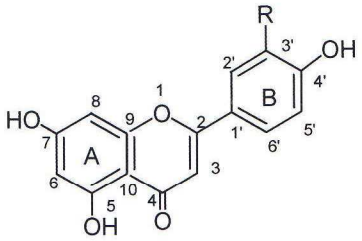
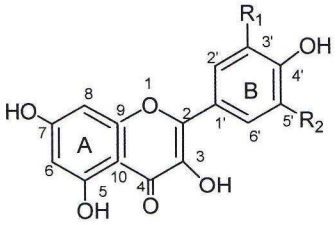
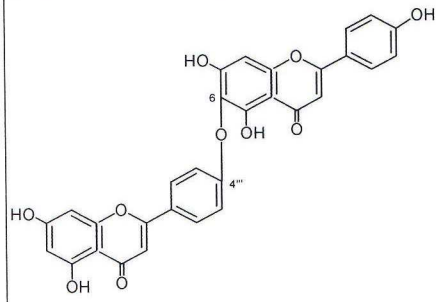
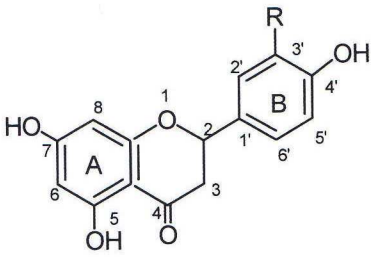
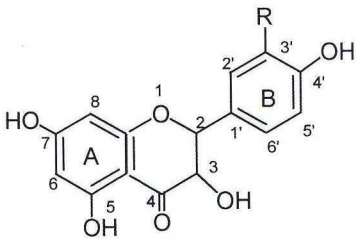
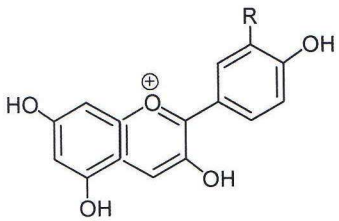
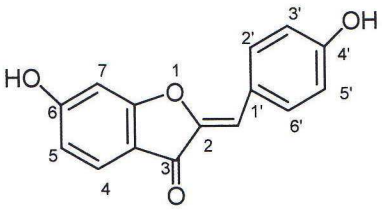
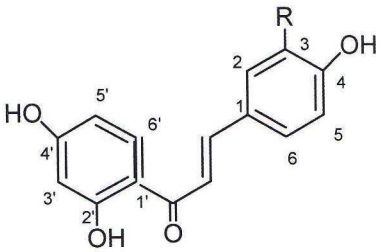
و الفلافونويدات هي مركبات ملونة عموما ذات كتل جزئية منخفضة تتميز بهيكل أساسي يحتوي على 15 ذرة كربون موزعة على حلقتين عطريتين A و B مرتبطتين بحلقة C غير متجانسة تحتوي على ذرة أكسجين من الصيغة C_6-C_3-C_6 كم هو موضح فيما يلي[10][11].



الشكل(11.II): الهيكل الأساسي للفلافونويدات

تصنيف الفلافونويدات:

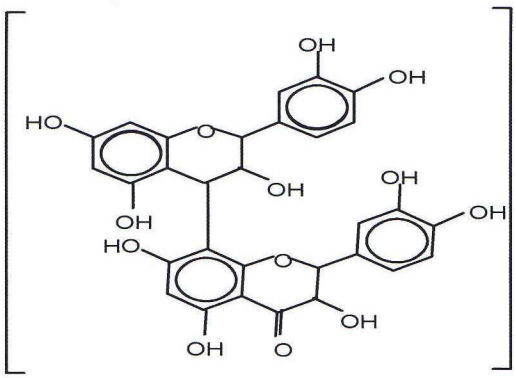
بنيويا تتفرع إلى عدة أنواع تبعا لعدد، موضع و طبيعة المستبدلات والشكل (12.II) يوضح مختلف أقسام هذه المركبات[1]:

 **الإيزوفلافونات ISOFLAVONE** R=H,Genistein R=OH,Oroble	 **الفلافونات Flavones** R= H,apégénine R = OH,lutéoline	 **الفلافونولات Flavonols** R_1,R_2=H ,Kaempférol R_1= OH,R_2=H ,quercetine
 **الفلافونويدات الثنائية** **BIFLAVONOID** Hinokiflavone	 **الفلافانون FLAVANONES** R=H,Naringétol R=OH,Eriodictyol	 **ثنائي هيدروفلافونول** **DIHYROFLAVONOL** R=H,Dihydrokaempférol R=OH,Dihydroquercétol
 **الأنثوسياندين** **ANTHOCYANNDINE** R=H,Pelargonidine R=OH, Cyanidine	 **الأورونات AURONES** Hispidol	 **الشالكونات CHALCONES** R=H,Isoliquiritigénine R=OH, Butéien

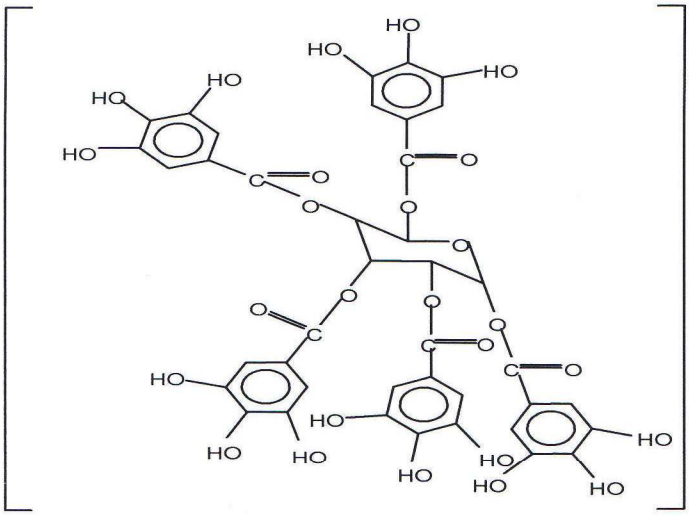
الشكل(12.II): أنواع مركبات الفلافونويدات

II.3.3.1.المركبات الفينولية المتواجدة على صورة بوليميرات:

- **التانينات:** هي مركبات ذات بنى معقدة وزنها الجزئي من 500 إلى 3000 وحدة، تستعمل في الدباغة طعمها غير مستساغ ترسب القلويدات والبروتينات وهي نوعان[6]:
- **التانيتات المتحللة :** هي عبارة عن شق سكري مرتبط بوحدات من حمض غاليك و تذوب في الماء.
- **التانينات المتراكمة :** لا تذوب في الماء تملك البنية العامة للفلافونيدات الشكل رقم **(13.II)** .

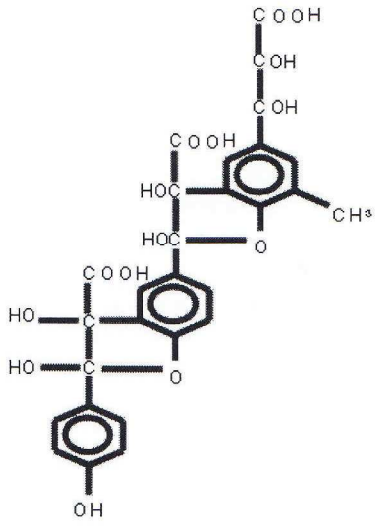


الشكل (A.13.II): وحدة التانينات المتراكمة



الشكل (B.13.II): وحدة التانينات المتحللة

- **ليقنين:**هي بوليمرات ذي بنية منتظمة كارهة بشدة للماء مكونة من أساس من وحدات فنيل بروبانC_6-C_3، وهي كذلك شق غير سكري قليلة التواجد في الخضر والفواكه[7].



الشكل (14.II): جزيئة ليقنين

II.4.1.أهمية الفينولات و الفلافونويدات:

أ- الفينولات: بالرغم مما تقدمه المركبات المستخلصة من النباتات من فوائد عظيمة للإنسان، فإن دورها للنبات نفسه لم يكن معروفا، فكثفت الأبحاث على زراعة الأنسجة النباتية داخليا-التجارب التي تحدث على النبات وهو يقوم بجميع وظائفه (in vivo) -وخارجيا-التجارب التي تتم داخل أنابيب الاختبار (in vitro) - أدت إلى معرفة الدور الفسيولوجي لمنتجات الأيض الثانوي [12]، فهي تؤمن العيش للنبات في ظروف حياتيه قاسية، يكمن دور الفينولات في مراقبة نمو و تطور النباتات بطريقة مباشرة أو غير مباشرة وذلك بتشكيلها معقدات مع هرمون النمو وقد لوحظ أيضا أن الفينولات تلعب دورا في وقاية النباتات من الأمراض التي تسببها البكتيريا والفطريات فهي مبيدات الحشرات أو مضادات حيوية، فبعض النباتات تفرز مركبات فينولية على مستوى الأوراق والجذور كمواد سامة ضد نمو النباتات المتطفلة [6].

في المجال الاقتصادي: لها أهمية كبيرة في الصناعات الغذائية حيث تستعمل كمضادات للتأكسد ومثبطات للإنزيمات. كما يتم إستعمالها في صناعة مواد التجميل حيث تحمي البشرة الخارجية من الأشعة فوق البنفسجية[1] [6].

في المجال الطبي: تملك خصائص علاجية متنوعة إذ تؤدي دورا كبيرا في ميدان الطب والصيدلة لما لها من تأثيرات على الكائنات الحية عامة [13]، وعلى الإنسان خاصة فهي تحمي الأوعية الدموية، مضادة للالتهابات، منها مثبطة ومنها محفز للإنزيمات، مضادة للأورام.تحتوي الفينولات على المجموعات الهيدروكسيلية (OH) فكلما كثر وجودها في المركب زادت في نشاط المضاد (المقاومة للأورام)، تعد قناصات (مفخخة) للجذور الحرة فهي تمنح الهيدروجين ليوقف عملية انتشار الجذور.

ونبين بعض المركبات الفينولية التي تستعمل لعلاج العديد من الأمراض في الجدول **(1.II)** [13]:

الجدول (1.II) : بعض المركبات الفينولية المستعملة في الطب و الصيدلة

المركب الفينولي	الأمراض المعالجة
▪ ليقنان	▪ مضادات للسرطان
▪ الكومارينات	▪ حماية الأوعية الدموية ▪ مضاد للأمراض الجلدية (البهاق)
▪ الفلافونويدات	▪ مضادات للالتهاب ▪ مضادات للسرطان ▪ تخفض ارتفاع الدم ▪ مدرة للبول ▪ مضادات للأكسدة ▪ تمنع تخثر الدم
▪ التانينات المتراكمة و المتحللة	▪ مضادات للأكسدة
▪ الأحماض الفينولية	▪ مضادات للبكتيريا ▪ مضادات للأكسدة

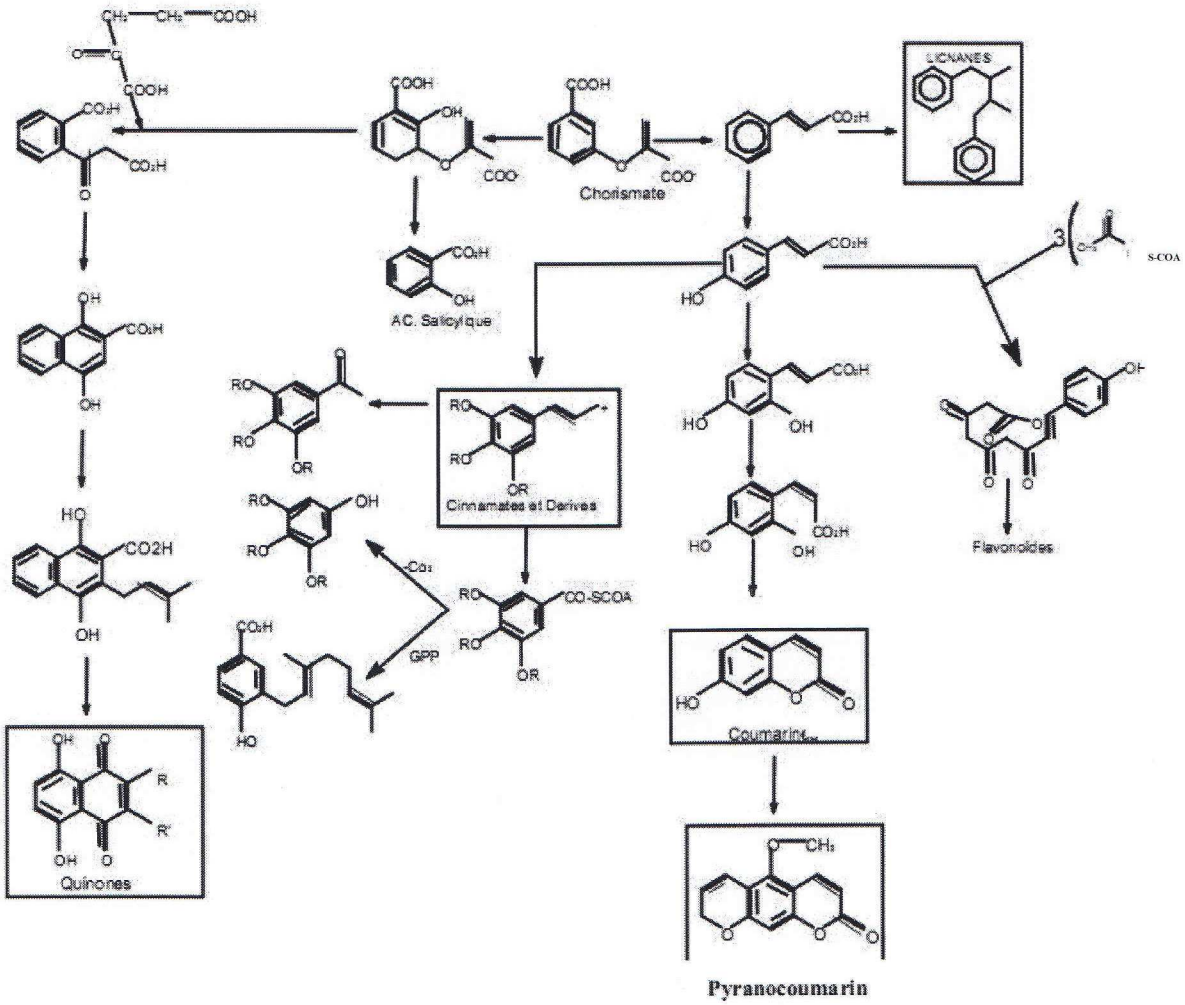
ب – الفلافانويدات: الدراسات المكثفة في المجال الطبي أظهرت الفعاليات المختلفة منها ما هي مضادة للسرطان[14] و مضادة للفيروسات، حيث تعمل على تقوية الجهاز المناعي وزيادة في النشاط المضاد للورم، هذه الميزات العلاجية أعطتها أهمية بالغة في الصناعة الصيدلانية و الجدول **(2.II)** يوضح بعض المركبات الفينولية المستعملة في الصناعة الدوائية.

الجدول (2.II): بعض مركبات الفلافانويدات المستعملة في الصناعة الدوائية

اسم الفلافانويد	الأمراض المعالجة
Cirsiliol	ضد الإسهال، مساعد للهضم[9]
3-Rutinosidekaempferol	معالج لأزمة البواسير و معالج الاضطرابات العرقية القلبية[15]
Quercetine	مضاد للملا ريا[9]
Morine	معالج شلل الأطفال الفيروسي[9]
Rutinoside-7-Hesperetin	معالجة لارتفاع ضغط الدم[9]
3-Rhamnosidekeampferol	فعال في التخدير[16]

عموما الفلافانويدات هي مركبات غير سامة و متقبلة لدى الإنسان، إن كمية 1غ من المركبات الفلافانويدية المختلطة كافية من الناحية الصيدلانية لتفي احتياجات الأنسجة من هذه المواد وعدم الوقوع في الأمراض [7].

5.1.II. الاصطناع الحيوي للفينولات[6]: الموضح في الشكل **(15.II)**



الشكل (15.II) الاصطناع الحيوي للفينولات

6.1.II. العلاقات بين البنى الالكترونية و الخواص الكيميائية للفينولات:

1.6.1.II. البنية الالكترونية و الخاصية الحامضية للفينولات:

حامضية الوظائف الفينولية يمكن أن تتغير كثيرا تبعا للبنية العامة للجزئية فعلى سبيل المثال: 2,4,6 trinitrophénol يعتبر حمضا قويا (pH=0.71) وهكذا نجد أن مجموعة الكربونيل (C=O) في المركبات (flavonol وFlovone) ذات تأثير ميزوميري ساحب (-M) لإلكترونات الحلقة البنزينية تزيد من استقطاب الرابطة O-H و بالتالي حركية H أي الخاصية الحمضية [17][18][19].

II.1.6.1.2.الخواص الذاتية لمجموعة هيدروكسيل الفينولات:

II.1.2.6.1.تشكيل الرابطة الهيدروجينية: الفينولات – شأنها شأن الكحولات – هي مواقع لاتحاد بين الجزئيات بفضل الروابط الهيدروجينية، كما يمكن أن تتشكل روابط هيدروجينية داخل الجزيئة أيضا في الجزيئات الفينولية المعقدة. ومعروف عن الروابط الهيدروجينية أنها تغير الكثير من الخواص الفيزيائية ، درجات حرارة الإنصهار، الغليان، الذوبانية، أطياف الأشعة فوق البنفسجية UV و تحت الحمراء IR . وتنشأ الرابطة الهيدروجينية عن اتصال الهيدروجين بأحد الذرات عالية الكهروسالبة كالأكسجين مثلا فينشأ عنه استقطاب الرابطة O-H، ويفقد الهيدروجين جزئيا لالكترونه، 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).

هذه الروابط الهيدروجينية تجعل أيضا تنقية المركبات الفينولية صعبة، وعليه فإن هذه المركبات تميل إلى تشكيل بنى سداسية الأشكال، تتضمن ستة مجموعات فينولية متحدة بروابط هيدروجينية، مشكلة تجاويف (Cavités) تسمح للمركبات بالاتحاد مع عدد كبير من الجزيئات العضوية، وخاصة مع المذيب المستعمل أثناء عملية التنقية والفصل [20].

II.2.2.6.1.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 الجزيئات [21].

II.1.7.1.استخلاص المركبات الفينولية:

II.1.1.7.1.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)[21].

II.2.7.1.الاستخلاص صلب – سائل: له عدة أشكال ترتبط بعدة عوامل مختلفة منها درجة الحرارة، الضغط، كيفية استعمال المذيب.

II.1.2.7.1.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) و تحرك 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.

II.1.2.7.2.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 [22][23].

الجانب العملي 1

II.2.طرق العمل و المواد المستعملة:

II.2.1.الأجهزة و الأدوات 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 مايلي:

- جهاز التبخير الدوار (Rotavapeur) نوع (RV 06-ML) صنع (IKA).
- جهاز (UV-Visible) نوع (PRIM Advanced Spectrophotometers) بدقة (± 1 nm) صنع (SCHOTT Instruments GmbH) .
- جهاز الطرد المركزي نوع (Ultra – 8TL) صنع (SLW centryge) .
- الميزان التحليلي نوع (FA2004) بدقة (0.1mg) صنع (Shanghai Sunrise Instrument).

الأدوات:

- مكروبيبات(FORTUNA) صنع (TRANFERPETT).

II.2.2.المواد الكيميائية:

- ماء مكرر التقطير.
- الميثانول (CH_3-OH) ذو نقاوة (99%) إنتاج (BIOCHEM CHEMOPHARMA).
- الكاشف فولين (Réactif de Folin Ciocaltau) إنتاج (BIOCHEM CHEMOPHARMA).
- كربونات الصوديوم (Na_2CO_3) ذات نقاوة(99%) إنتاج (MERCK).
- حمض الغاليك ($(OH)_3C_6H_2COOH,H_2O$) ذو نقاوة (99%) إنتاج (PROLABO).
- ثلاثي كلور الألمنيوم ($AlCl_3$) بنقاوة (99%) إنتاج (MERCK).
- الروتين (Rutine) بنقاوة (99%) إنتاج (MERCK).

II.3.2.جني عينات البروبوليس:

لدينا عينات من البروبوليس جمعت من أربعة مناطق، هذه المناطق على التوالي الوادي و غرداية و تقع في المنطقة المعنية بالدراسة و هي جنوب الجزائر و العينتين الباقيتان هما للمقارنة عينة جمعت من خنشلة وعينة تجارية من اليابان، وفي الجدول التالي إحداثيات كل منطقة:

الجدول (3.II): إحداثيات مناطق جني البروبوليس

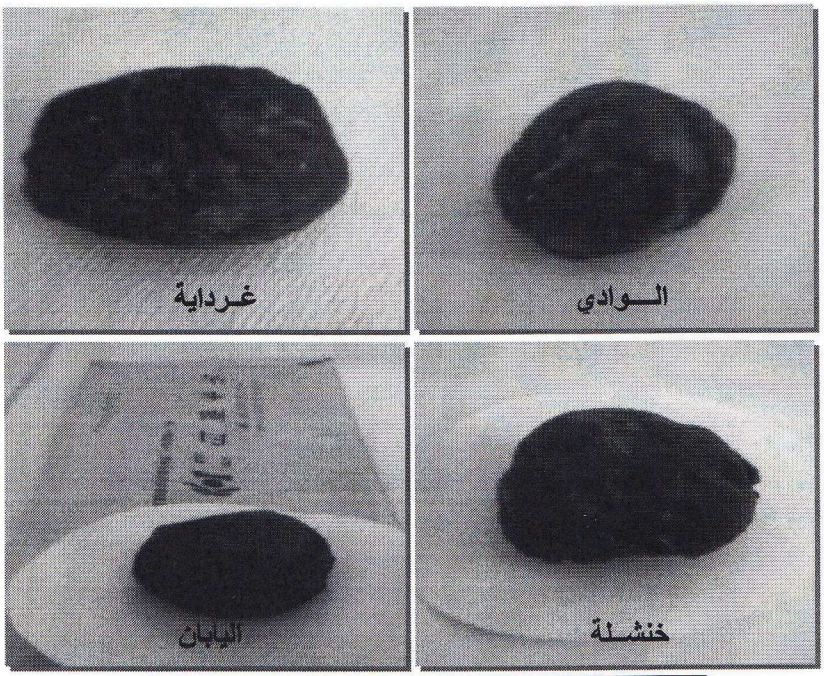
المناطق	دائرة عرض	خط طول
واد سوف	33°27'13.48"N	6°47'47.17"E
غرداية	32°47'11.03"N	4°30'24.91"E
خنشلة	35°25'59.05"N	7° 5'6.90"E
اليابان	37°43'25.43"N	139°40'57.06"E

تمت عملية الجني في نوفمبر 2008 ما عدا عينة اليابان فهي تجارية.

و كانت العينات تحمل المواصفات الموجودة في الجدول **(4.II)** و الموضحة بالصورة **(16.II)**

الجدول (4.II):الصفات الفيزيائية لعينات البروبوليس المدروسة

المناطق	اللون	طبيعة الرائحة	الطبيعة
واد سوف	بني فاتح	عطرية خفيفة	خشن الملمس، لين، سريع التفتت، شبه جاف
غرداية	بني	عطرية لاسعة	لين الملمس، سهل العجن، متماسك، مشبع بالدهون
خنشلة	بني مخضر	عطرية متوسطة	لين الملمس، صعب العجن، متوسط الرطوبة
اليابان	بني داكن	عطرية متوسطة	لين الملمس، سهل العجن، رطب



الشكل(16.II): عينات البروبوليس المدروسة

II.4.2.استخلاص المركبات الفينولية:

إن عملية استخلاص المركبات الفينولية من البروبوليس هي أهم خطوة في دراسته كمصدر للمواد الفعالة ، إذ تمت الكثير من الدراسات حول أحسن الطرق لاستخلاص اكبر كمية من المواد الفعالة[24]، و تنوعت هذه الطرق وفقا لطبيعة البروبوليس المدروس، و بما أن لدينا عينات جديدة من البروبوليس لم تدرس سابقا فقد فضلنا تجربة الثلاث طرق الأكثر استعمالا في الاستخلاص و اختيار الطريقة التي تعطي اكبر مردود، كما تم في احد هذه الطرق تغيير المذيب فبدلا من النقع في الميثانول تم النقع أيضا في الايثانول واخترناه لتفادي الآثار التي يسببها الميثانول.

II.1.4.2.الطريقة الأولى[25] [26] [27]:

وزنا كمية قدرها 1g من العينة (بروبوليس خنشلة) وقمنا بتقطعها لقطع صغيرة ثم بنقعها في الميثانول : حجمه 30 ml لمدة 24 ساعة ، بعد مرور المدة المطلوبة نضع المزيج في جهاز الطرد المركزي لمدة 30 دقيقة، بسرعة 3500 دورة/دقيقة.

قمنا بترشيح الناتج فنحصل على مستخلص ميثانولي ، بخر الميثانول تحت التفريغ عند 40°م ، قمنا بإذابة الناتج الجاف في 5 ml من الميثانول ثم حفظناه لغاية التقدير الكمي.

II.2.4.2.الطريقة الثانية [25] [28]:

وزنا كمية قدرها 1g من العينة (بروبوليس خنشلة) و قمنا بتقطعها لقطع صغيرة ثم بنقعها في الميثانول : حجمه 30 ml، ثم نضعها بجهاز الرج المغناطيسي تحت 350 دورة/دقيقة، لمدة 24 ساعة ،

وزنا نفس الكمية و قمنا بنقعها في الإيثانول تحت نفس الشروط السابقة.

بعد مرور المدة المطلوبة نقوم بترشيح الناتج فنحصل على مستخلص ميثانولي و أخر إيثانولي ، نبخر الميثانول و الإيثانول تحت التفريغ عند 40°م، نقوم بإذابة الناتج الجاف في 5 ml من الميثانول ثم نحفظه لغاية التقدير الكمي لهذه الأخيرة.

II.3.4.2.الطريقة الثالثة [29] [30]:

وزنا كمية قدرها 1g من العينة (بروبوليس خنشلة) و قمنا بتقطعها لقطع صغيرة ثم بنقعها في دورق الميثانول : حجمه 30 ml ، نصل الدورق بالمكثفة و نترك التجربة مدة ساعتان على درجة حرارة 50°C، بعد مرور المدة المطلوبة نقوم بترشيح الناتج فنحصل على مستخلص ميثانولي ، نبخر الميثانول تحت التفريغ عند 40°م وذلك بواسطة جهاز التبخير الدوار (Rotavapeur) ، نقوم بإذابة الناتج الجاف في 5 ml من الميثانول ثم نحفظه لغاية التقدير الكمي لهذه الأخيرة.

II.5.2. تقدير كمية الفينولات الكلية و الفلافانويدات:

II.1.5.2.تقدير كمية الفينولات الكلية:

يمكننا هذا التحليل من معرفة كمية الفينولات الكلية للعينة، و مقدار الفينولات تقاس بطريقة (Single ton, Ross 1965) باستعمال الكاشف فولين (Réactif de Folin Ciocaltau) [31][32]، وحمض الغاليك كأساس مرجعي، هذا الكاشف يتغير لونه من الأصفر إلى الأزرق بالأكسدة .

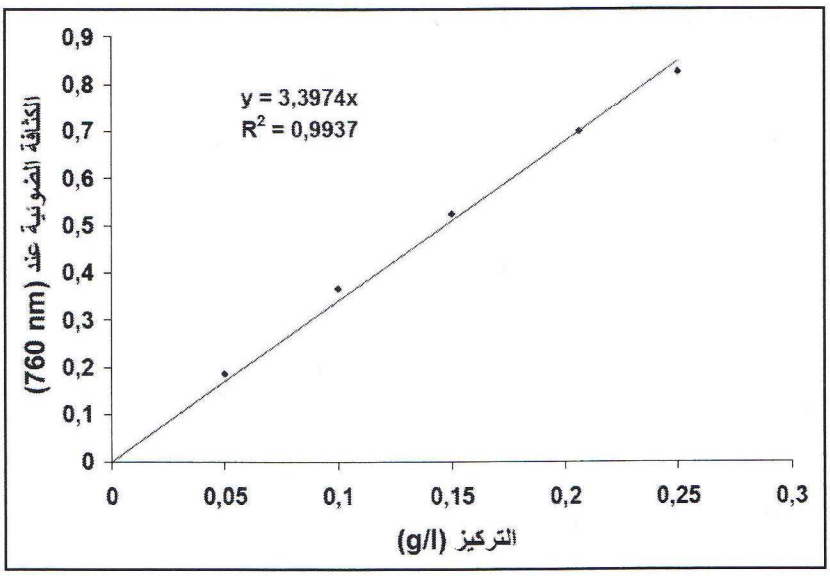
ترجع المركبات الفينولية كاشف (folin) إلى أكاسيد كل من Phosphomolyblique $H_3Po_{12}O_4$ و Acide phosphoungstique $Pw_{12}O_{40}$ ذو اللون الأزرق والذي تقاس إمتصاصيته عند λ_{MAX} = 760 nm

أ.رسم المنحنى القياسي

تحضير المحاليل: تم تحضير تراكيز مختلفة من حمض الغاليك تكون محصورة بين 0.03 mg/ml و0.3mg/ml ونأخذ من كل محلول 100 µl و نضعها في أنبوب إختبار نضيف لها 0.5ml من كاشف (folin) الممدد، ثم نضيف 2 ml 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 $\lambda_{MAX} = 760\ nm$.

إنطلاقا من قيم الإمتصاصية (A) لمحاليل حمض الغاليك نرسم المنحنى القياسي الذي يبين تغير الإمتصاصية، المنحنى رقم **(1.II)** يبين تغير الإمتصاصية (A) بدلالة التركيز بـ(g/l) .

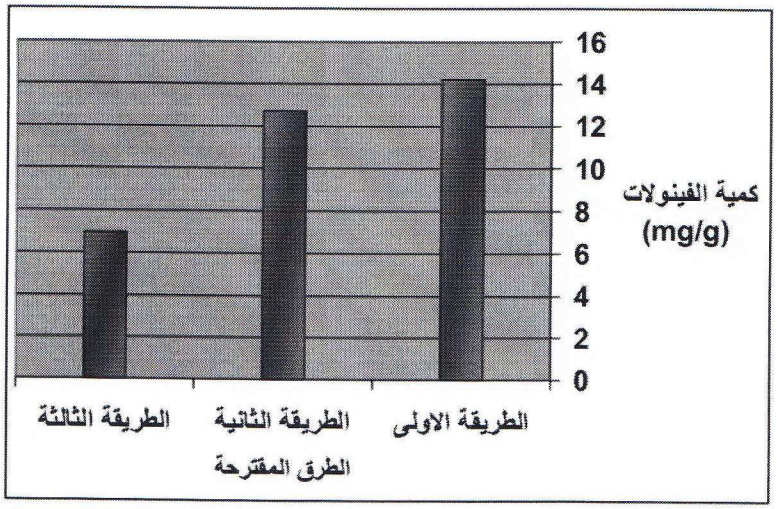


المنحنى (1.II): المنحنى القياسي لـ(GA)

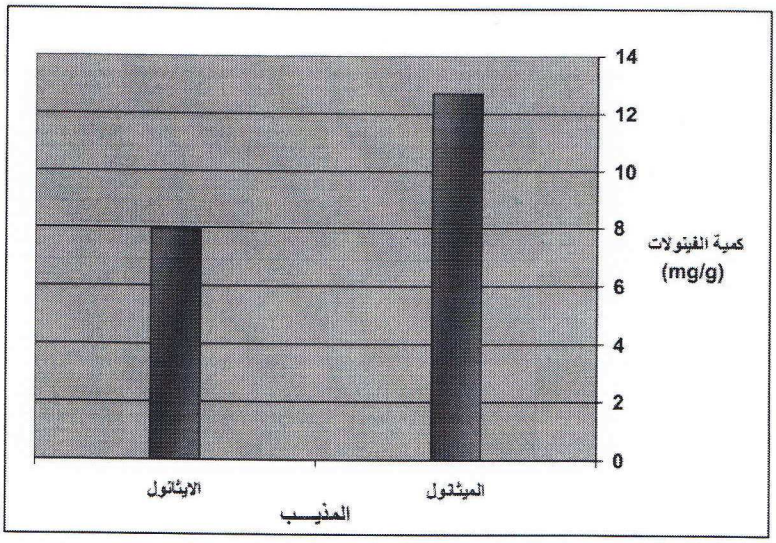
ب. التقدير الكمي للفينولات في المستخلصات: عاملنا المستخلصات بنفس الطريقة التي عاملنا بها حمض الغاليك، نأخذ 100µl من كل مستخلص ونعاملها بـ 0.5 ml من كاشف فولين و2 ml من (Na_2CO_3) ونتركها في الظلام مدة 30 دقيقة ،نستخدم المنحنى القياسي لحمض الغاليك لحساب تراكيز الفينولات في مختلف المستخلصات، تدون النتائج المتحصل عليها في الجدول **(5.II)**.

الجدول (5.II): كمية الفينولات الناتجة عن طرق الاستخلاص المقترحة

	الفينولات mg/g	
المذيب	الميثانول	الايثانول
الطريقة الأولى	14,2332	---
الطريقة الثانية	12,7081	7,9312
الطريقة الثالثة	6,9715	---



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



المنحنى (3.II): يوضح المقارنة بين كمية الفينولات في المستخلص الميثانولي و الايثانولي للطريقة الثانية

II.2.5.2.مناقشة نتائج المقارنة بين طرق الاستخلاص:

من نتائج التقدير الكلي للفينولات المدونة في الجداول **(5.II)** و الموضحة بالمنحنى **(3.II)** و المنحنى **(4.II)** نستنتج النقاط التالية:

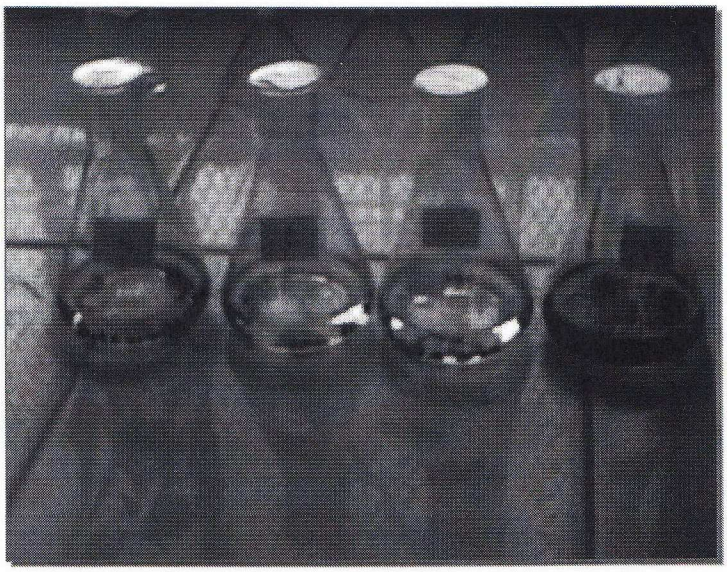
يتضح أن الطريقة الأولي هي التي مكنتنا من استخلاص اكبر كمية من الفينولات حيث تقدر كميتها بـ 14,2332 mg/g، كما نلاحظ كذلك أن الطريقة الثانية كانت اقل من الأولى من حيث المردود لكن

الفارق في الكمية لم يكن بالقدر الكبير حيث كانت الكمية 12,7081 mg/g بعكس الطريقة الثالثة التي كان الفارق بها كبير حيث كانت نصف الكمية المتحصل عليها في الطريقة الأولى 6,9715 mg/g، و بهذه النتائج نستطيع أن نعتمد الطريقة الأولى كطريقة لاستخلاص البروبوليس في هذه الدراسة باعتبارها أعطت مردود اكبر.

أما بخصوص المذيب فقد أظهرت النتائج أعلاه أن الميثانول أعطى مردودا اكبر للفينولات 12,7081 mg/g بالمقارنة مع الإيثانول حيث كانت الكمية 7,9312 mg/g كما هو موضح في المنحنى **(3.II)** و هو فارق كبير نسبيا يجعلنا نحرص على أخذ الميثانول كمذيب في جميع عمليات الاستخلاص التالية رغم ما ذكرناه سابقا.

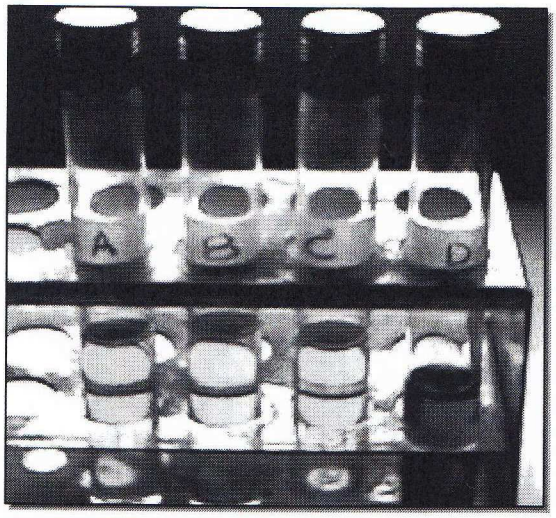
II.6.2.استخلاص العينات:

وزنا كمية قدرها 1 غ من كل عينة من العينات المدروسة و قمنا بتقطعها لقطع صغيرة ثم بنقعها في الميثانول : حجمه 30 مل لمدة 24 ساعة انظر الصورة **(17.II)**، بعد مرور المدة المطلوبة نضع المزيج في جهاز الطرد المركزي لمدة 30 دقيقة، بسرعة 3500 دورة/دقيقة.



الشكل(17.II): يوضح الاختلاف في اللوان اثناء النقع في الميثانول

قمنا بترشيح الناتج الموضح في الشكل(17.II) فحصلنا على مستخلص ميثانولي كما يوضحه الشكل(18.II).



الشكل(18.II): المستخلصات الناتجة

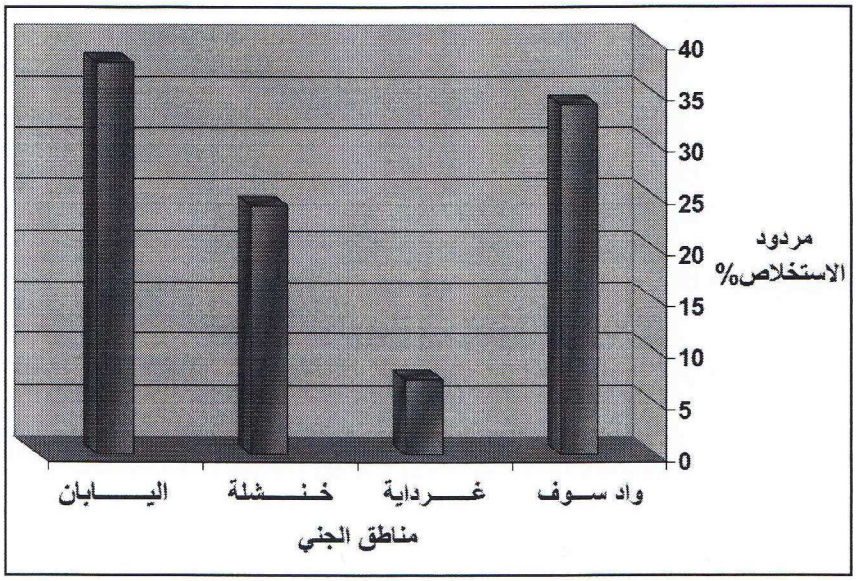
بخرنا الميثانول تحت التفريغ عند 40°م وذلك بواسطة جهاز (Rotavapeur)، قمنا بإذابة الناتج الجاف في 5 مل من الميثانول ثم نحفظه لغاية التقدير الكمي لهذه الأخيرة.

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

مردود الاستخلاص: النتائج المحصل عليها مدونة في الجدول **(6.II)** و تمثيلها بالمنحنى **(5.II)**

الجدول (6.II): نتائج مردود المادة المستخلصة

	المستخلصات	المردود (%)	الترتيب
A	خنشلة	24.13	3
B	واد سوف	33.92	2
C	غرداية	7.26	4
D	اليابان	38.06	1



المنحنى (4.II): يوضح مقارنة مردود الاستخلاص حسب المناطق

1.6.2.II.تقدير كمية الفينولات المستخلصات: عوملت المستخلصات بنفس الطريقة التي عاملنا بها المستخلصات السابقة، إستخدمنا المنحنى القياسي لحمض الغاليك لحساب تراكيز الفينولات في مختلف المستخلصات، دونا النتائج المتحصل عليها في الجدول **(7.II)**.

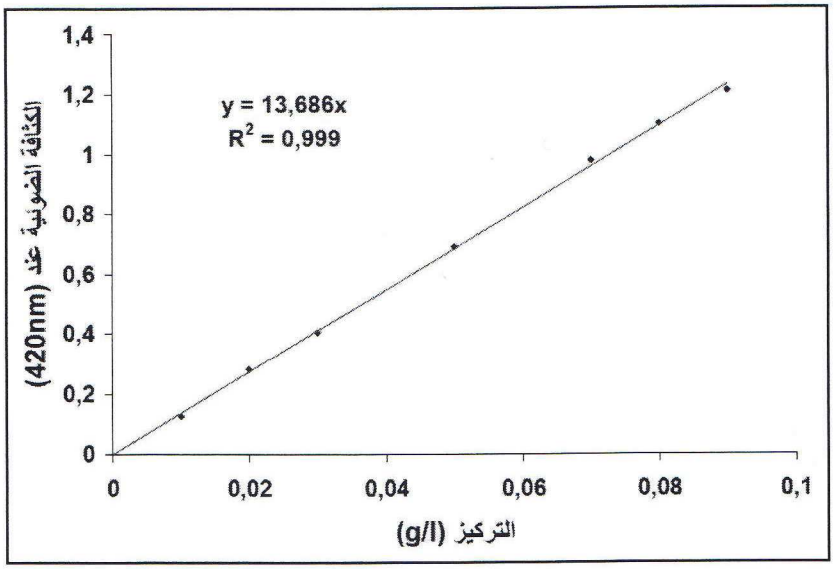
2.6.2.II.تقدير كمية الفلافونويدات :

إعتمدنا في تقدير الفلافونويدات على قدرة تكوين المعقد الأصفر بين ثلاثي كلور الألمنيوم ($AlCl_3$) مع مجموعة الهيدروكسيل (OH) الموجودة على الحلقات البنزينية للفلافانويدات، حيث يشكل معقدا ثابتا بين مجموعة الكربونيل و هيدركسي الموقع 5 و 3 ، كما يشكل معقدات غير ثابتة مع مجموعتي اورثو هيدركسي، ذو معامل إمتصاص عال ويمتص عند طول موجة $\lambda = 430$ nm [33][34]

نستعمل في هذه التجربة فلافونويد الروتين (Rutine) كأساس مرجعي (قياسي) لرسم المنحنى القياسي.

أ.رسم المنحنى القياسي:

حضرنا تراكيز مختلفة من محلول الروتين (Rutine) الممدد في الميثانول محصورة مابين 0.02g/l و 0.1g/l ، من كل تركيز أخذنا 1ml وعاملناه بـ1ml من ثلاثي كلور الألمنيوم ($AlCl_3$ 2%) في الميثانول ، يترك المزيج نصف ساعة في الظلام حتى إتمام التفاعل، ثم قرأنا شدة الامتصاص الضوئي لكل محلول عند طول الموجة 430nm، ثم رسمنا المنحنى البياني لتغير الامتصاصية الضوئية(A) بدلالة التركيز (g/l) المنحنى **(5.II)**.



المنحنى (5.II): المنحنى القياسي لـ(Rutine)

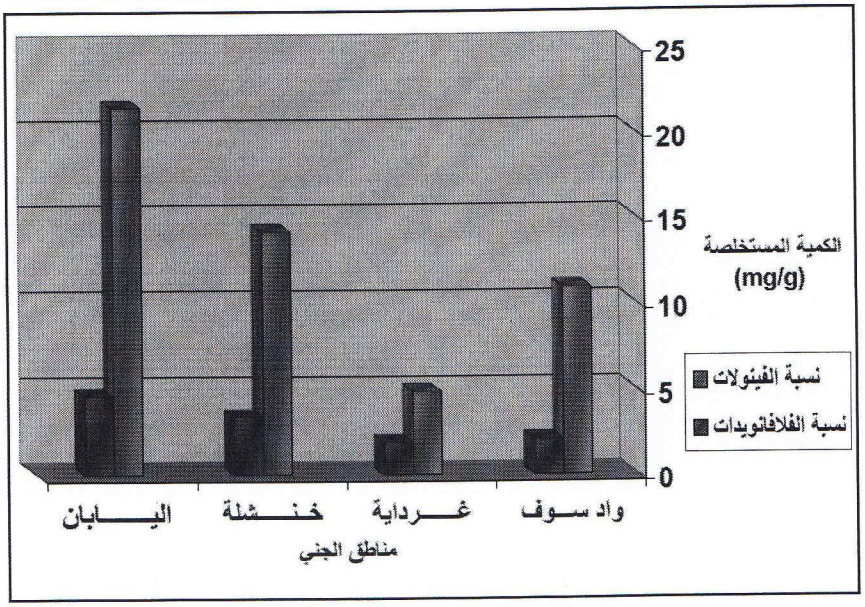
ب. تقدير كمية الفلافونويدات في المستخلصات:

نعامل المستخلصات الممددة للبروبوليس بأخذ 1ml من كل مستخلص و نعامله بـ 1ml من ثلاثي كلور الألمنيوم ($AlCl_3$ 2%) في الميثانول ، نستعمل منحنى المعايرة (القياسي) لحساب كمية الفلافونويدات في كل مستخلص.

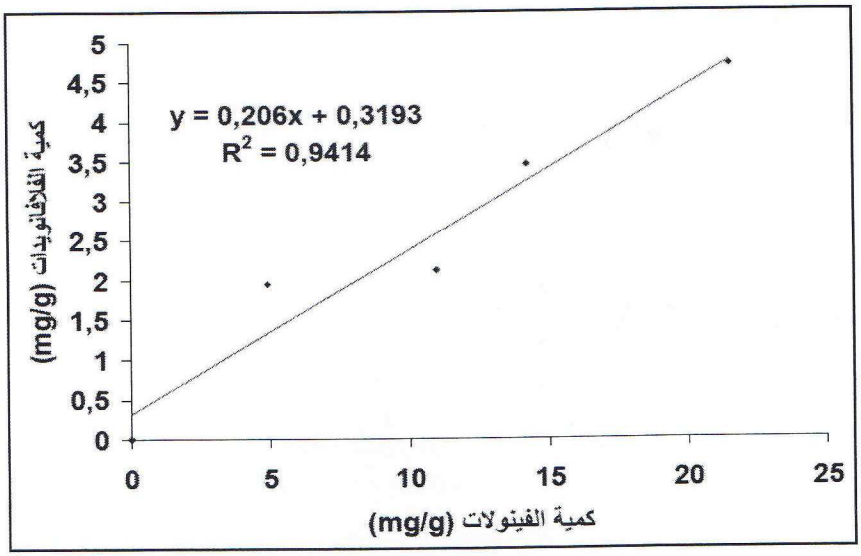
دونا نتائج التقدير الكمي للفينولات و الفلافانويدات في الجدول **(7.II)**.

الجدول (7.II): يوضح التقدير الكمي للفينولات و الفلافونويدات في المستخلصات

	المستخلصات	الفينولات mg/g	الفلافونويدات mg/g	الترتيب
A	خنشلة	14.2332	3.4599	2
B	واد سوف	10.9879	2.1255	3
C	غرداية	4.9349	1.9493	4
D	اليابان	21.5495	4.7145	1



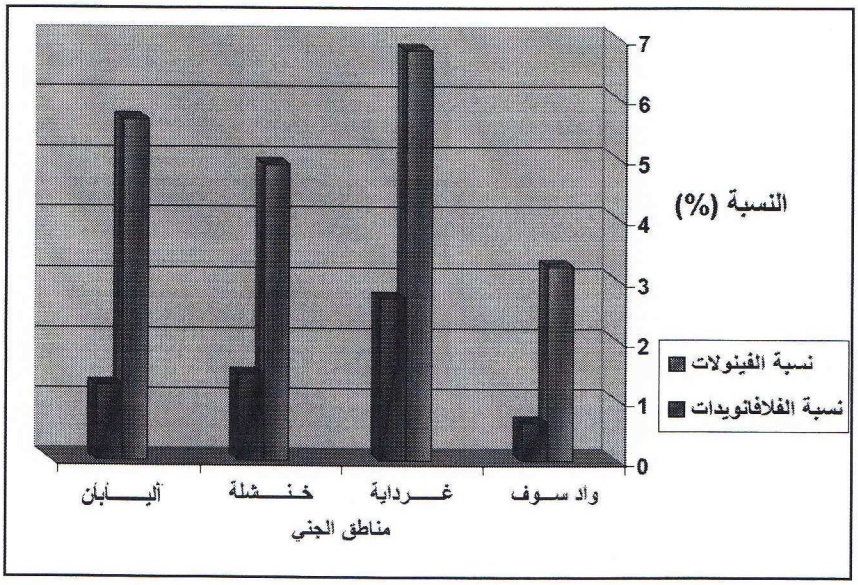
المنحنى (6.II):يوضح المقارنة بين كمية الفينولات و الفلافونويدات فى المستخلصات الميثانولية



المنحنى (7.II):يوضح علاقة الارتباط بين كمية الفينولات و الفلافونويدات في المستخلصات

الجدول (8.II): يوضح نسب الفينولات و الفلافونويدات في المادة المستخلصة

المستخلصات	الفينولات (%)	الفلافونويدات (%)	الترتيب
واد ســوف	3,23	0,63	4
غـــرداية	6,8	2,7	1
خنـــشلة	4,9	1,43	3
اليـــابان	5,65	1,24	2



المنحنى (8.II):يوضح المقارنة بين نسب الفينولات و الفلافونويدات في المادة المستخلصة

II.7.2.مناقشة النتائج المتحصل عليها :

من النتائج المدونة في الجدول **(6.II)** و الموضحة بالمنحنى **(4.II)** نستنتج النقاط التالية:

ان اكبر مردود لعملية الاستخلاص كان لبروبوليس اليابان بنسبة 38% يليه بروبوليس الوادي الذي كانت نسبته مقاربة بـ 33.92% كذا خنشلة بـ 24.13% أما بروبوليس غرداية فقد كان المردود صغير نسبيا بـ 7.26%.

يرجع هذا التفاوت في المردود الى طبيعة تركيب البروبوليس لكل منطقة من المناطق المختارة.

من النتائج المدونة في الجداول **(7.II)** و الموضحة بالمنحنى **(6.II)** نستنتج النقاط التالية:

ان اكبر كمية من الفينولات تم تقديرها سجلتها اليابان حيث و صلت الى 21.5495 mg/g كذا الفلافونويدات التي بلغت 4.7145 mg/g اما بقية المستخلصات و هما خنشلة و الوادي فكانت كميتهما متقاربة الى حد ما حيث كانت الكمية في بروبوليس خنشلة 14,2332 mg/g من الفينولات و mg/g 3.4599 من الفلافونويدات و الوادي 10.9879 mg/g من الفينولات و 2.1255 mg/g من الفلافونويدات، اما اقل نتيجة فسجلها بروبوليس غرداية حيث كانت 4.9349 mg/g للفينولات و mg/g 1.9493 من الفلافونويدات، هذه النتائج توحي بان هناك ارتباط بين كمية الفينولات و الفلافونويدات لذلك قمنا بالتأكد من ذلك برسم المنحنى **(7.II)** الذي كانت فيه R^2 =0. 94 و هذا يثبت ان هناك علاقة ارتباط كبير بين كمية الفينولات و كمية الفلافونويدات فكلما كانت كمية الفينولات كبيرة كانت الفلافونويدات كبيرة و العكس صحيح.

حسبنا مردود الفينولات و الفلافونويدات من مجموع المواد المستخلصة و أظهرت النتائج المدونة في الجداول **(8.II)** و الموضحة بالمنحنى **(8.II)** أن بروبوليس غرداية أعطى اكبر نسبة فينولات و فلافونويدات في المادة المستخلصة حيث بلغت 6,8% و % 2,7 على التوالي بينما كانت نسبة اليابان 5,65% و 1,24 فينولات و فلافونويدات على التوالي اما اقل نسبة فكانت الوادي التي لم تتجاوز النسب فيها 3,23% و 0,63% على التوالي مع ملاحظة ان نسبة الفلافونويدات في بروبوليس الوادي صغيرة جدا.

الجزء الثاني

الفعالية المضادة للأكسدة

الجانب النظري 2

II.3.الفعالية المضادة للاكسدة:

II.3.1.مقدمة:

إن كل خلية من خلايا جسم الإنسان الذي يتكون من حوالي تريليون (10^{12}) خلية تعاني من حوالي 10.000 هجمة من الجذور الحرة في اليوم الواحد . وهذا الهجوم يتركز في الغالب على المادة الوراثية ومن إحدى نتائج هذا الهجوم زيادة معدل التطفر . ويتراوح معدل تكرار التطفر الخلوي لدى الأشخاص المتقدمين في السن بحوالي 9 أضعاف مقارنة بالأطفال ، وهذه الطفرات تزيد من خطورة حدوث السرطان . بالإضافة إلى ذلك فإن الأغشية الخلوية والبروتينات والدهون تتعرض أيضاً للهجوم بواسطة الجذور الحرة وعلى مدى سبعين سنة اعتيادية من عمر الإنسان ، فإن الجسم يولد ما يعادل حوالي سبعة عشر طناً (17.000 كيلوجرام) من الجذور الحرة . لذا فإن جسم الإنسان يحتاج إلى دفاعات فعالة مضادة للأكسدة في كل الأوقات [35].

إن إزالة الجذور الحرة بواسطة مضادات الأكسدة تبدو مهمة لصحة وحياة الإنسان ومع ذلك ، فإننا لا يمكن أن نعيش بدون الجذور الحرة . فالجسم يستخدم الجذور الحرة لتحطيم الجراثيم ، بالإضافة إلى استخدامها لإنتاج الطاقة، لذلك تقوم مضادات الأكسدة الغذائية بالمساعدة على إعادة التوازن.

II.3.2.الجذور الحرة :

II.3.2.1.تعريف:

الجذور الحرة هي أصناف كيميائية ذرية أو جزيئية متعادلة أو مشحونة بشحنة سالبة أو موجبة، تحتوي في تركيبها الالكتروني على إلكترون منفرد (غير متزاوج) أو أكثر،ويكون معظمها شديد الفعالية (تتفاعل بسرعة) مع مركبات أخرى محاولة اقتناص ما ينقصها من الكترونات لتصل إلى الثبات الكيميائي ، تتولد هذه الأصناف خلال التفاعلات الكيميائية كمركبات وسيطية شديدة الفعالية وتنتهي بنهايتها ،وتتكون هذه الأصناف خاصة بالتفاعلات التسلسلية والتفاعلات المتعاقبة وبعض التفاعلات الأخرى مثل البلمرة والتفاعلات الضوئية وتلك المحثة بتسليط الأشعة الكهرومغناطيسية والدقائق الإشعاعية الأخرى[36].

الجذور الحرة أنواع منها تلك التي تحتوي على إلكترون منفرد واحد ومتعادلة الشحنة مثل ذرات الهيدروجين والنيتروجين والفلور والكلور والبروم واليود وجذور المثيل (CH_3)

والإيثيل (C_2H_5) والفينيل (C_6H_5) والهيدروكسيل (OH) والبيروكسيد (HOO) ومنها التي تحتوي على الكترونين منفردين أو أكثر (غير مزدوجة) ومتعادلة الشحنة مثل ذرة الأكسجين(:O:) وجذور (NH) وجذور الميثيلين (CH_2) حيث تدعى هذه الجذور بالجذور الثنائية(diradicals) وتكون هذه الجذور أشد فعالية وأقل عمرا من جذور النوع السابق، أما الجذور الحرة الموجبة والسالبة الشحنة فهي جذور شديدة الفعالية وذات أعمار قصيرة جدا [36].

مثل: $(SCN)_2^{\cdot -}$, $(I_2)^{\cdot -}$, $(C_6H_6)^{\cdot -}$, $(N_2H_4)^{\cdot +}$, $(NH_3)^{\cdot +}$, $(CH_4)^{\cdot +}$, $(H_2O)^{\cdot +}$

II.2.2.3.أنواع الجذور الحرة حسب استقرارها :

تقسم الجذور الحرة بصورة عامة من حيث استقرارها الى نوعين:

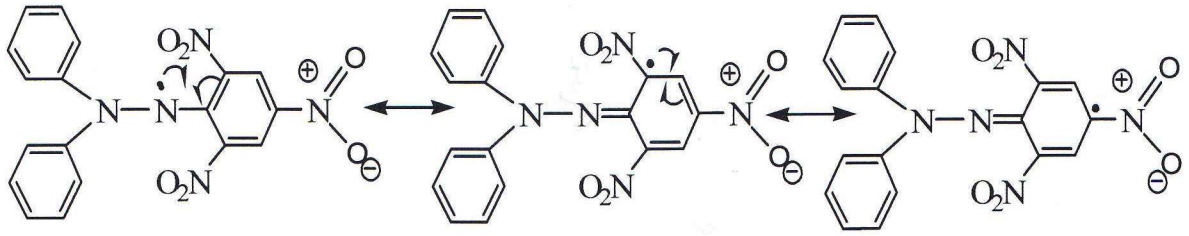
II.2.2.3.1.الجذور التي لها أعمار قصيرة جدا:

أي غير مستقرة في الظروف الاعتيادية ،يشمل هذا النوع الجذور الحرة ذات العناصر مثل ذرا ت الهيدروجين والنيتروجين و الفلور و الكلور و البروم واليود والجذور التي لها وزن جزيئي صغير بصورة عامة مثل المثيل (CH_3) و الإيثيل (C_2H_5) و الفينيل (C_6H_5) و الهيدروكسيل (OH) ، يتراوح أعمار حياة هذه الجذور من رتبة الميكروثانية وأقل ،وتصل حتى البيكوثانية (10^{-12} ثانية) [36] .

II.2.2.3.2.الجذور الحرة التي لها أعمار طويلة:

حيث تقدر أعمارها بالثواني أو الدقائق أو الساعات أو حتى بالأيام مثل جذر 2,2'-diphényle-1-picryle hydrazyle (DPPH)، فمثلا محلول الجذر الأول يكون ذو لون أصفر ومستقرا بدرجة حرارة الغرفة لبضع ساعات،أما الجذر الثاني فيكون مادة صلبة ذات لون بنفسجي مسود ويكون مستقر لعدة أيام .

ونستطيع القول بأن معظم الجذور الأروماتية التي تشتمل على تراكيب رنينية متعددة في تركيبها الجزيئي تكون مستقرة في أغلب الأحيان .ويعزى استقرار هذا النوع من الجذور لعدم تمركز الإلكترون المنفرد بموقع معين في تركيب الجذر،وخير مثال على هذه الحالة عدم تمركز الإلكترون المنفرد بجذر (DPPH) [36].



شكل (19.II): يوضح التراكيب الرنينية في جزيء DPPH

3.2.3.II.فعالية الجذور الحرة:

معظم الجذور الحرة على درجة عالية من الفعالية وعادة لا يمكن فصلها، وفي بعض الأحيان لابد من استخدام طرق غير مباشرة للكشف عن أحد الجذور،وطاقات التنشيط بين جذرين حرين ضئيلة للغاية تقرب من الصفر غالبا و مع ذلك فالمعدل الحقيقي للتفاعل يعتمد على سرعة تقابل الوحدتين مع بعضهما البعض.ومثل هذه التفاعلات توصف بأنها محكومة بالانتشار وتنطوي خطوة الإيقاف في كثير من التفاعلات المتسلسلة على هذا الطراز من الاتحاد بين الجذور السريعة [36] [37].

4.2.3.II.متابعة حركية الجذور الحرة: إن الجذور الحرة إما أن تكون ذات أعمار طويلة أو قصيرة، القصيرة منها لا يمكن متابعة حركية تفاعلاتها إلا بالطرق الطيفية السريعة مثل أطياف الكتلة وأطياف الرنين النووي المغناطيسي، أما الجذور المستقرة نسبيا فيمكن متابعة حركية تفاعلاتها بالطرق التقليدية مثل قياس التغير بالتوصيلة الكهربائية بدلالة الزمن، أو التغير بالتركيز المولاري بدلالة الزمن، أو التغير بحجم الغاز عن طريق التسحيح بالحامض أو القاعدة ولكن أدق هذه الطرق هي قياس تغير كثافة الضوء الممتص بدلالة الزمن بواسطة أجهزة قياس أطياف الأشعة فوق البنفسجية –المرئية (UV-V) شرط أن يمتص الجذر الحر الضوء بمنطقة تختلف عن منطقة امتصاص المادة الناتجة فمثلا يمتص الجذر ثلاثي فينيل المثيل ($Ph_3\dot{C}$) الضوء عند 345nm وعند 510nm بينما يمتص ثلاثي فينيل ميثان (Ph_3CH) الضوء عند 262nm فقط[36].

5.2.3.II.الأكسدةالعضوية:

الأكسدة العضوية هي تحول المركبات في وجود أكسجين الهواء والعوامل المساعدة على الأكسدة، وجود كميات ضئيلة من بادئات الجذور الحرة الموجودة في الهواء ومدى حساسية المركبات للضوء[38][39] [40].

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

ويعتبر تلف معظم المواد العضوية عند تعرضها للهواء والضوء كجفاف الطلاءات، وتغير تركيبة اللدائن والمطاط و تحول المذيبات إلى بروكسيدات أحد نواتج هذه الأكسدة [41].

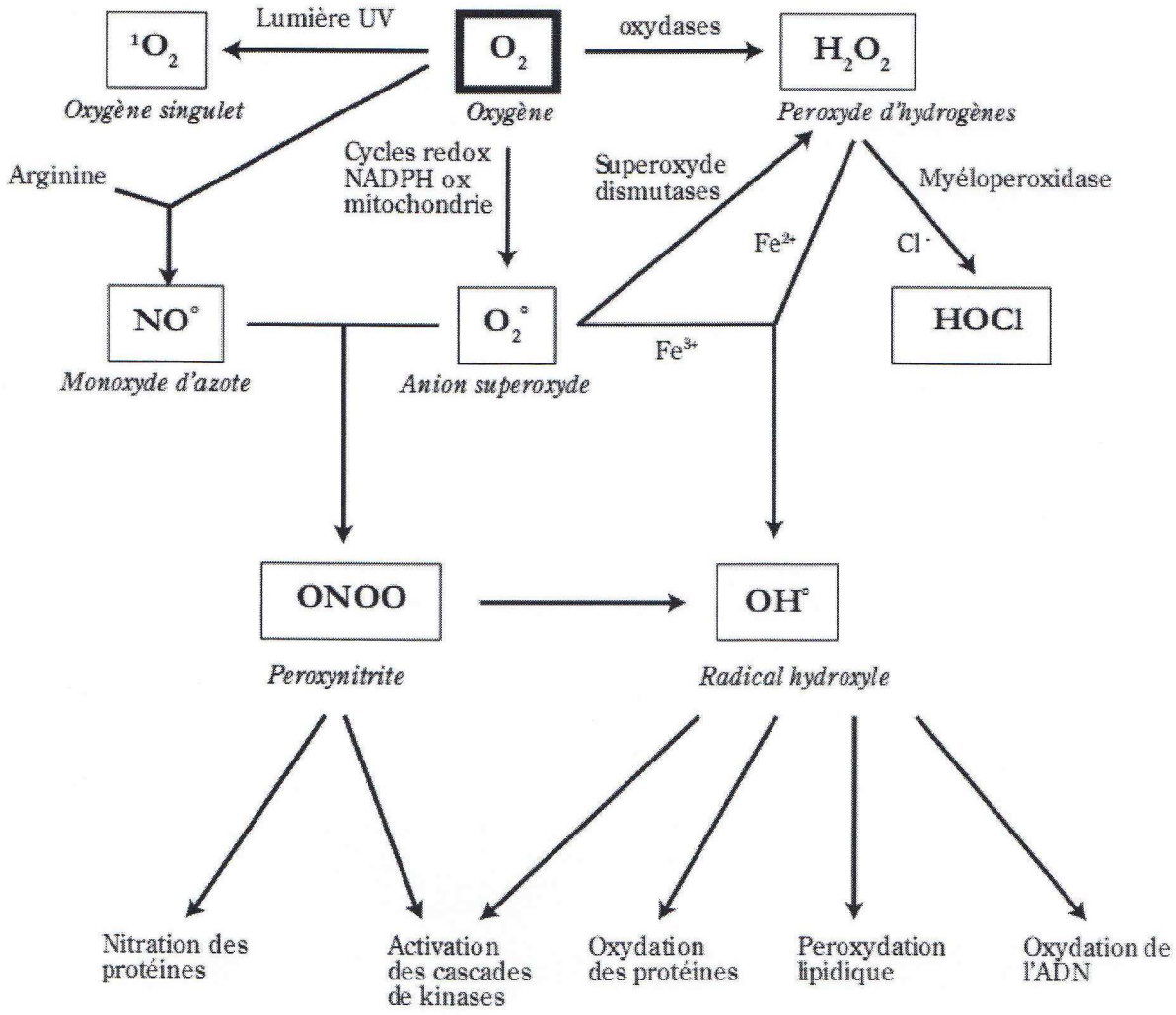
II.6.2.3.تفاعلات الأكسدة في النظام البيولوجي: بلا شك تعتبر التفاعلات الجذرية المساهم الأول في نمو الإنسان والحفاظ عليه[42]، وهذا لما تقوم به هذه التفاعلات من أدوار مهمة في العملية البيولوجية [38] حيث أن الخلايا تحتوي على الجذور الحرة لاسيما في مرحلة التصنيع الحيوي للمركبات الفعالة أو في عمليات الهدم العادية للمركبات الفعالة (bioactive) [43].

الأكسجين هو العنصر الأساسي للخلايا التي تتم فيها عملية الإحراق وهي عبارة عن تفاعل بين مركب عضوي و أكسجين الهواء، وأهم نواتج هذا التفاعل هي الطاقة التي تدخل في تصنيع العديد من المركبات منها المواد الخلوية، بالإضافة إلى القيام بنشاطات وظيفية معقدة مثل الحركة، النمو، الافرازات والامتصاص[44].

لكن إذا تمت هذه التفاعلات بطريقة عشوائية وغير مسيطر عليها فإنها تتسبب في تمزيق أغشية البلازما للخلايا وتغيير وظائفها، كما قد تؤدي إلى طفرات جينية وربما إلى موت الخلايا. كما تؤدي الجذور الحرة إلى إتلاف الأغشية الحيوية الأخرى كأغشية الميتوكوندريا، وتؤثر على الدهون غير المشبعة كالدهون الفوسفاتية وتؤدي إلى تصلب الأغشية، ونقص نشاط الارتباط الإنزيمي بها كنقص نشاط مضخات الصوديوم (Sodium Pumps) . كما تؤثر الجذور الحرة كذلك على نشاط المستقبلات الغشائية وعلى نفاذية الأغشية أو ربما تؤدي إلى السرطان من خلال تدميرها (ADN)، أو إلى أمراض أخرى كأمراض القلب والتهاب المفاصل. ويعزي كثير من العلماء الشيخوخة وأمراض ضمور الخلايا إلى نشاط الجذور الحرة، من بين الأنواع الجذرية القابلة للتصنيع في الخلايا نميز مجموعة من المكونات والتي تلعب دورا خاصا في علم الخلايا والتي تدعى بالجذور الأولية مع مكونات بيوكيميائية في الخلية [45].

مثلا: سلاسل نقل الإلكترود بروكسيد (Electrode peroxide) ونظام السيتوكروم (cytochrome) هذه الجذور تكون مسؤولة عن فساد (ADN) للخلايا المسنة، والتي هي أساس منشأ بعض الأمراض **الشكل (20.II)** مثل: السرطان، مرض الشلل الاهتزازي، مرض التصلب العضلي[20].

يستطيع جسم الإنسان السيطرة على هذه السلسلة من التفاعلات في الوقت المناسب، عن طريق نظام يدعى بنظام المواد المضادة للأكسدة داخل الخلايا والذي يوجد أيضاً في بعض الفيتامينات والأملاح التي تعمل كآليات حماية ضد التأثيرات الضارة للجذور الحرة.



الشكل (20.II): رسم تخطيطي يوضح مصدر مختلف الجذور الحرة المؤكسدة وأنماط تفاعلات الأكسجين المطبقة بيولوجيا [45]

II.3.3.مضادات الأكسدة:

II.1.3.3.تعريف:

هي مجموعة من العناصر والمركبات الموجودة بصورة طبيعية في معظم الخضروات والفاكهة ومعظم الأعشاب الطبية، حيث جرى التعرف على تركيب وآلية عمل عدد قليل منها [46]، وتعمل مضادات الأكسدة بالدرجة الأولى كمانحات للهيدروجين أو مستقبلات للجذور الحرة وعليه فإن الدور الأساسي لمضادات الأكسدة هو كسر تفاعل السلسلة للأكسدة الذاتية و ذلك بالتفاعل مع جذور الهيدروبيروكسيدات، ويمكن تقسيم مضادات الأكسدة الى قسمين: طبيعية ومصنعة[47][48].

II.2.3.3.تصنيف مضادات الأكسدة:

II.1.2.3.3.مضادات الأكسدة الطبيعية:

ومن مضادات الأكسدة التي يمكن أن تكون في متناول اليد في غذائنا اليومي مثل الفيتامينات من أصل البيتاكاروتين وفيتامين (C) وفيتامين (E) ومن المعادن الزنك (Zn) والسيلنيوم (Sn).

أ-البيتاكاروتين: هي واحدة من حوالي 400 من الكاروتينات وهي عبارة عن صبغة صفراء أو حمراء طبيعية توجد في بعض الأطعمة النباتية، وتتحول داخل جسم الإنسان إلى فيتامين A ويعتمد الامتصاص على كمية الفيتامين التي يحتاجها الجسم والباقي يخزن بصورة بيتاكاروتين في الكبد وأنسجة الجسم الدهنية المختلفة.ومن أهم مصادره النباتية الجزر والبطاطا الحلوة والخضروات الداكنة والفواكه الصفراء والبرتقالية مثل المشمش والمانجو[46].

ب-فيتامين(C): يساعد هذا الفيتامين على امتصاص الحديد الضروري لتكوين كريات الدم الحمراء ويدخل ضمن تكوين بعض الأنزيمات ويعتبر عامل مساعد لحفظ الخلايا ويساعد في الوقاية من الأمراض ومن أهم مصادره الحمضيات والخضروات الطازجة[46].

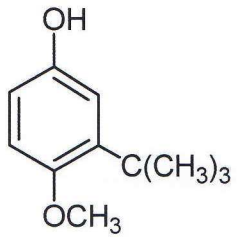
ج-الزنـك (Zn): من العناصر المعدنية الضرورية لجسم الإنسان ويدخل الزنك في تركيب كثير من الإنزيمات الضرورية للتمثيل الغذائي للبروتينات والكربوهيدرات والدهون وهو يدخل ضمن مركبات وجدار خلايا الجسم، كما أن نقص الزنك ضمن الطعام المتناول يؤدي الى قصور في النمو[46].

د-السيلنيوم (Sn): يعتبر من العناصر المعدنية التي يحتاج إليها جسم الإنسان بكميات ضئيلة، ومن أهم فوائده المعروفة حتى الآن أنه يدخل في تركيب أنزيم Glutathione peroxydase وفائدة هذا الأنزيم أنه مع فيتامين (E) يكونان مضادات أكسدة دفاعية تقلل من الإصابة من الأمراض كالسرطان وتقلل فعالية المواد السامة والضارة في الجسم[46].

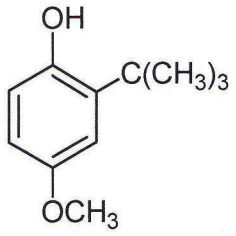
وتمتلك مضادات الأكسدة الطبيعية خواص مضاد أكسدة ضعيف نسبيا.وكنتيجة لذلك، تم استنباط مضادات أكسدة اصطناعية لاستعمالها في الأغذية[47].

II.2.2.3.3.مضادات الأكسدة الاصطناعية:

1) BHA : (Buthyl hydroxyl anizole) لا يوجد هذا المركب في الطبيعة ولكنه يصنع بطريقة Butylation للمركب parамethoxyphenol ، ولـ BHA صيغتين ،ولكليهما رائحة الفينول ويذوبان بشكل جيد في الدهون ومن أهم خواص هذين المركبين هو قدرتهما على المحافظة على قابليتهما كمواد مضادة للأكسدة في الغذاء أثناء التسخين كالقلي مثلا [48]، وفي بعض الدول يسمح بإضافته بتركيز لا يزيد عن 200 ppm [49]وله الصيغ التالية:



3-tert-butyl- 4-methoxyphenol

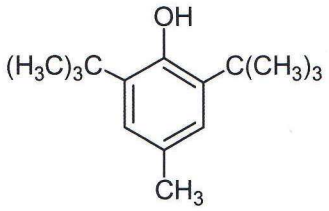


2-tert-butyl- 4-methoxyphenol

شكل (21.II) : يوضح بنيةBHA

2) BHT : (Buthyl hydroxy toluéne) يعتبر مركب BHT من مضادات الأكسدة التي تصنع تجاريا لاستعماله في المنتجات البترولية والمطاط واستعمل بعد ذلك في منتجات الأغذية، المركب النقي ذو لون أبيض وهو مادة متبلورة عديم الرائحة، لا يذوب في الماء لكنه يذوب في المذيبات العضوية والدهون[48].

في بعض الدول يسمح بإضافته بتركيز لا يزيد عن 200 ppm للاغذية [49] وفيما يلي صيغته:

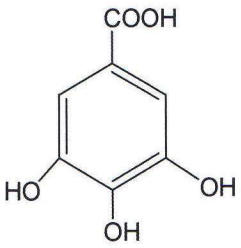


2,6-di-tert-butyl- 4-methylphenol

شكل (22.II): يوضح بنية BHT

3)حمض الغاليك Ac.gallique والغالات Gallates:

يذوب حمض الغاليك في الماء ولكنه قليل الذوبان في الزيوت



3,4,5-trihydroxy benzoic acid

شكل (23.II): يوضح بنية لـ(GA)

ولأجل السماح باستعمال هذه المواد في الأغذية، يجب أن تكون ذات درجة سمية ضعيفة وأن تكون فعالة بتراكيز منخفضة وفي أنواع عديدة من الدهون وأن لا تضيف نكهة أو رائحة أو لونا غير مرغوب فيه للمنتوج[47].

وقد وضعت عدة نظريات لتفسير آلية عمل المواد المضادة للأكسدة منها [50]:

- **إعطاء ذرة هيدروجين أو مستقبلة للجذور:**

$$ROO^{\bullet} + AH_2 \longrightarrow ROOH + AH^{\bullet}$$

$$ROO^{\bullet} + AH^{\bullet} \longrightarrow \text{نواتج مستقرة}$$

$$AH^{\bullet} + AH^{\bullet} \longrightarrow A + AH_2$$

- **تكوين معقد:**

$$ROO^{\bullet} + AH_2 \longrightarrow (ROO\ AH_2)^{\bullet}$$

$$ROO^{\bullet} + (ROO\ AH_2)^{\bullet} \longrightarrow \text{نواتج مستقرة}$$

حيث AH_2 : مركب مضاد للاكسدة.

II.3.3.3.مصادر مضادات الأكسدة:

لا شك أن جميع الأغذية النباتية من خضروات وثمار وفاكهة ومعظم الأعشاب الطبية تحتوي على نوع أو أكثر من مضادات الأكسدة، ولكن بكميات متفاوتة وقد يقوم مضاد أكسدة معين بعدة وظائف، وقد تشترك عدة مضادات أكسدة أخرى بمهمة واحدة.ولا يخفى على أحد أن كل شعب عرف بفطرته تارة، وبخبرته تارة أخرى عددا من الأغذية التي تتميز بقدرتها على تقوية الجسم وحفظ الشباب ومداواة الأمراض، فعلى سبيل المثال استعمل الناس زيت الزيتون لمعالجة التسمم الناتج عن تناول الأغذية الفاسدة أو الناتج عن عضة الأفعى.واكتشفوا قدرة الرمان والزبيب على منح الجسم القوة والحيوية وإكساب الوجه نضارة وجمالا، وهناك قائمة طويلة من الأطعمة التي عرفها الناس منذ القدم واكتشفوا قيمتها واستعمالاتها الطبية [51].

II.3.3.4.الحالات المرضية ذات العلاقة بالمواد المؤكسدة:

عندما يزيد تعرض دفاعات الجسم إلى العوامل المؤكسدة وتصبح غير قادرة على معادلتها يطلق على هذه الحالة الإجهاد التأكسدي ، وهي عبارة عن حالة من عدم التوازن بين العوامل المحثة للتأكسد (العوامل المؤكسدة) والعوامل المضادة للأكسدة انظر الجدول **(II.9)** . وفي الحالة الطبيعية ، تكون العوامل المؤكسدة مثبطة بتأثير الدفاعات ضد الأكسدة ، أما في حالة إنتاج المواد المؤكسدة أو النقص في النظام الدفاعي فيمكن أن يختل هذا الاتزان ، مسبباً إجهاداً تأكسدياً و هذا ما يؤدي الى ظهور أمراض عديدة مثل أمراض القلب والأوعية الدموية والسرطان والشيخوخة وغيرها[45].

الجدول (9.II) : بعض مصادر العوامل المؤكسدة و العوامل المضادة للأكسدة

العوامل المؤكسدة	العوامل المضادة للاكسدة
▪ الالتهابات	▪ Vitamine E
▪ التدخين	▪ Vitamine C
▪ التمارين الرياضية العنيفة	▪ Uric acid
▪ الملوثات البيئية	▪ Carotenoide
▪ الاشعاع	▪ Glutathion
▪ الوجبة الغنية بالاحماض الدهنية عديدة اللاتشبع	▪ Superoxyde dismutase
▪ العوامل المسرطنة	▪ Catalase

الجانب العملي 2

II.1.4.الأجهزة و المواد المستعملة:

أ-الأجهزة و الأدوات المستعملة:

- جهاز التبخير الدوار (Rotavapeur) نوع (RV 06-ML) صنع (IKA).
- جهاز (UV-Visible) نوع (PRIM Advanced Spectrophotometers) بدقة (± 1 nm) صنع (SCHOTT Instruments GmbH) .

ب-المواد الكيميائية:

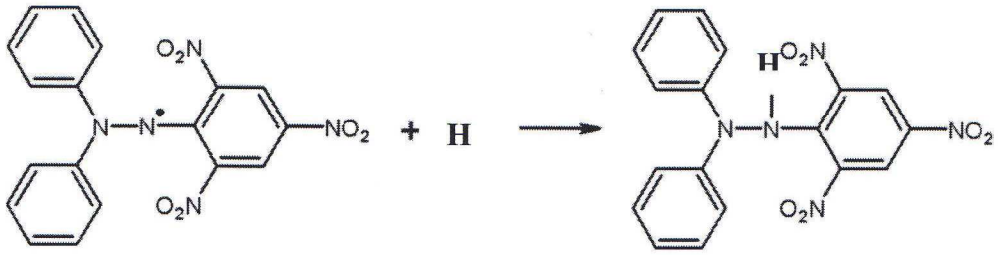
- ماء مكرر التقطير.
- الميثانول (CH_3-OH) ذو نقاوة (99%) إنتاج (BIOCHEM CHEMOPHARMA).
- (DPPH) ذو نقاوة (99%) إنتاج (MERCK)
- ($K_3Fe(CN)_6$) ذو نقاوة (99%) إنتاج (MERCK).
- حمض ثلاثي كلورو أسيتيك (TCA) او ($C_2HCl_3O_2$) ذو نقاوة (99%) إنتاج (BIOCHEM CHEMOPHARMA).
- حمض الأسكوربيك ($C_6H_6O_6$) ذو نقاوة (99.7%) إنتاج (MERCK).
- حمض الغاليك ($(OH)_3C_6H_2COOH,H_2O$) ذو نقاوة (99%) إنتاج (PROLABO).
- حمض ارثوفوسفوريك (H_3PO_4) ذو نقاوة (85%) إنتاج (RIEDEL).
- كلوريد الحديد الثلاثي ($FeCl_3$) ذو نقاوة (99%) إنتاج (MERCK).
- الروتين($C_{27}H_{30}O_{16}$) ذو نقاوة (99%) إنتاج (MERCK).

II.2.4. تقدير الفاعلية المضادة للأكسدة: هي قياس لقدرة المستخلص أو المركب لتثبيط الجذر الحر أو توقيف عملية الأكسدة، تقدر الفاعلية المضادة للأكسدة بعدة طرق نذكر منها:اختبار(DPPH) ،أو اختبار(FRAP) ،أو اختبار(ABTS)،أو اختبار(LMWA)،أو اختبار(TRAP)، او اختبار القدرة الإرجاعية(PR)، هذه الطرق تعتمد على التلوين ونزع التلوين في طول موجي معين[52].

في دراستنا هذه قمنا باختبار(DPPH) و إختبار القدرة الإرجاعية (PR).

II.1.2.4.اختبار DPPH: هو اختبار مضاد للجذور الحرة و قد سبق تعريفه من50 سنة ماضية من طرف العالم "بولواز" سنة 1958 ولقد إعتمد في ذلك على توضيح بعض الحسابات الخاصة بمضادات الأكسدة[53].

(DPPH) ثنائي فينيل بكريل هايدرازيل (diphenyl picrylhydrazyl) هي مادة صلبة لونها بنفسجي – مسود، يشتق هذا الجذر الحر من جزيئة (DPPH-H) ثنائي فينيل بكريل هايدرازين (diphenyl picryl hydrazine) وهي مادة صلبة غير جذرية لونها أصفر[54]



الشكل (24.I): معادلة تثبيط جذر DPPH في وجود مضادات الجذور الحرة

هذا الاختبار يعتمد على تثبيط الجذور الحرة حيث يترك 30 دقيقة مباشرة مع المستخلصات المضادة للجذور، مع العلم أن الجذر (DPPH) مستقر نسبيا يتفاعل مع جزيئة مضادة للجذور ليتحول إلى (DPPH-H) مع نقصان الامتصاصية عند طول الموجة الأعظمية λ_{max}= 517nm [55].

إن قدرة مضادات الجذور الحرة تحدد بعبارة كمية حسابية بدلالة تركيز المحلول لتثبيط 50% من الجذور الحرة ، النتيجة نعبر عنها ب IC_{50} و هي معرفة بتركيز المحلول بوحدة (g/l) بالنسبة للمستخلصات الخام أوبـ(mM) للمركبات النقية معلومة الكتلة المولية لتثبيط 50% من جذور (DPPH)، و تحسب انطلاقا من منحنيات التغير في نسب التثبيط المئوي% بدلالة تركيز المحلول، كلما كانت قيمة IC_{50} صغيرة كانت فعالية المضادات الجذرية كبيرة[56] [57].

هذا الاختبار مستعمل بكثرة نظرا للخصائص التي يتميز بها: سريعة، سهلة، غير مكلفة[55] 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).

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[55].

أ- 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 λ_{max}=517nm [54].

نجري نفس العملية على حمض الأسكوربيك(AA) وذلك قصد مقارنة فعالية مستخلصات البروبوليس بالمركبات المضادة للجذور الحرة و للأكسدة.

ب- نتائج الاختبار: نقوم بحساب النسبة المئوية للتثبيط (I%) و ذلك من العلاقة التالية:

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

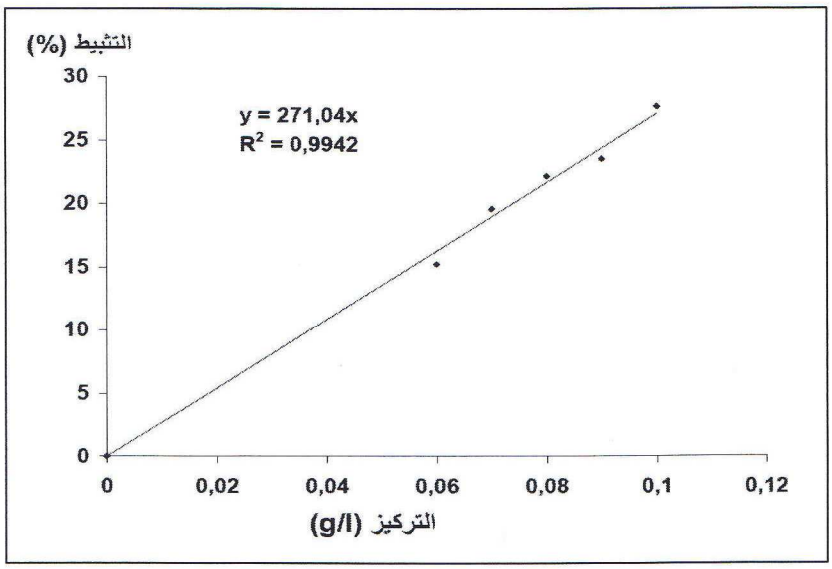
حيث أن:

A_0: الامتصاصية الضوئية للجذر الحر في غياب المستخلصات.

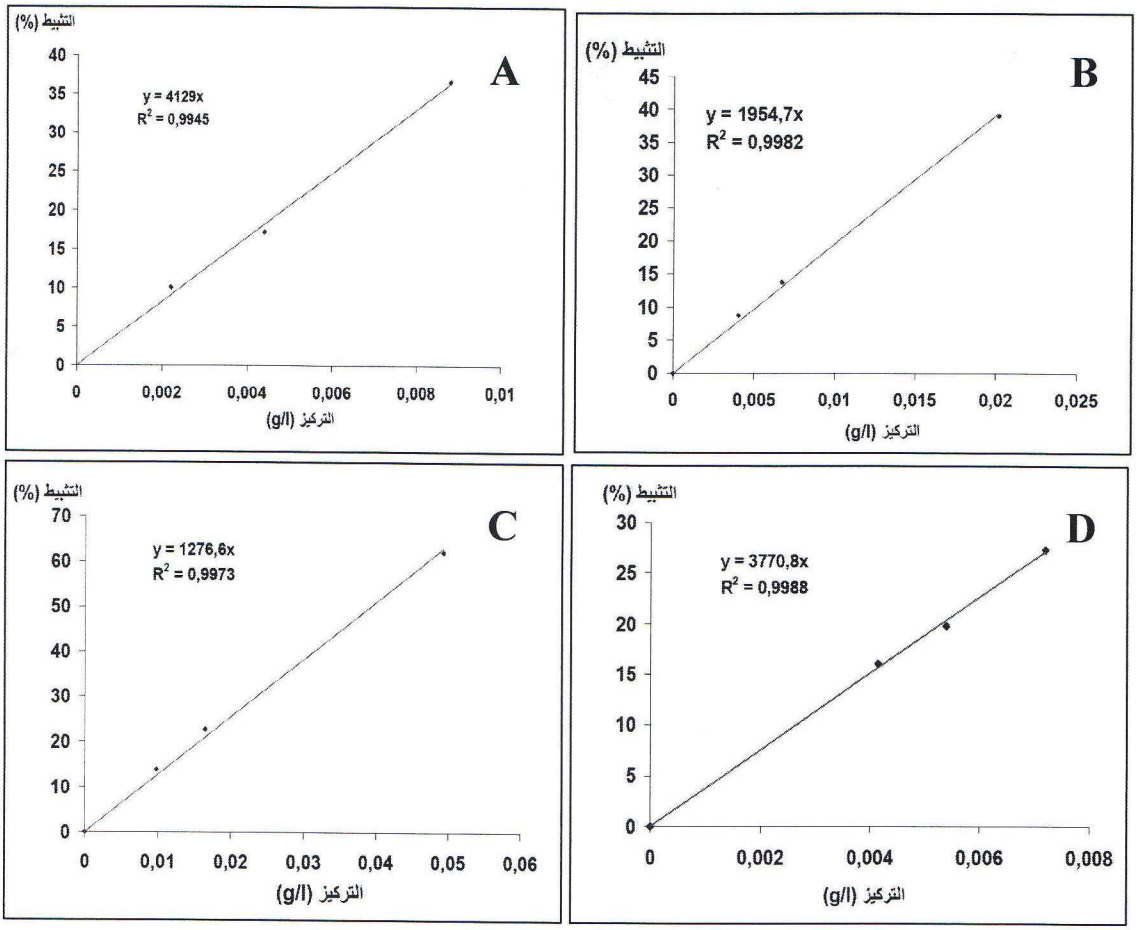
A_i: الامتصاصية الضوئية للخليط (الجذر + المستخلصات) بعد مرور 30 دقيقة.

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

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



المنحنى رقم (9.II): المنحنى القياسي لـ(AA)



المنحنى رقم (10.II): إختبار DPPH لمستخلصات البروبوليس

من منحنيات تغير النسبة المئوية للتثبيط بدلالة التركيز لكل من مستخلصات البروبوليس ولحمض الأسكوربيك(AA) نحسب قيم IC_{50} والتي دونت في الجدول **(10.II)**.

الجدول (10.II): نتائج إختبار DPPH لكل من مستخلصات البروبوليس ولحمض الأسكوربيك

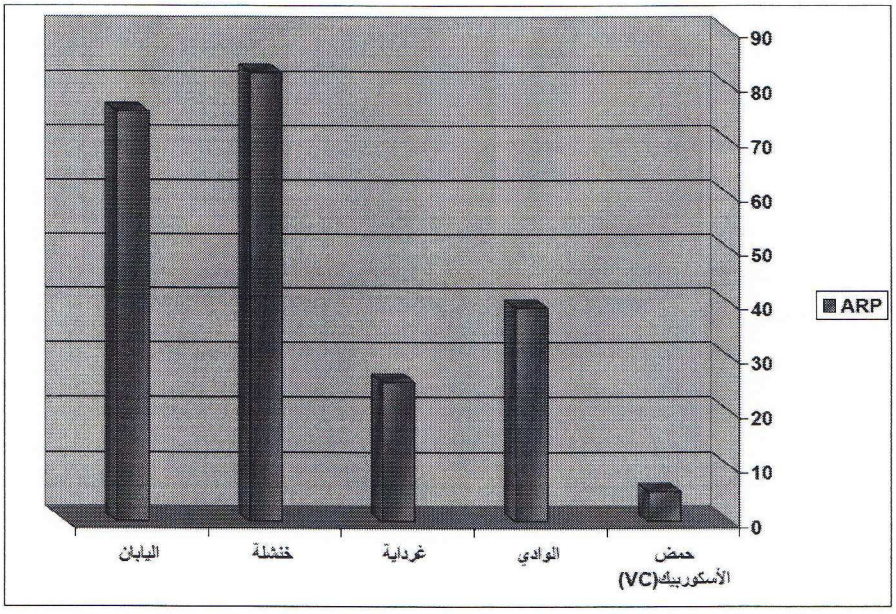
		قيم IC_{50} بـ g/l	ARP
	حمض الأسكوربيك(AA)	0.18447	5.421
A	بروبوليس خنشلة	0.01211	82.576
B	بروبوليس الوادي	0.02558	39.093
C	بروبوليس غرداية	0.03917	25.529
D	بروبوليس اليابان	0.01326	75.414

مناقشة النتائج المتحصل عليها :يتضح من خلال القيم المدونة في الجدول أعلاه أن الفعالية المضادة للأكسدة للبروبوليس هي أقوى من فعالية حمض الأسكوربيك حيث بلغت الفعالية في العينات المدروسة

أضعاف قوة حمض الأسكروبيك و اعتمادا على أنه كلما نقصت قيمة IC_{50} زادت الفعالية المضادة للأكسدة للمستخلص او استعمال قيمة (ARP) التي تزيد بزيادة الفعالية فان قيم الفعالية في:

- بروبوليس خنشلة 15 مرة ضعف حمض الأسكروبيك.
- بروبوليس اليابان 14 مرة ضعف حمض الأسكروبيك.
- بروبوليس الوادي 7 مرة ضعف حمض الأسكروبيك.
- بروبوليس غرداية 5 مرة ضعف حمض الأسكروبيك.

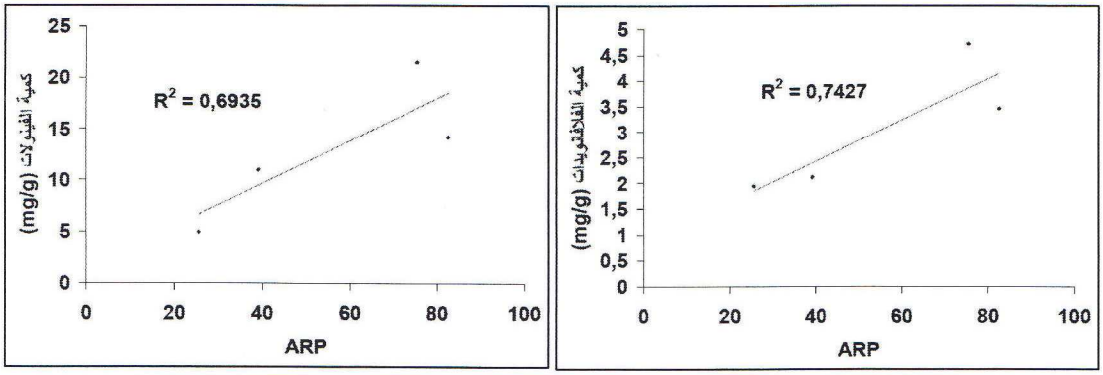
و لكي تكون المقارنة أوضح نمثل النتائج في المنحني**(11.II)**.



المنحنى رقم (11.II): مقارنة نتائج إختبار DPPH لمستخلصات البروبوليس

المنحنى يوضح أن الفعالية المضادة للأكسدة لبروبوليس خنشلة كانت الأكبر يليها بروبوليس اليابان و كانت قيمتاهما متقاربة إلى حد ما، فيما كانت قيمة الفعالية المضادة للأكسدة لبروبوليس الوادي و غرداية ضعيفة نسبيا حيث لم تتجاوز نصف قيمة فعالية خنشلة و اليابان، فعالية بروبوليس غرداية برغم من ضعفها الا انها افضل من حمض الأسكروبيك.

إن تفسير هذه النتائج يرجعنا إلى الجزء الأول من هذا الفصل حيث يمكننا استغلال نتائج التقدير الكمي للفينولات و الفلافانويدات في إيجاد علاقة بينهما و بين قيم الفعالية المضادة للأكسدة خاصة و أن النظرة الأولية تظهر أن هناك ترابط، و بالفعل هذا ما يعكسه المنحنى(12.II).



المنحنى (12.II):يوضح علاقة الارتباط بين كمية الفينولات و الفلافانويدات ونتائج اختبار الفعالية المضادة للأكسدة(DPPH) للمستخلصات

و منه فإن ارتفاع الفعالية المضادة للأكسدة في مستخلصات البروبوليس راجع إلى غناها بالمركبات الفينولية.

2.2.4.II.اختبار القدرة الإرجاعية لمستخلصات البروبوليس:

يعتبر اختبار القدرة أو الكفاءة الإرجاعية اختبارا مباشرا وسريعا وهو يستعمل أساسا لقياس مدى قدرة مضادات الأكسدة ، ويستعمل هذا الاختبار لتحديد الفعالية المضادة للأكسدة للمستخلصات المدروسة في وسط متعادل يعتمد على إرجاع $[Fe(CN)_6]^{3-}$ إلى $[Fe(CN)_6]^{4-}$ والذي يعطي في وجود الحديد الثلاثي لون أزرق باهت، يمكن قياس الإمتصاصية بجهاز (UV-Vis) عند طول موجة λ_{max}=700nm [58].

وهذا وفق المعادلة:

$$[Fe(CN)_6]^{3-} + é \text{ (ناتج من الفينولات)} \longrightarrow [Fe(CN)_6]^{4-}$$

لون أصفر — معقد أزرق

حيث أنه تم تحديد اختبار القدرة الأرجاعية في سنة 1986 من طرف **Oyaizu** [59] [60].

و يتم قياس الفعالية المضادة للأكسدة وفق مقدار جديد يدعى **AEAC** : وهو يمثل الفعالية المضادة للأكسدة المكافئة لحمض الأسكوربيك من طرف المستخلصات المدروسة (Ascorbic acide Equivalent Antioxydant Capacity)

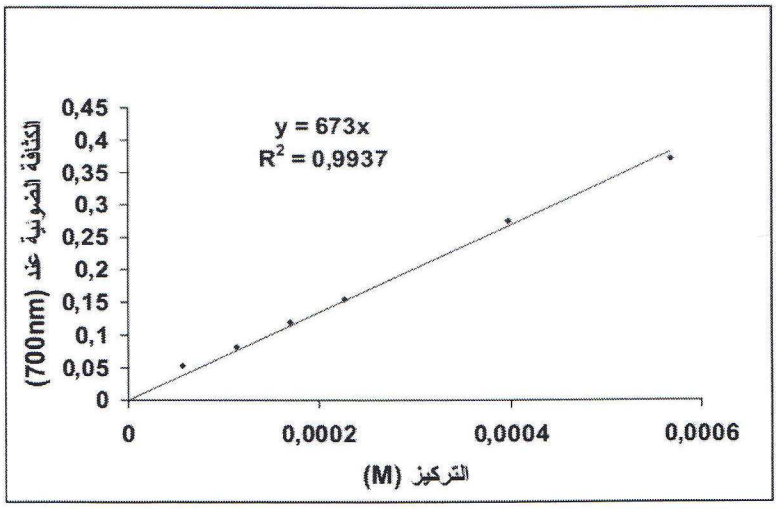
حددنا الفعالية المضادة للأكسدة لمستخلصاتنا بالنسبة لحمض الأسكوربيك (AA) لذلك يستلزم رسم منحي قياسي لهذا الفينول المرجعي.

طريقة العمل:

أ.المنحنى القياسي لحمض الأسكوربيك: ويتم ذلك عمليا بتحضير محاليل ذات تراكيز مختلفة لحمض الأسكوربيك محصورة مابين (0.1 - 0.01 g/l).

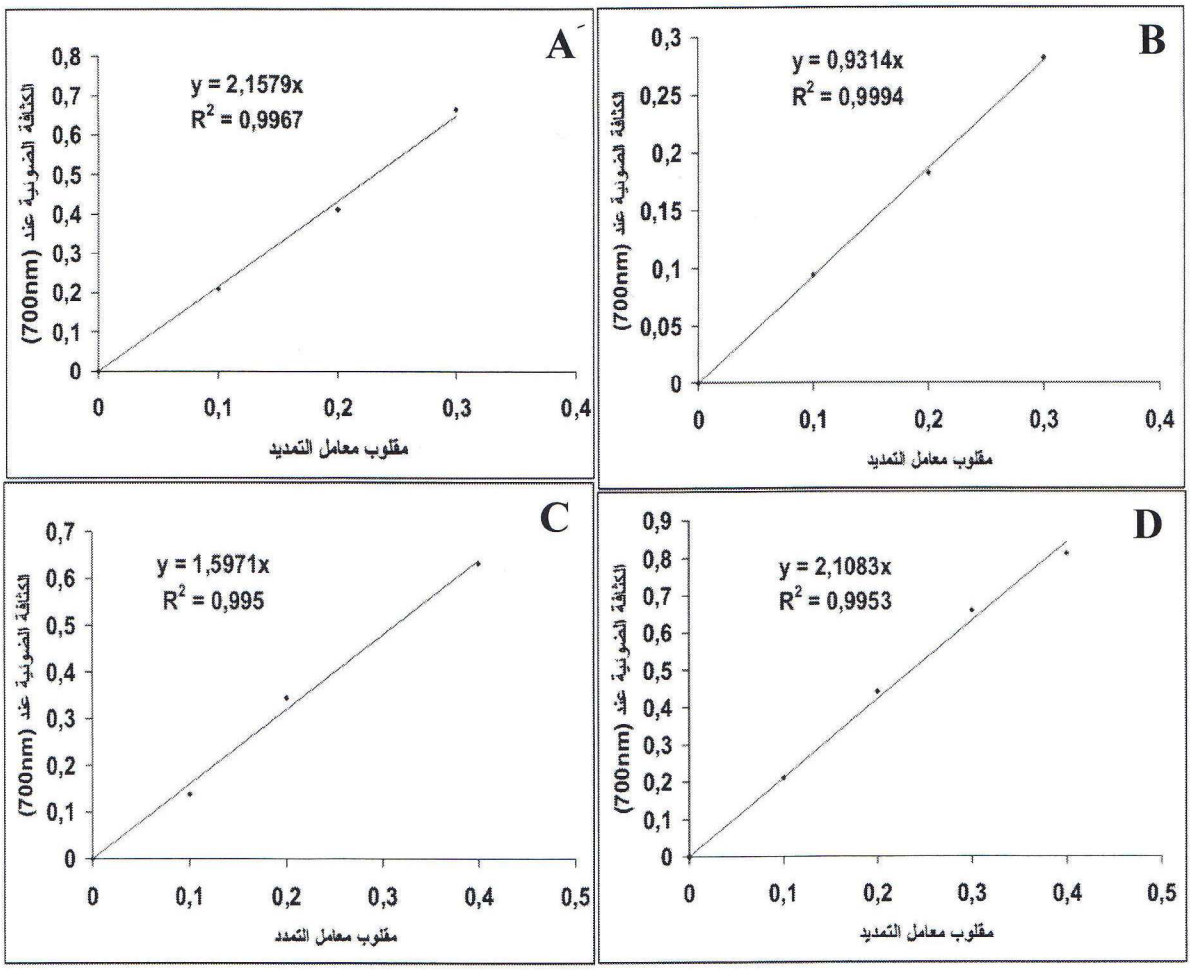
نأخذ في أنبوب اختبار 1ml من كل محلول ممدد ، نضيف 2.5ml من المحلول $K_3Fe(CN)_6$ (1%) ثم نضيف 2.5ml من محلول الفوسفات منظم tampon (phosphatée) (pH=6.6 ، 0.2M) ، نضع المحاليل في حمام مائي لمدة 20 دقيقة عند درجة حرارة 50°C بعدها نضيف 2.5ml من حمض ثلاثي كلورور أسيتيك (TCA 10%) ثم نأخذ 2.5ml من المحلول المحضر +2.5ml من الماء المقطر+0.5ml من$FeCl_3$ (0.1%) نحسب الامتصاصية عند طول موجة λ_{max}= 700nm . نسجل القيم[61].

و نرسم المنحنى القياسي لحمض الأسكوربيك الكثافة الضوئية بدلالة التركيز A=f(C) .



المنحنى رقم (13.II): المنحنى القياسي لـ(AA)

ب. رسم منحنيات المستخلصات: نقوم بتمديد المستخلصات الفينولية ونعاملها نفس معاملة حمض الأسكوربيك ونسجل التغير في قيم الكثافة الضوئية بدلالة مقلوب معامل التمديد، نرسم منحنيات اختبار القدرة الإرجاعية للمستخلصات الميثانولية.

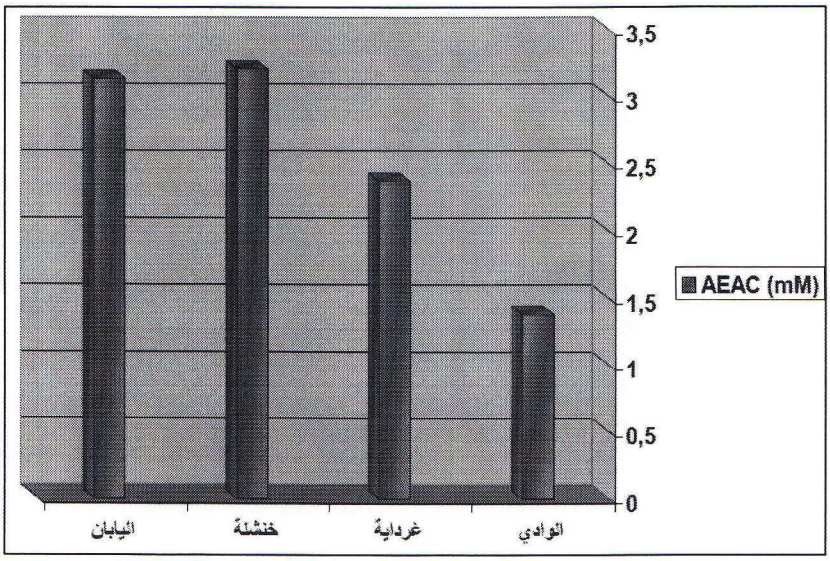


المنحنى رقم (14.II): إختبار القدرة الإرجاعية لمستخلصات البروبوليس

نقوم بتلخيص نتائج اختبار القدرة الإرجاعية لمستخلصات البروبوليس في الجدول **(11.II)** و مقارنتها في المنحنى **(15.II)**.

الجدول(11.II): نتائج اختبار القدرة الإرجاعية لمستخلصات البروبوليس

	العينات	الفعالية المضادة للأكسدة AEAC (mM)
A	بروبوليس خنشلة	3.2064
B	بروبوليس الوادي	1.384
C	بروبوليس غرداية	2.3731
D	بروبوليس اليابان	3.1327

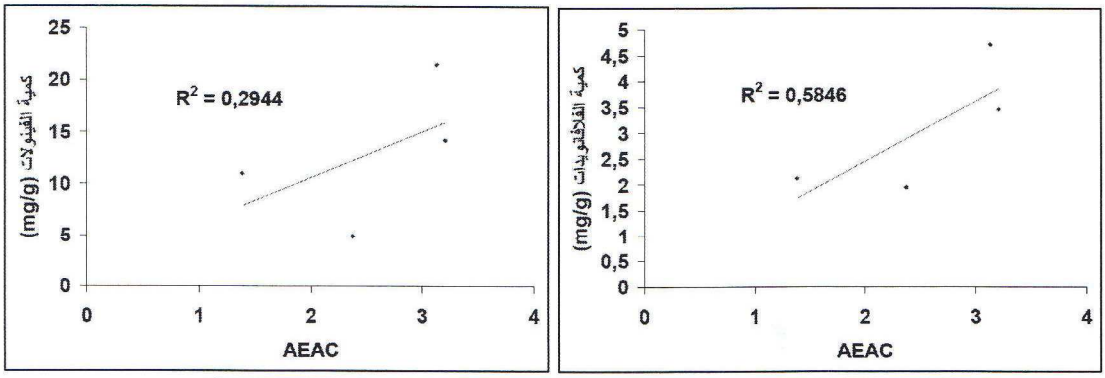


المنحنى رقم (15.II): مقارنة نتائج إختبار القدرة الإرجاعية لمستخلصات البروبوليس

مناقشة النتائج المتحصل عليها :

يتضح من خلال النتائج المتحصل عليها و الممثلة أعلاه أن القدرة الإرجاعية للمستخلصات جاءت مختلفة فيما بينها خاصة بروبوليس خنشلة و اليابان حيث كانت القيم مرتفعة و تجاوز كليهما (3,13mM) و(3,2mM) على الترتيب، فيما كانت قيم القدرة الإرجاعية لكل من بروبوليس غرداية و الوادي ضعيفة مقارنة بما سبق حيث لم تتجاوز القدرة الإرجاعية للوادي (1,38 mM) فيما كانت لغرداية (2,37mM).

النتائج المتحصل عليها يمكن تفسيرها كما في الجزء السابق و ذلك بناءا على علاقتها بكمية الفينولات و الفلافانويدات و لتوضيح ذلك نعتمد على المنحنى **(16.II)**.

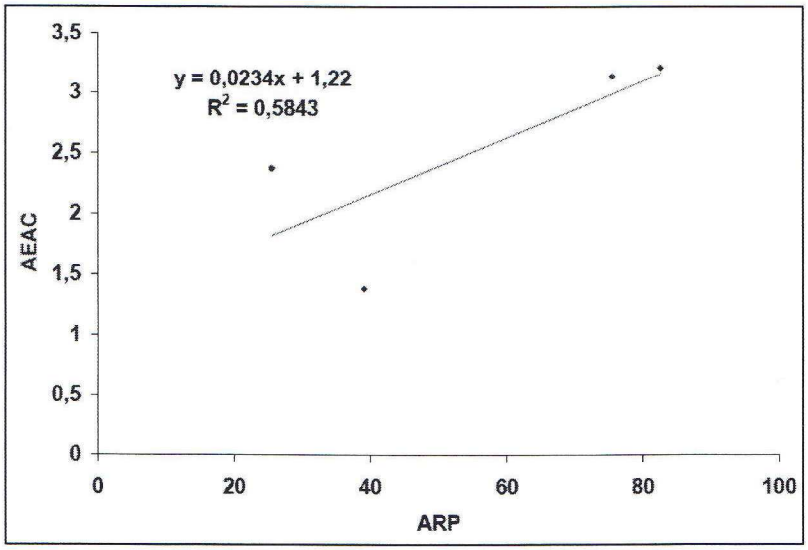


المنحنى (16.II):يوضح علاقة الارتباط بين كمية الفينولات و الفلافانويدات ونتائج اختبار القدرة الإرجاعية للمستخلصات

من خلال المنحنى اعلاه يظهر جليا ضعف الترابط بين نتائج اختبار القدرة الارجاعية و كمية الفينولات حيث لم تتجاوز($R^2 = 0,29$) ، بينما نلاحظ ان هناك علاقة ترابط اقوى بين القدرة الإرجاعية و كمية الفلافانويدات بلغ ($R^2 = 0,58$)، و منه نستطيع ان نقول ان الفعالية المضادة للأكسدة ليست مرتبطة بكمية الفينولات بشكل مطلق بقدر ماهي مرتبطة بنوعية و بنية الجزيئات و طبيعة الوسط الذي اجري فيه الاختبار.

إن اختبار (DPPH) لتقدير الفعالية المضادة للأكسدة و اختبار القدرة الإرجاعية (PR) هما اختباران يعتمدان على و سطين مختلفين الأول يتم في وسط عضوي و الثاني يتم في وسط مائي و هذا يحول دون تطابق نتائج الاختبارين،كما يفسر هذا الاختلاف تغير الترتيب الحاصل بين الفعالية المضادة للأكسدة لبروبوليس غرداية و الوادي إذ تقدم بروبوليس الوادي على غرداية في الاختبار الأول (DPPH) بينما حصل العكس في الاختبار الثاني.

رغم هذا الاختلاف في الاختبارين إلا أن هناك علاقة ترابط و لو نسبية بينهما تظهرها النتائج المتحصل عليها و الموضحة بالمنحنى **(17.II)**.



المنحنى (17.II):يوضح علاقة الارتباط بين نتائج اختبار DPPH ونتائج اختبار القدرة الإرجاعية للمستخلصات

المراجـــع

10. ن. فراش ،" إستخلاص فصل و تحديد منتوج الأيض الثانوي عند نبات centaurea lippii الفعالية البيولوجية" مذكرة ماجيستير جامعة منتوري قسنطينة 2002.

11. ص. عكال،" البحث عن الفلافانويدات عند ثلاث أنواع للجنس سانتوريا الجزائري C.Fulfuracea, C.Napifolia, C.Pullata الفعالية البيولوجية" رسالة دكتوراه جامعة منتوري قسنطينة2001.

13.د. م. هيكل، د.ع. عمر ، "النباتات الطيبة و العطرية،" مركز الدلتا للطباعة، مصر الطبعة الثانية 1993 ص514.

20.ب. صبرينة البتول. «الفعالية المضادة للأكسدة الزيوت الطيارة والمركبات الفينولية لـ Deverra» «scoparia، مذكرة ماجيستير، جامعة قاصدي مرباح ورقلة، 2007.

36. م. بوقوادة.« دراسة فيتوكيميائية للبيبدات والفينولات في بعض أنواع نوى التمر المحلي»، مذكرة ماجيستير، جامعة قاصدي مرباح ورقلة، 2008.

37.ستانلي هـ.باين،دونالد ج.كرام ،جيمس ب .هندريكسون،جورج س .هاموند :ترجمة د.أحمدي عبد العزيز ياسين،جمال حسن تمام،محمد علي خليفة،الكيمياء العضوية -المجلد الثاني ،دار ماكجروهيل للنشر الطبعة الرابعة1983 .

38.س.ه. باين، ج.ب. هندريكسون، د.ج. كرام، ج.س. هاموند الكيمياء العضوية المجلد الثاني الطبعة الرابعة 1995، الدار الدولية للنشر و التوزيع.

39.الدكتور: ى.ل.على " الأسس الإلكتروني لميكانيكية التفاعلات العضوية " الطبعة الأولى 2002 دار الفجر للنشر و التوزيع.

44.الدكتور: س.ع. المظفر،" الكيمياء الحياتية" الجزء الثاني (France- Sima-Rotomage) 1981.

46.د.بشرى البشير، التغذية والصحة ،الأدارة العامة للتغذية بوزارة الصحة السعوية2003.

47.أل دبليو.أوراند،أي إي وودز،ترجمة د.عادل جورج ساجدي،د.علاء يحي محمد علي ،كيمياء الأغذية ،جامعة البصرة .الطبعة الأولى 1983.

48.د.باسل كامل دلالي ،د.كامل الركابي ، كيمياء الأغذية ،دار الكتب للطباعة والنشر جامعة الموصل 1981.

49.فؤاد عبد العزيز الشيخ ،صناعة زيت النخيل ومشتقاته،دار النشر للجامعات الطبعة الأولى 1999.

50. د. رضوان صدقي فرج ،كيمياء البيبدات ،مركز النشر لجامعة القاهرة 1991.

51. درويش مصطفى الشافعي،مجلة القافلة،أفريل 2000.

المراجع الأجنبية

1.E. de Rijke P.Out, W.M.A. Niessen, F.Ariese, C.Gooijer, U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr.* A 1112 (2006) 31–63

2.B.H. Havsteen . *Pharmacology & Therapeutics* 96 (2002) 67–202.

3 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.

4. P.RIBEREAU GAYON, Les composés phénoluque des végteaux. Imp. Samie, Bordeoux, France,1968.

5. J.BRUNATON, Pharmacognosie. 3eme edition, TEC. et DOC. , Paris, 1999.

6.E.Grotewold, The Science of Flavonoids (1-123), 1ST ed , Columbus, Ohio, USA, Springer Science_Business Media, Inc, 2006.

7. E.MIDLETON , The flavonoides trends pharmacol Science. *Art. Sci.* 5(1984)335-338.

8. M. PARIS et M. HURABIELLE. Arébgé Matiére Médicale. Tome 1. Ed. Masson, Paris, 1986.,465.

9. N. Kacem .Contribution phytochimique à l'étude des composes flavoniques de la plante Teucrium Flavum (L) (Labiées). Thése de Magister, Universite Mentouri .Constantine .

12. T. BAHORUV. Substances naturelles actives , la flore mauricienne, une source d'approvionnement potentielle, Université de Maurice, 1896.

14. E. Middleton et J.R.C. Kandaswami ., Ed Gauthier-Villarde.paris, 1992.

15. M.N. Kim., lescao-Bogert.L et Paris.M, , *Planta Med*, 58(1992) 285-286.

16. L.C. Cardenas., J. Rodriguez., M.C.Villaverde, R.Rignera, R.Cadena, J.A.Otero, , *Planta Med*, 59(1993) 26-27.

17.S. Jovanovic, S. Steenken, Y. Hara, M. Simic, *J. Chem. Soc. Perkin* 2 (1996) 2497.

18. S. V. Jovanovic; S.Steenken,; M.Tosic; B.Marjanovic; M.Simic, *J. Am.Chem. Soc.* 116 (1994) 4846.

19. A. J.Blasco,; M. C. González,.; A.Escarpa, *Anal. Chim. Acta* 511 (2004) 71.

21. S.MITRA, Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry, 162(37-223), 1ST ed , Hoboken, New Jersey., John Wiley & Sons, Inc, 2003.

22. J. Bertand., J. Bordet., J.P. Bordet., P. Legoff., N. Midoux., M .N. Pons. D.Tondeur., Et J.Villermaux., « Génie des Procèdes », Ed Techniques et Documentations La Voisier,1993.

23. S.W. HOLLER., « Chimie Analytique », Ed DE BOECK et lacier,1997.

24. B.Trusheva, D.Trunkova , V.Bankova, *Chemistry Central Journal* 1 (2007) 13 .

25. I.B.S. Cunha, ACHF.Sawaya, F.M. Caetano, M.T. Shimizu, M.C. Marcucci, F.T.Drezza, G.S.Povia, P.O. Carvalho. *J.Braz.Chem.Soc.*, 15(6) (2004)964-970.

26. G. M.C.Machado, L.L.Leon, S.L.D.Castro, Activity of Brazilian and Bulgarian propolis against different, Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 102(2007)73-77.

27. M.R.Ahn, S.Kumazawa, T.Hamasaka, Y.Usui, J.Nakamura, M.Matsuka, , F.Zhu, , T.Nakayama, *Journal Food Chemistry* 101 (2007) 1383–1392 .

28.C.C.CHANG, M.H.YANG, H.M.WEN,J.C.CHERN, *Journal of Food and Drug Analysis*, 10, (3) (2002) 178-182.

29. B.L.B. Valadares, U. Graf , M.A. Spano, *Food and Chemical Toxicology* 46 (2008) 1103–1110.

30. C. Gardana, M.Scaglianti, P.Pietta, P.Simonetti, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 45 (2007) 390–399.

31. C.BERSET, M.E. CUVELIER. *Sci.Aliments*, 16(1996)219-245.

32. B.I.GINER-Chavez. "Condensed tannins is tropical farages" these ph.D, Cornell Universiyt, Ithaca,USA, 1996.

33. J.B.RORSSELL., Measurement of racidity. In : rancidity in foods.J.C.Allen and R.J Hamilton (eds) Elsevier. Amsterdan, (1989) 23,25.

34. C.Quettier-Deleu, *journal of Ethnopharmacology*, 72 (2000) 35-42.

35. C.Enrique, P.Lester. « Handbook of Antioxidants», 2eme ed, New York • Basel.Marcel Dekker, Inc. 2002.

40. N.J. TURRO., A. MASAYUKI., L.R.GOULD., *J.AM.Chem.Soc*, 104 (1982) 856-858.

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

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

43. G.OLIVE. « Synthèse de nouvelles nitrones du Type Pyrroline-N- Oxide et leur utilisation en spin-trapping», Thèse de doctorate, université d'Aix – Marseille III, 1998.

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

52.L.M. Magalhaes, M.A. Segundo, S. Reis, J.L.F.C. Lima. *Anal. Chim. Acta.* 613(2008)1–19.

53. V.Bondet,; W.Brand-Williams, C. Berset, *Lebensm. Wiss. Technol.*, 30(**1997**)609-615.

54. P.Molyneux, *song klana Karin J. sci technol.,* 26 (2004) 211-219.

55. W. Brand Williams., C.Berset., M.E.Cuvelier. *Wissen.U.Tech*, 28(1995)25-30.

56.BLOIS, Détermination antioxydants de M.S. par l'utilisation d'un radical libre stable nature, 181(1958) 1199-2000.

57. M.Uchiyama, Y.Suzuki., K.fukuzawa, Etude biochimiques de la fonction physiologique du tcopherolactome. *Yakgaku Zasshi* 88(1968) 680, 683.

58.I.F.F BENZIE, J.J. STAIN. *Anal Biochen.* 239(1996) 70-76.

59. M.Oyaizu; *Japanese Journal of Nutrition*, 44(1986)307–315,

60. S .Yuanxia; H.Shigeru; O.Masahiro; I.Ken , *Food Control*,18(2007)220–227.

61. J.F.LESGERDS. Contribution à l'étude du statut antioxydant de l'homme aspects chimiques et biochimiques (thèse de doctorat) Université d'Aix Marseille,e Septembre 2000.

الفصل الثالث

الدراسة الكهروكيميائية لمضادات الأكسدة

الجانب النظري

III.1.1.المقدمة:

الطريقة الكهروكيميائية هي انسب الطرق التحليلية لتقدير الفعالية المضادة للأكسدة لما تتمتع به من ايجابيات و المتمثلة في: حساسيتها؛ قلة تكلفتها؛ سرعتها و الكم الهائل من المعلومات المفيدة التي توفره، حيث كانت الخصائص الكهروكيميائية هي العوامل الأساسية التي تم توظيفها لتقدير القدرة الإرجاعية أو الفعالية المضادة للأكسدة، لكون كمون الأكسدة الكهربائي له علاقة بمفهوم القدرة الإرجاعية[1].

و لأنها بسيطة و تفاعلاتها تتم من خلال آلية مماثلة لما يحدث في خلايا جسم الإنسان والكائنات الحية الأخرى، ستكون الطرق الكهروكيميائية البديل الأفضل للطرق التقليدية لتقدير الفعالية المضادة للأكسدة[2][3][4].

III.2.1.العوامل التي ساهمت في ظهور التقنية الكهروكيميائية:

هناك العديد من العوامل التي عجلت بطرح الطرق الكهروكيميائية كبديل لتقدير الفعالية المضادة للأكسدة، منها ما يتعلق بتحديات و نقائص واجهت استخدام الطرق التقليدية، و منها ما يتعلق بالمزايا التي تتمتع بها الطرق الكهروكيميائية التحليلية.

III.1.2.1.التحديات و النقائص التي واجهت استخدام الطرق التقليدية:

على الرغم من تنوع الطرق التقليدية لتقدير الفعالية المضادة للأكسدة فقد بقى هناك الكثير من المشاكل و التحديات المطروحة بقوة للمختصين في هذا المجال نذكر منها[5]:

- عدم القدرة على مقارنة النتائج البحثية لطريقتين مختلفتين أجريت على نفس العينة.
- عدم وجود دراسات كافية لآليات النشاط المضاد للأكسدة للعديد من المركبات.
- عدم وجود دراسات كاملة لتأثير العديد من العوامل على الفعالية المضادة للأكسدة.
- عدم وجود معيار موحد للتقييم، سواء من الناحية الكمية أو قيمة الفعالية.
- عدم وجود قواعد موحدة تحدد النسبة و المحتوى لمضادات الأكسدة (التركيز و التقدير الأفضل).
- معرفة محدودة بمُدة تأثير مضادات الأكسدة التي تكون في العادة عبارة عن مزيج من المركبات، و مدى التوافق بين تركيبتها.

- أبحاث غير كافية عن تأثير درجة الحموضة (pH)، و المعالجة الحرارية أو الميكانيكية على النشاط المضاد للأكسدة للمركبات المدروسة.
- عدم وجود عينات مرجعية قياسية لتقييم الفعالية المضادة للأكسدة.
- عدم وجود مصطلحات، و سلم قياس و تفاعلات نموذجية موحدة لتحديد النشاط المضاد للأكسدة.
- إشكالية تقدير الفعالية المضادة للأكسدة في بلازما الدم و الأنسجة الحية، حيث العكارة تعيق عملية التقدير في الطرق الطيفية .
- عدم كفاية الطرق و الأجهزة لاعتمادها في تقييم فعالية مضادات الأكسدة.

III.2.2.1.مزايا الطرق الكهروكيميائية التحليلية:

تتميز الطرق الكهروكيميائية بالعديد من المزايا و الجوانب الايجابية جعلتها تتصدر طرق التحليل الكيميائي سواء الكيفي آو الكمي و تكون طريقة مقترحة كبديل للطرق التقليدية لتقدير مضادات الأكسدة، نعدد أهمها في مايلي[5]:

- تعتبر من أدق طرق التحليل.
- الطريقة يمكنها تحليل أي مادة و مهما كانت طبيعتها و في أي وسط مختار (مائي، عضوي)، (حمضي، قاعدي).
- معظم العمليات الكيميائية و الحيوية، بما في ذلك عملية الإرجاع، تتم وفق آليات كهروكيميائية.
- أنها لا تتطلب إلا كمية محدودة من المادة المدروسة.
- أنها تسمح لنا بدراسة تأثير العديد من العوامل على نشاط مضادات الأكسدة: كدرجة الحموضة، طبيعة الالكتروليت و المذيبات وغيرها.
- أنها طريقة لا تتطلب كواشف أو مواد كيميائية ماعدا الالكتروليت المساعد.
- يمكن بهذه الطريقة تقييم النشاط المضاد للأكسدة في وسط ذو قيم pH مختلفة.
- طريقة تتميز بحساسية عالية، وانخفاض تكاليفها.
- طريقة تتيح امكانات كبيرة للبحث في مجالات لا حصر لها مثل الكيمياء و البيولوجيا و الطب، خاصة و أنها تظهر تأثيرات الأدوية و مضادات الأكسدة.

III.3.2.1.المواد التي يمكن دراستها كهر وكيميائيا:

- المنتجات الغذائية.

- المنتجات المستخدمة في مستحضرات التجميل.
- المنتجات الصيدلانية.
- المستخلصات النباتية والمواد المضافة النشطة بجيولوجيا.
- المواد البيولوجية مثل مصل الدم البشري والحيواني[5].

III.3.1.الجزيئات المضادة للأكسدة:

تنقسم مضادات الأكسدة الطبيعية إلى قسمين من حيث طبيعة جزيئاتها[6]:

- مضادات الأكسدة مرتفعة الوزن الجزيء بروتينية زلالية(The proteins albumin)، نذكر على سبيل المثال (transferrin, caeruloplasmin, ferritin, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase)... الأخ.
- مضادات الأكسدة منخفضة الوزن ألجزيئي (Low molecular weight antioxidants (LMWA)) حيث يلعب هذا النوع من مضادات الأكسدة دورا رئيسيا في حماية الأنظمة الحيوية من الأكسجين النشط و مشتقاته (ROS).

تعريف مضادات الأكسدة منخفضة الوزن ألجزيئي:

هي مجموعة من المركبات المتواجدة في الأنسجة الحية (سواء كانت حيوانية أو نباتية) تعمل مباشرة على تثبيط الجذور الحرة (بإعطائها الكترونات) و المتمثلة في الأكسجين النشط و مشتقاته (ROS) و النتروجين النشط و مشتقاته (RNS)، أو بشكل غير مباشر عن طريق استخلاب المعادن الانتقالية (transition metal chelation)، و هي جزيئات صغيرة كما هو واضح من تسميتها (LMWA) يمكنها النفاذ عبر جدران الخلايا الحية بسهولة، و هي تمثل القسم الأكبر من مضادات الأكسدة أي أن اغلب مضادات الأكسدة هي ذات وزن جزيئي منخفض نذكر منها: حمض اليوريك، حمض الأسكروبيك، فيتامين (E)، الكاروتينيدات، غلوتاثيون، إنزيم فوق أكسيد ديسميوتيز، إنزيم الكتالاز، الفلافانويدات و باقي الفينولات[7].

مصادرها: اكبر و أهم مصدر مضادات الأكسدة منخفضة الوزن ألجزيئي هي الخضر و الفواكه الطازجة.

III.4.1.الطرق الكهروكيميائية:

الطرق الكهروكيميائية التي اقترحت و تم تجريبها و أعطت نتائج مذهلة هي تلك التي طورت في روسيا في العقد الأخير أي في بداية عام 2000 و تمثلت في:

- الطريقة الامبيرومترية و التي اقترحت من طرف الباحث (Y. I. Yashin) [8]
- الطريقة البوتنسيومترية اقترحت من طرف الباحثة (H.Z. Braynina) [9][10][11][12] و تمكنت من تطويرها و الحصول على براءة اختراع [13].
- الطريقة الكالومترية من طرف الباحث (G.K. Budnikov) [14][15][16]، و تمكن هو الأخر من تطويرها و الحصول على براءة اختراع[17].
- الطريقة الفولطاأمبيرومترية من طرف الباحث (Korotkova) [5] [18].

هذه الأخيرة التي تطرق لها لأول مرة (S.Chevion) و (R.kohen) في بكورة ابحاثهما حول مضادات الأكسدة في جسم الإنسان[19]، و هذا لحل إشكالية تقدير الفعالية المضادة للأكسدة في بلازما الدم و الأنسجة الحية، حيث كانت العكارة تعيق عملية التقدير في الطرق الطيفية بالإضافة إلى الزمن الكبير الذي تستغرقه هذه الطرق[20].

لقد كان هدف الباحثان هو إيجاد طريقة بسيطة و سريعة و دقيقة تمكنهم من تقدير الفعالية المضادة للأكسدة في الأنظمة الحية، و ذلك لمتابعة المرضى و تشخيص حالاتهم الصحية، كما يمكنهم من اختبار الأدوية و آثارها[21]. و قد تمكنا من تطوير هذه الطريقة أكثر من مرة و تم تعميمها لتشمل أصناف أخرى من المواد المدروسة عدا الأنسجة الحية [22] و بلازما الدم[23]، فقد تم دراسة المركبات النقية و الخلائط المعقدة[24] و المواد الغذائية و مستخلصات النباتات مثل الشاي و القهوة [25] و عدد كبير من النباتات العطرية [26] و الخضر مثل الفلفل و البصل [27] و الفواكه [28]، حتى الالبان [29] و الخمور[30].

III.5.1.أسس دراسة الفولطاأمبيرومترية لمضادات الأكسدة:

فكرة التحليل الفولطاأمبيرومتري لمضادات الأكسدة اقترحت بعد إعادة النظر جذريا في الطرق التقليدية المعتمدة في تقدير مضادات الأكسدة على المستويات الكمية أو الفاعلية للمواضيع المدروسة. هذا الطرح الجديد وضعت له أسس نظرية جديدة فيها برهان لطرائق و آليات تأثير مضادات الأكسدة و تم ذلك من خلال وضع علاقات رياضية جديدة لحساب العوامل الحركية للعمليات التي تجري على الأقطاب[31]، و وضعت أيضا مقاربات جديدة لمعالجة الإشارة التحليلية الناتجة.

الحلول المبتكرة التي اقترحت في هذا المجال تُحقِقَ منها على المستويين النظري والعملي، وهو تقدم لا يمكن إنكاره في التحليل الفولطاأمبيرومتري لمضادات الأكسدة، تم هذا لِوَضع الأسس المستقبلية لابتكار جهاز يمكنه تحديد كمية و فعالية المواد المضادة للأكسدة سواء كانت مركبات معزولة أو مزيج معقد.

و تتلخص أسس دراسة طرق التحليل الفولطاأمبيرومتري في معرفة نقطتين مهمتين هما:

- معرفة التقنية الفولطاأمبيرومترية المستعملة.
- معرفة الخصائص الكهروكيميائية للمواد المدروسة.

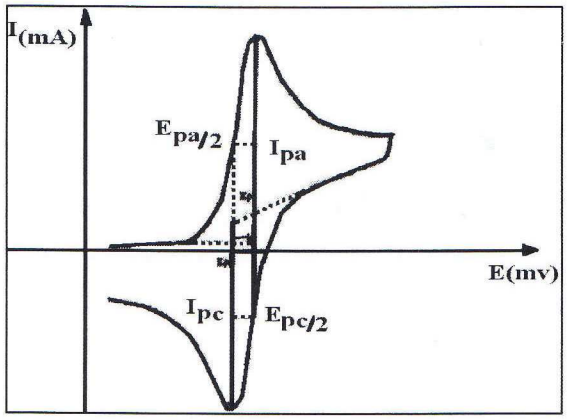
وسنتطرق للنقطتين بالتفصيل.

III.1.5.1.التقنية الفولطاأمبيرومترية الحلقية:

التعريف: إنّ تقنية الفولطاأمبيرومترية الحلقية هي واحدة من طرق التحليل الكهروكيميائي، وفيها يطبق فرق الكمون المتغير على مسرى العمل بالنسبة للمسرى المرجعي. تسمح هذه الطريقة على الخصوص بتحديد الشروط التي ينجز فيها تفاعل الأكسدة والإرجاع، وكذا تقدير درجة عكوسيّة جملة (أكسدة-إرجاع)، كما تسمح أحيانا بتحديد آلية التفاعل عند المسرى خاصة عندما تشترك تفاعلات كيميائية في نقل الإلكترونات (الآليةECE.EE.EC) وكذلك تحديد ثوابت السرعة للتفاعلات الكهروكيميائية السريعة.

حيث أنّ ظاهرة الانتشار هي المسؤولة الوحيدة عن نقل المواد الفعّالة، أما الهجرة الأيونية يتمّ عزلها باستعمال الكهروليت المساعد. يتم مسح فرق الكمونات في هذه الطريقة بصورة حلقية، فبعد إجراء المسح مثلا باتجاه فرق الكمونات المصعدية وإنجاز تفاعل أكسدة، يعكس اتجاه تغيرات فرق الكمون لإجراء مسح في اتجاه فرق الكمونات المهبطة. والشكل العام للمنحنيات الفولطاأمبيرومتري الحلقية ممثل بالشكل **(1.III)** للحالة الأكثر بساطة التي تحدث فيها عملية أكسدة واحدة متبوعة بعملية إرجاع في المجال المدروس[32][33].

إن المنحنى I=f(E) التجريبي والنظري مميّز بنتوء للتيّار ألمهبطي يليه نتوء مصعدي، هذه النتوءات تتميز بالمقادير التجريبية الممثلة في الشكل **(1.III)**:



الشكل (1.III): المقادير الأساسية لمنحنى الفولطاأمبيرومتري الحلقي

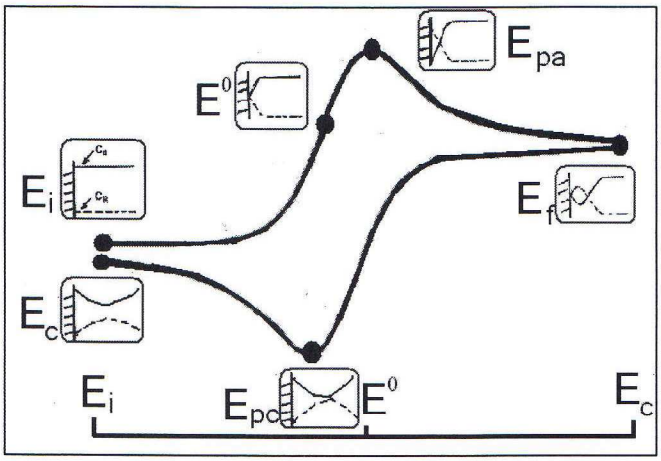
Ip_a،Ip_c: تيارات النتوءات المصعدية و المهبطية على الترتيب.

Ep_a،Ep_c : كمونات النتوءات المصعدية و المهبطية على الترتيب.

$Ep_{a/2}$،$Ep_{c/2}$: كمونات نصف النتوءات المصعدية و المهبطية على الترتيب.

ΔEp :التغير في الكمونات بين Ip_c وIp_a.

تفسير منحنى الفولطاأمبيرومتري الحلقي:



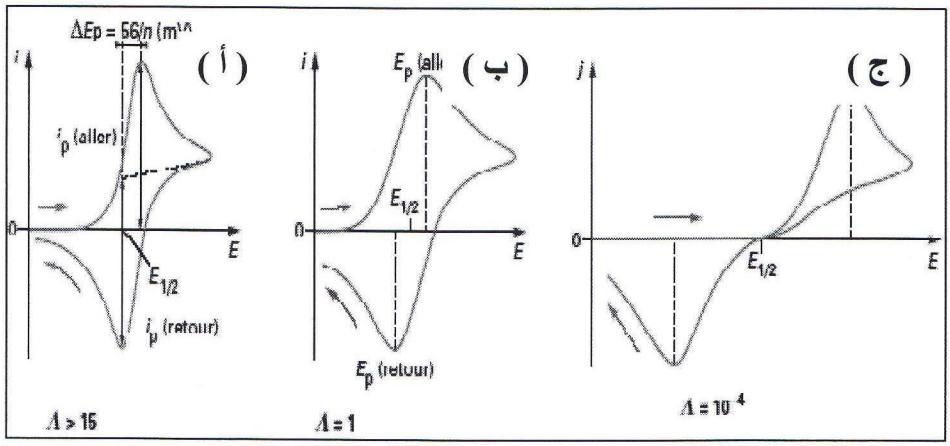
الشكل (2.III):مخطط بياني مفصل للمنحنى I=f(E) لانتقال إلكترون واحد

إن تركيز المواد المتفاعلة R والمواد الناتجة P مشار إليه في منحنى الفولطاأمبيرومتري الحلقي المعطى بالشكل (2. III)، عند فروق كمونات مختلفة. تمثلEp_c وEp_a فرق الكمون ألمهبطي و المصعدي على التوالي[32].

- عند فرق الكمون E_i : ليس هناك أيّة مادة كهروفعّالة ويكون تركيز المادة المتفاعلة R مساويا C_0 في المحلول وكذلك عند المسرى، أما تركيز ناتج التفاعل P فمن البديهي أن يكون مساويا للصفر.
- عند فرق الكمون E^0 : تكون المادة الكهروفعّالة R عند المسرى في تناقص، بينما المادة الناتجة P يزداد.
- عند فرق الكمون Ep_a :يتناهى تركيز المادة المتفاعلة R للصفر في جوار المسرى، في حين أن تركيز المادة الناتجة P يؤول إلى C_0 . وهو ما نفسره بظاهرة استهلاك المادة الكهروفعّالة R في جوار المسرى نتيجة لسرعة المسح العالية.
- عند فرق الكمون E_f : يزداد سمك طبقة الانتشار لأن المادة الناتجة تنتشر في المحلول ويتناقص مقدار التركيز إلى أن يتناهى إلى مقدار ثابت، ثم يعكس اتجاه المسح لفرق الكمونات.

- عند فرق الكمون Ep_c : في هذه الحالة فإن المادة الناتجة P الكهروفعّالة هي التي تكون موجودة عند المسرى،وهي التي تخضع للاستهلاك فيتناقص تركيزها عند المسرى متناهيا للصفر. في حين أن تركيز المادة R يقترب مرّة أخرى من C_0 ونعود من جديد إلى فرق الكمون الابتدائي.

إن الطريقة الفولطاأمبيرومتري الحلقية تسمح بدراسة عكوسيّة الانتقال الالكتروني [34] وحسب الحالات فإننا نحصل على منحنيات الفولطاأمبيرومتري الحلقية الموضحة في **الشكل (3.III):**



الشكل (3.III): منحنيات الفولطاأمبيرومتري الحلقي لـ: (أ): نظام عكوس، (ب): نظام نصف عكوس، (ج): نظام بطيء

- **العبارات الرياضية لشدة التيار وكمون النتوءات في حالة انتقال الشحنة :**

العبارات الرياضية لكل من التيار والجهد طورت في البداية من طرف الباحثين رينـدلس و سـيفيك (Rendels et sevik) [35][36].وكان ذلك من أجل المسح ذهابا فقط للأنظمة السريعة ، وبعد ذلك جاء الباحث ديلهاي (Delhay) [37] حيث خصص دراسته للأنظمة البطيئة ، هذه النظريات قام بتطويرها الباحثان أياب وماتسيده (Matsuda et Ayabe) [38] لتشمل الأنظمة النصف السريعة ، أما الأعمال التي قام بها كل من نيكولسن و شين (Nicholson et Shain) [39] هو الربط بين العلاقات النظرية وبعض النقاط الأساسية للمنحنى التجريبي الناتجة عن المسح الدوري:

- **حالة التحول الشحني السريع (النظام السريع):**

$$Ox + né \rightleftharpoons Red$$

التيار يعطى بالعلاقة التالية: $Ip = 2.69.10^5.A.n^{3/2}.D_R^{1/2}.C_R.V^{1/2}$ (mA)

(Ia) و (Sa) يتعلقان بتركيز الجزيئات (LMWA)، فمن التيار يمكننا تحديد تركيز المركبات الموجودة في العينة المدروسة [19] و من مساحة الموجة المصعدية يمكننا تحديد قيمة القدرة الارجاعية المكافئة للعينة [23]، أي العينة كاملة دون الحاجة إلى معرفة كل مركب على حدا.

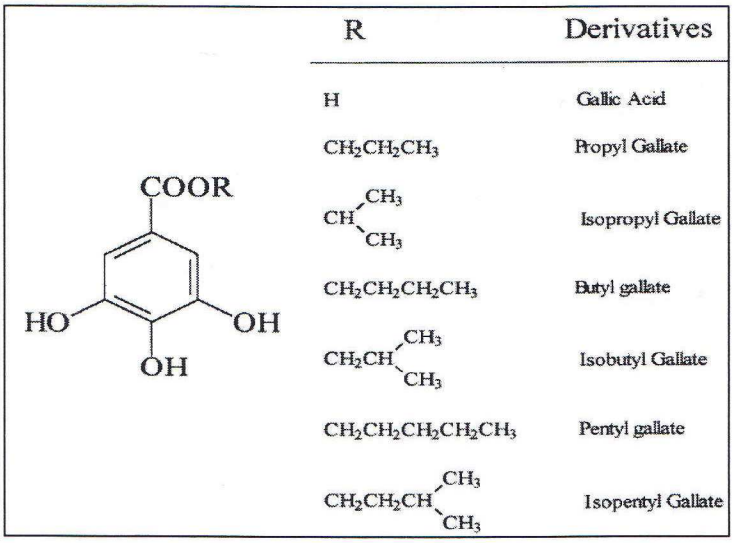
لقد تم الاعتماد على مساحة الموجة المصعدية (Sa) بدلا من التيار المصعدي الحدي (Ia) لتقييم القدرة الارجاعية لأنه أفضل عامل يعكس القدرة الارجاعية كما أثبتت ذلك الدراسات السابقة و هذا بعد مقارنة النتائج المتحصل عليها بنتائج التحليل الكروماتوغرافي عالي الكفاءة (HPLS)، بالإضافة إلى ذلك يحل إشكال وجود أكثر من إشارة لمركب (أي اكثرمن تيار حدي واحد) [19] [21] [23].

إن النتائج المتحصل عليها من المنحنى الفولطأمبيرومتري الحلقي للعينة المدروسة يتم مقارنتها بعامل أخر إضافي هو حمض الغاليك أو الأسكروبيك حيث يلعب دور المركب القياسي الذي يفضله اغلب الباحثين و الذي منه يمكن استخلاص القدرة الارجاعية المكافئة [23].

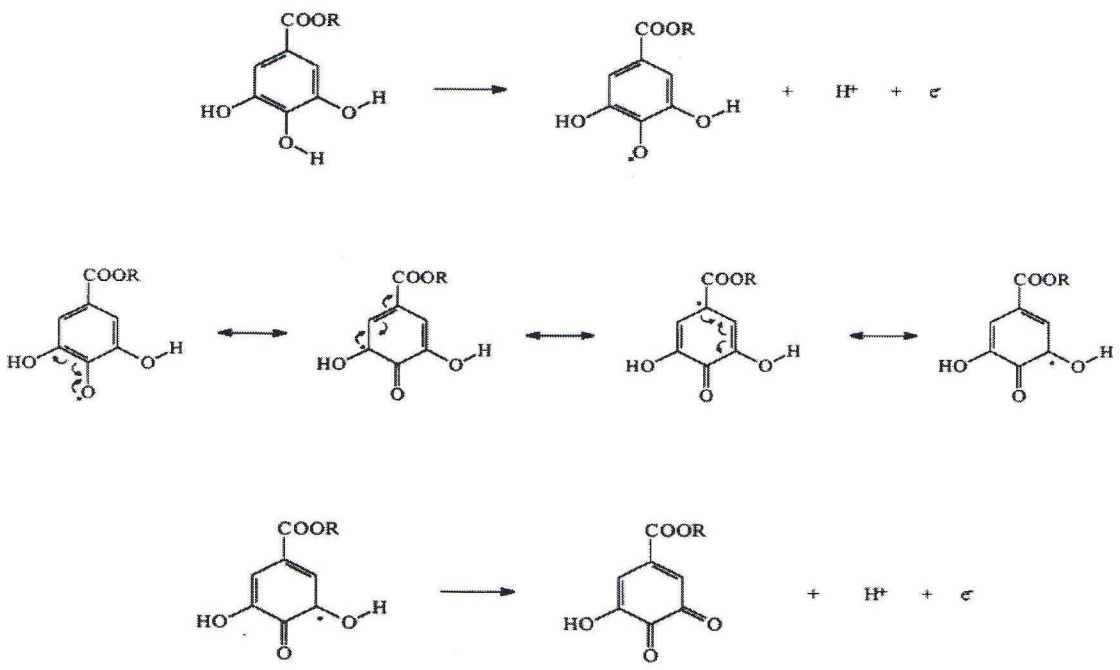
بعد معرفة أسس الطرق الفولطأمبيرومترية الحلقية و الخصائص الكهروكيميائية للمواد المدروسة نباشر عملية تقدير القوة الارجاعية أو الفعالية المضادة للأكسدة و هذا بأخذ حمض الغاليك كمركب قياسي.

- **تقدير القوة الارجاعية بأخذ حمض الغاليك كمركب قياسي:**

حمض الغاليك يمكن أن يكون نموذج لأكثر الفينولات لما يتميز به من حيث البنية الجزيئية كما هو موضح في الشكل **(6.III)**، و السلوك الكهروكيميائي كما هو موضح في آلية أكسدته في الشكل **(7.III)**[48][49]..



الشكل (6.III): حمض الغاليك و مشتقاته

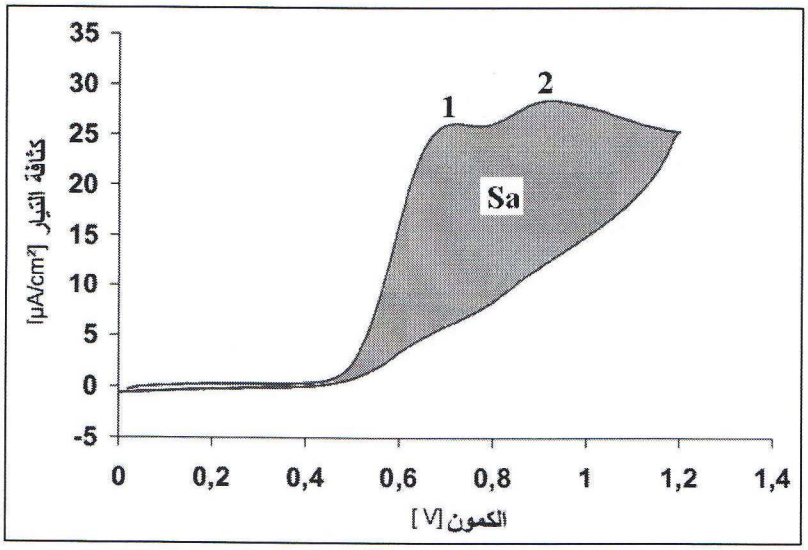


الشكل (7.III):آلية أكسدة حمض الغاليك و مشتقاته

ب/.الخطوات المتبعة[21] [23]:

الخطوة الأولي: يتم تحضير حمض الغاليك بتركيز معلوم، و كذلك تحضير الخلية الكهروكيميائية التي تحوي على وسط موقي ذو (pH=2) و كهر وليت مساعد هو (KCl).

الخطوة الثانية: نرسم المنحنيات الفولطأمبيرومترية الحلقية وفق تراكيز متزايدة لحمض الغاليك في الخلية الكهروكيميائية، حيث تتم هذه الخطوة بعد ضبط الشروط المتمثلة في مجال الفاعلية و سرعة المسح الشكل **(11.III)**.

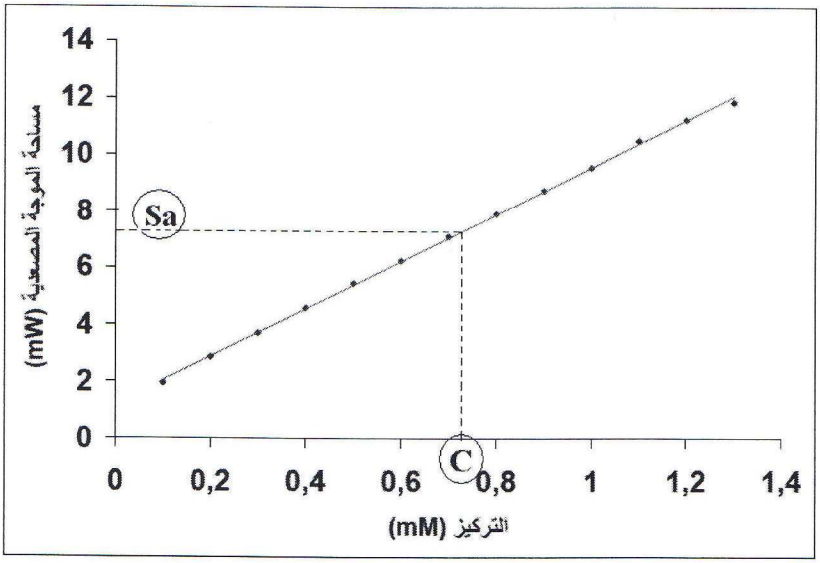


الشكل (8.III): منحنى الفولطاأمبيرومتري الحلقي لحمض الغاليك pH=2. (E) من (0 الى 1200 mV)، سرعة المسح 100 mV/s.

الخطوة الثالثة: نحسب مساحة الموجة المصعدية لكل منحنى من المنحنيات الفولطاأمبيرومترية الحلقية المرفقة بكل تركيز كما هو موضح بالشكل **(9.III)**.

الخطوة الرابعة: نرسم المنحنى القياسي للمساحة المصعدية بدلالة التركيز Sa = F(C).

الخطوة الخامسة: نرسم المنحنى الفولطاأمبيرومتري الحلقي للعينة المدروسة ثم نحسب المساحة المصعدية التي يتم إسقاطها على المنحنى القياسي، فنحصل على التركيز المكافئ من حمض الغاليك.



الشكل (9.III):المنحنى القياسي (GA)

III.2.6.1.الطريقة الثانية:

أ/.مبدأ الطريقة: أن عملية إرجاع الأوكسجين هي بمثابة تفاعل نموذجي لعملية الإرجاع في خلايا الكائنات الحية هاته العملية التي تتم هي نفسها ما يحدث للمنتجات الطبيعية و الصناعية[50].

هذه الطريقة مبنية على حركية التفاعل بين الأوكسجين النشط ($O_2^{\bullet-}$) و المواد المضادة للأكسدة، التقنية الفولطاأمبيرومترية استخدمت لإنتاج الأوكسجين النشط ($O_2^{\bullet-}$) و ذلك بإرجاع الأوكسجين في أوساط غير مبرتنة (aprotique) حيث يتميز الأوكسجين النشط ($O_2^{\bullet-}$) بأنه طويل العمر في هذه الأوساط[51]، في نفس التقنية يمكن قياس الانخفاض في مستوى الجذور الحرة ($O_2^{\bullet-}$) مباشرة من قيمة التيار المصعدي الذي يتناقص عند أكسدة هذه الجذور بواسطة تراكيز متزايدة للمواد المضادة للأكسدة محل الدراسة [50].

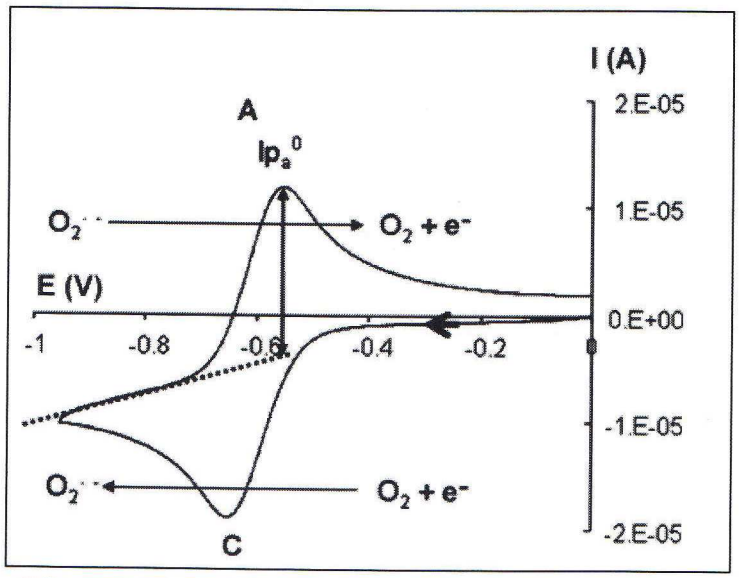
الطريقة اعتمدت بعد عمليات إحصائية لتقدير الفعالية المضادة للأكسدة للفينولات و مضادات الأكسدة القياسية مثل: الترولكس، حمض الأسكروبيك، حمض الغاليك.

الارتباطات الخطية بين التيار المصعدي للاوكسيجن النشط ($O_2^{\bullet-}$) و تراكيز المواد المضادة للأكسدة مكنتنا من وضع دليل إحصائي لقيم مضادات الأكسدة للتثبيط 30% و 50% من الأوكسجين النشط أي AI30 و AI50[50].

ب/.الخطوات المتبعة:

الخطوة الأولى: تحضير خلية تحتوي على (DMF) فائق النقاوة بها 0.1M من الكهروليت المساعد (Bu_4NPF_6) ، نشبع المحتوى بالهواء الجاف لمدة 10 دقائق. في هذه الشروط ذوبانية الأوكسجين تقدر بـ (0.94×10^{-3}M) هذه القيمة متعلقة بالظغط (0.2 bar). سرعة المسح 100 mV/s، مجال مسح الكمون (E) من (0 إلى 0.9 V-)، نرسم المنحنى الفولطاأمبيرومتري في هذه الشروط انظر الشكل **(10.III)**.

الخطوة الثانية: نحضر محلول يحوي على (2.5×10^{-2} M) من مضاد الأكسدة المختار ، يتم الإضافة تدريجيا للخلية الكهروكيميائية التي تحتوي على المحلول المشبع بالأوكسجين حتى يصل مضاد الأكسدة لتركيز (0–2.50 mM) ، نرسم المنحنيات الفولطاأمبيرومترية المتعلقة بكل تركيز، بسرعة مسح (100 mV/s) الشكل **(10.III)**.



الشكل (10.III): المنحنى الفولطاأمبيرومتري الحلقي للأوكسجين في 0.1M /DMF من (Bu_4NPF_6) **سرعة مسح** (100 mV/s)

بيان الخطوتان[50]**:**

التقنية الفولطاأمبيرومترية الحلقية استخدمت لإنتاج الأوكسجين النشط ($O_2^{\cdot -}$) و ذلك بإرجاع جزيئات الاوكسجين المذاب في محلول (DMF) خلال طبقة الانتشار على مسرى الكربون الزجاجي، حيث يكتسب الأوكسجين إلكترون فيصبح جذر ($O_2^{\cdot -}$) انظر **الشكل (10.III)**. النتوء (C).

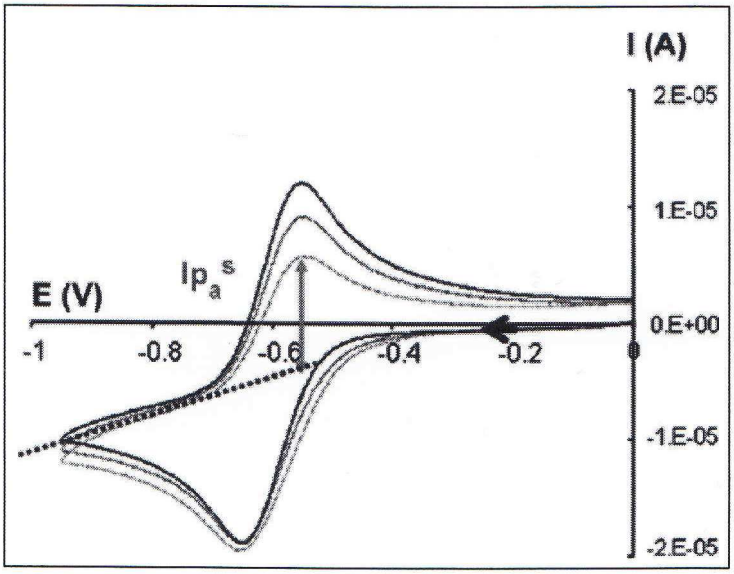
وجود جذر ($O_2^{\cdot -}$) سهل الكشف بواسطة التيار المصعدي المقاس على نفس المسرى خلال المسح العكسي كما هو موضح في الشكل **(10.III)** النتوء (A). نعلم أن إرجاع (O_2) هو تفاعل عكوس كما نعلم أيضا أن الجذر ($O_2^{\cdot -}$) جذر مستقر في الأوساط الغير مبرتنة (aprotique). و بالتالي فالطريقة من أسهل الطرق لتوليد جذر ($O_2^{\cdot -}$) بدون أن نحتاج إلى أنظمة إنزيمية من اجل دراسة تفاعلاته مع الجزيئات أو المستخلصات. المواد المدروسة تكون غير نشطة في مجال كمون إرجاع الأوكسجين، لكي لا يحدث أي تداخل أو تعقيد يحول دون تفسير النتائج. إذ بالرغم أن الفينولات عوامل مرجعة إلا أن أكسدتها تتم في المجال الموجب للكمون أي بعيدا عن مجال أكسدة و إرجاع الزوج .($O_2^{\cdot -}/O_2$)

في الخطوة الأولى: يتم رسم المنحنى الفولطاأمبيرومتري للمحلول المشبع بالأوكسجين قبل إضافة المادة المدروسة و نأخذ التيار المصعدي(I^0_{Pa}) كتيار لأكسدة ($O_2^{\cdot -}$). (I^0_{Pa}) يتعلق مباشرة بتركيز ($O_2^{\cdot -}$) على سطح المسرى و يعتمد على ذوبانية الأوكسجين في (DMF) و الشروط التجريبية الابتدائية. و بشكل

أوضح من المهم أن يكون (I^0_{Pa}) محدد و متماثل في كل التجربة، يعني نفس زمن المسح و نفس سطح المسرى. و هذا يُتَحكم فيه عن طريق سرعة المسح (100 mV/s) و مجال المسح (0 إلى 0.9 V-).

في الخطوة الثانية: يرسم المنحنى الفولطاأمبيرومتري لإرجاع (O_2) في وجود المواد الفينولية أو مضادة الأكسدة القياسية، يتم تقييم الفعالية المضادة للأكسدة للجريئة تبعا لتفاعلها مع ($O_2^{\cdot-}$) ، الزيادة في تركيز المواد المضادة للأكسدة يؤدي إلى نقصان في شدة التيار المصعدي(I^S_{Pa}) لـ ($O_2^{\cdot-}$) ، بينما شدة التيار ألمهبطي لم تتغير انظر الشكل **(11.III)**.

التناقص في التيار المصعدي لـ($O_2^{\cdot-}$) يدل على أن الفينولات تفاعلت مع ($O_2^{\cdot-}$) بشكل غير عكوس، لكل مركب من المركبات المدروسة سلسلة من قيم التيار المصعدي (I^S_{Pa}) التي نحصل عليها من رسم المنحنيات الفولطاأمبيرومترية الحلقية خلال زيادة تراكيز المركبات المضادة للأكسدة انظر الشكل **(11.III)**.



الشكل (11.III): المنحنى الفولطاأمبيرومتري الحلقي لإرجاع الأوكسجين في وجود تراكيز متزايدة من Phloroglucinol **في** (Bu_4NPF_6) **من 0.1M /DMF سرعة مسح** (100 mV/s)

(▬▬) 0 mM; (▬▬) 0.49 mM; (▬▬) 1.64 mM.

السلوك الكهروكيميائي للأوكسجين موضح في المعادلات (3-2-1) حيث (AH) هو مركب فينولي أو مضاد الأكسدة. بعد التفاعل العكوس لإرجاع الأوكسجين(1) الجذر ($O_2^{\cdot-}$) يتفاعل مع مضاد الأكسدة (AH) (2) مما يؤدي إلى الحصول على نواتج غير فعالة، في هذا التفاعل يمكن افتراض انتقال للهيدروجين (3) من ($A^{\cdot}$) و يتكون جذر فينوكسي أو فينوكسيل.

الدراسات السابقة أثبتت أن منح المواد المضادة للأكسدة لبروتونات يزيد من شدة التيار ألمهبطي لإرجاع الأوكسجين من إلكترون واحد إلى إلكترونين [52][53][54].الآلية تبدأ بمنح بروتون(4) تليها إعطاء إلكترون (5) و بعدها يمنح البروتون الثاني (6) ليكون التفاعل الإجمالي هو تبادل إلكترونين في عملية إرجاع الأوكسجين(7).

$$O_2 + e^- \leftrightarrows O_2^{\bullet -} \quad (1)$$

$$O_2^{\bullet -} + AH \rightarrow \text{electroinactive compounds} \quad (2)$$

$$O_2^{\bullet -} + AH \rightarrow O_2H^- + A^{\bullet} \quad (3)$$

$$O_2^{\bullet -} + AH \rightarrow HO_2^{\bullet} + A^- \quad (4)$$

$$HO_2^{\bullet} + O_2^{\bullet -} \rightarrow HO_2^- + O_2 \quad (5)$$

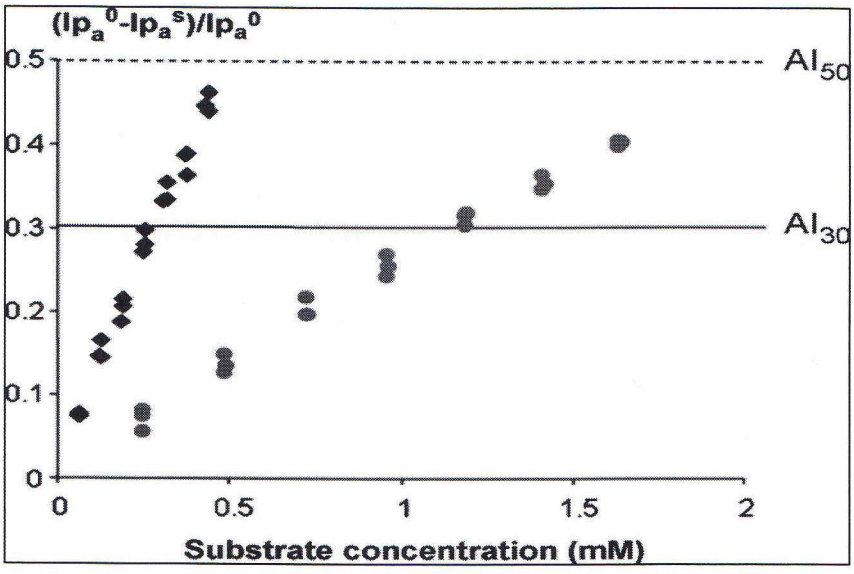
$$HO_2^- + AH \rightarrow H_2O_2 + A^- \quad (6)$$

$$O_2 + 2e^- + 2\,AH \rightarrow H_2O_2 + 2A^- \quad (7)$$

في الشروط التجريبية الموضوعة في هذه الدراسة، لم يلاحظ مع الفينولات زيادة في شدة تيار إرجاع الأوكسجين كما هو مذكور في الآلية المقترحة و المتمثل في آلية منح البروتون، إضافة إلى ذلك لوحظ أثناء المسح العكسي عدم وجود نتوء مصعدي يدل على أكسدة الفينوكسيد (-A) و منح البروتون في المعادلة (4)، إذا من هذه الملاحظة يمكن أن نفترض أن مركبات الفينولات تتفاعل مع جذر فوق الأكسيد كمانح للبروتونات كما بينت الدراسات السابقة[55].

يمكن التعبير عن استهلاك الجذر ($O_2^{\cdot -}$) بالعبارة التالية:

$(I^0_{Pa} - I^S_{Pa}) / I^0_{Pa}$ و التي يمكن رسم منحناها بدلالة تركيز المواد المضادة للأكسدة المتزايد فتكون النتيجة عبارة عن مستقيم كما هو موضح في الشكل **(12.III)**.



الشكل (12.III):منحنى يوضح عبارة التيار بدلالة تركيز مضادات الأكسدة

((●) trolox; (♦) quercetin)

تحت نفس الشروط التجريبية حركية التفاعل بين مضادات الأكسدة يمكن أن تستخرج من ميل المنحنى الخطي للشكل **(12.III)**، على سبيل المثال التروكس القياسي اقل فعالية بأربع مرات من الكيرستين و بالتالي فهذا الميل اخذ للتعبير عن الفعالية المضادة للأكسدة و تم على أساسه و ضع دليل لهذه القيم (AI) و الجدول يوضح هذه الخاصية[50].

الجدول (1.III): جدول يوضح كيفية تقييم الفعالية المضادة للأكسدة من خلال نتائج المنحنى السابق

المركبات	الميل	Y	R^2	AI_{30}(mM)	AI_{50} (mM)
التروكس	0.239	0.020	0.995	1.14	1.97
حمض الأسكروبيك	0.740	0.031	0.987	0.37	0.64
الكيرستين	0.976	0.025	0.994	0.27	0.46
الروتين	0.405	0.024	0.991	0.72	1.24

بوضع الدليلين الجديدين وهما (AI_{30}) و (AI_{50}) و يعبران عن التركيز بـ(mM) لمضادات الأكسدة من اجل تثبيط 30% و 50% على التولي من الجذور الحرة لـ ($O_2^{\cdot-}$) و المعبر عنها بنقصان التيار(I^0_{Pa}) [50]، حيث:

$$AI = (I^0_{Pa} - I^S_{Pa}) / I^0_{Pa} = (0.3 \text{ or } 0.5)$$

كما هو موضح في الشكل **(12.III)** ، كما يمكن أن نستنتج أن كلما كانت قيمة (AI) منخفضة كلما كانت قابلية مضادات الأكسدة عالية لإرجاع ($O_2^{\cdot-}$) و بالتالي فعالية مضادة للأكسدة أكبر انظر الجدول **(1.III)**.

الجانب العملي

في هذا القسم تم مباشرة العمل بالطريقة الفولطاأمبيرومترية الحلقية الأولى و فق الخطوات المشروحة في عرض الطريقة، و بمساعدة التجهيز و المواد المدرجة أسفله و هذا بعد تحضير العينات المدروسة.

III.1.2.الأجهزة و المواد المستعملة:

العينات:

تم تحضير المستخلصات الميثانولية للبروبوليس المحفوظة سابقا ذات تراكيز (20 mg/ml) أي من المادة الصلبة المستخلصة في الميثانول.

المواد الكيميائية:

تم في هذا الجزء استعمال المواد الكيميائية التالية:

- ماء مكرر التقطر.
- الميثانول (CH-OH) ذو نقاوة (99%) إنتاج (BIOCHEM CHEMOPHARMA).
- كلوريد البوتاسيوم (KCl) ذات نقاوة (99.8%) إنتاج (BIOCHEM CHEMOPHARMA).
- حمض الفسفوريك (H_3PO_4) ذو تركيز (85%) إنتاج (RIEDEL DE HAEN CHEN).
- هيدروكسيد الصوديوم (NaOH) إنتاج (RIEDEL DE HAEN CHEN).
- فوسفات الصوديوم ($Na_2HPO_4.12H_2O$) ذو نقاوة (99%) إنتاج (MERCK).
- فوسفات البوتاسيوم (KH_2PO_4) ذو نقاوة (99.5%) إنتاج (BIOCHEM CHEMOPHARMA)
- حمض الأسكوربيك ($C_6H_6O_6$) ذو نقاوة (99.7%) إنتاج (MERCK).
- حمض الغاليك ($(OH)_3C_6H_2COOH,H_2O$) ذو نقاوة (99%) إنتاج (PROLABO).

الأجهزة المستخدمة:

- الميزان التحليلي نوع (FA2004) بدقة (0.1mg) صنع (Shanghai Sunrise Instrument). جهاز مكروبيبات(FORTUNA) انتاج (TRANFERPETT).

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).

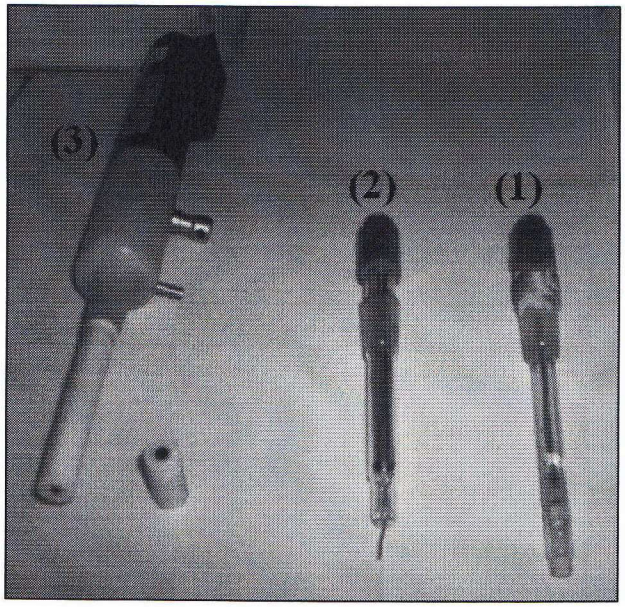
رفق بخلية كهروكيميائية مصنوعة من الزجاج (انظر الشكل **(13.III)**) .

مرفق بثلاث مساري (انظر الشكل **(14.III)**) .

الشكل (13.III): الخلية الكهروكيميائية

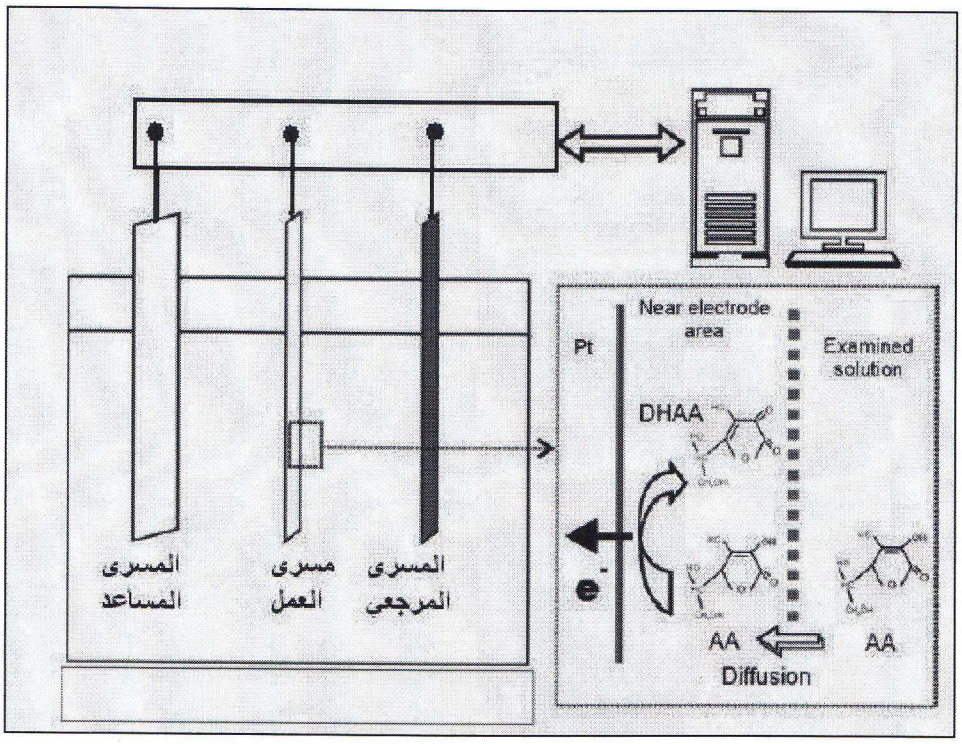
المساري:

- **المسرى المرجعي:** هو إلكترود الكالومال المشبع بكلوريد البوتاسيوم (ECS) صنع (Radiometer Analytical SAS).
- **المسرى المساعد:** له وظيفة وحيدة وهي إغلاق الدارة، وهو عبارة عن سلك من البلاتين قطره 0.5 سم، صنع (Radiometer Analytical SAS).
- **مسرى العمل:** هو الإلكترود الذي تتم عليه تفاعلات الأكسدة والإرجاع ، 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).



الشكل (14.III): المساري على الترتيب (1) المسرى المرجعي(2) المسرى المساعد (3) مسرى العمل

و تم استخدام التركيب التجريبي الموضح في الشكل (15.III)



الشكل (15.III): التركيب التجريبي للأجهزة المستعملة في الفولطأمبيرومتري الحلقي

III.2.2.تقدير الفاعلية المضادة للأكسدة بأخذ حمض الأسكروبيك كمركب قياسي:

III.2.2.1.الدراسة الكهروكيميائية لحمض الأسكروبيك:

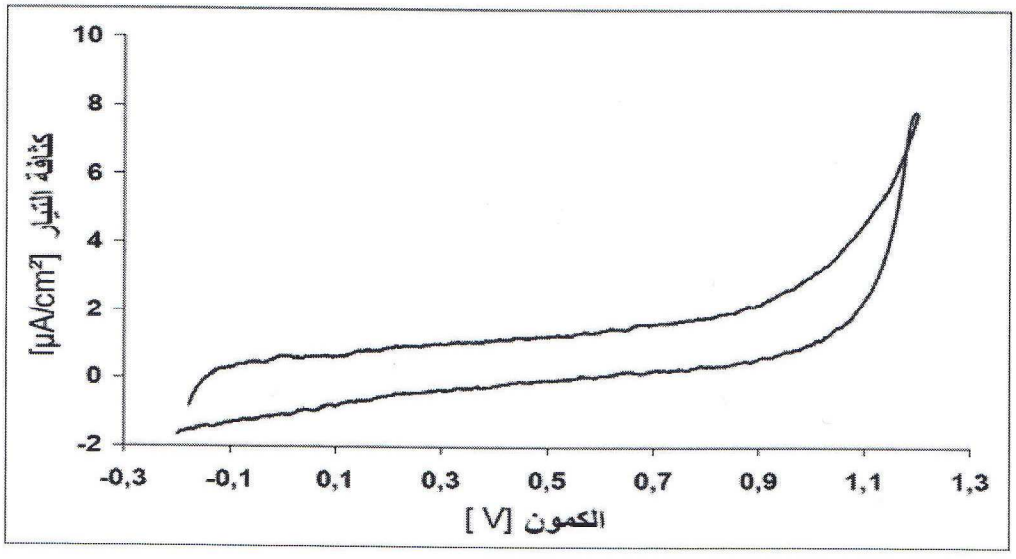
تحضير المواد وطريقة العمل:

نقوم بتحضر (40 mM) من حمض الأسكروبيك، محلول موقي (pH = 7). ، نحضر الخلية الكهروكيميائية التي تحتوي في البداية على المحلول الموقي (pH = 7) و الكهروليت المساعد.

الكهروليت 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 كهروليتية، 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 محايدا كيميائيا عند درجة حرارة ثابتة.
- مجال الكهروفعالية للكهروليت المساعد يجب أن يكون واسعا قدر الإمكان.

قبل مباشرة الدراسة، قمنا بتحديد مجال الكهروفعالية للكهروليت المساعد مع المذيب على مسري الكربون الزجاجي، حيث حدد المجال من (200- إلى 1200 mV/ECS) في الجهة المصعدية، سرعة مسح تساوي 100 mV/s كما هو موضح في الشكل **(1.III)**:

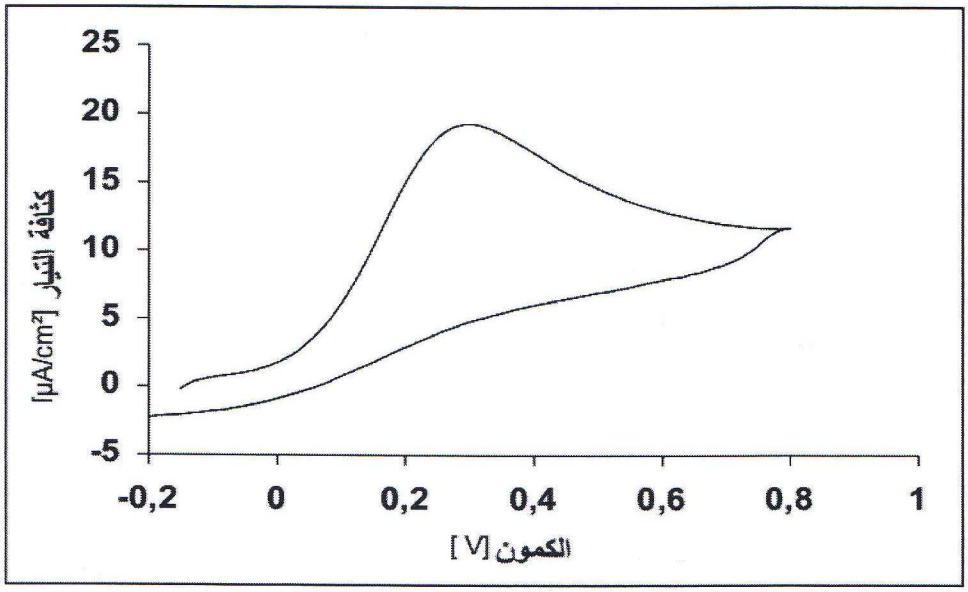


المنحنى (1.III): المنحنى الفولطأمبيرومتري الحلقي للكهروليت

نبدأ برسم المنحنيات الفولطأمبيرومترية الحلقية الخاصة بحمض الأسكوربيك، حيث يتم الرسم وفق تراكيز متدرجة و بالشروط التالية:

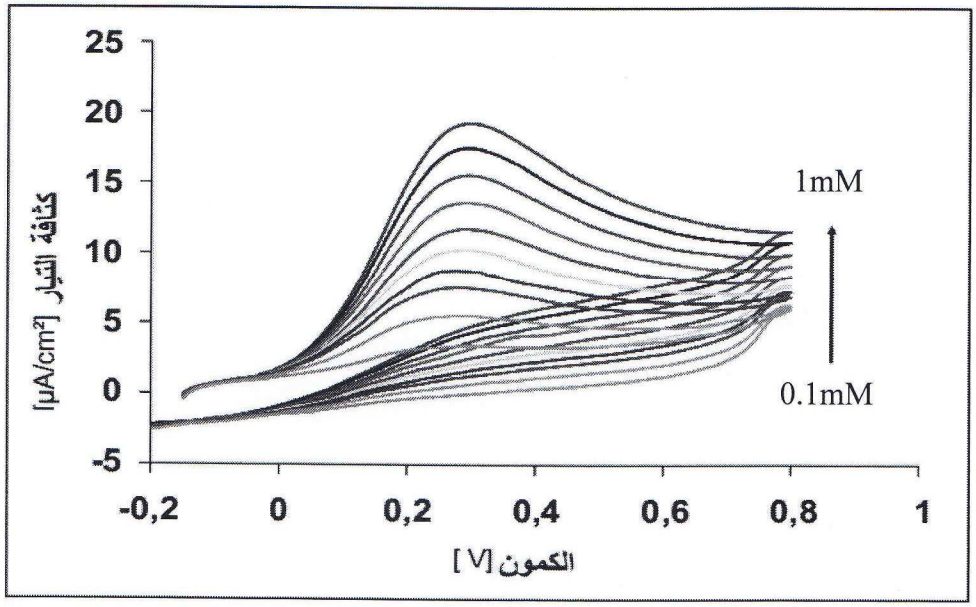
- الكمون (E) من (-200 الى 800 mV)
- سرعة المسح 100 mV/s.

تم الحصول على المنحنيات التالية:



المنحنى (2.III): المنحنى الفولطأمبيرومتري الحلقي لـ (1 mM) لـ (AA)

نلاحظ في المنحنى **(2.III)** أن لدى حمض الأسكوربيك نتوء مصعدي واحد و لا وجود لنتوء مهبطي و يدل هذا على أن أكسدة حمض الأسكوربيك في هذه الشروط هي تفاعل غير عكوس و نستطيع من هذا المنحنى أن نعرف ($E_{p/2}$= 0,26V) و هو يتطابق مع ما وجد في الدراسات السابقة[30] [41].



المنحنى (3.III): المنحنيات الفولطاأمبيرومترية الحلقية للتراكيز (1 -0.1 mM) لـ (AA)

نلاحظ في المنحنى **(3.III)** إن الزيادة المنتظمة لتركيز حمض الأسكروبيك في الخلية يعطي منحنيات فولطاأمبيرومترية ذات مساحات و كثافة تيار كهربائي متزايدة بانتظام و هذا ما يدل على صحة الخطوات العملية المنجزة، إذا أن أي عدم انتظام في هذه المنحنيات يدل على خلل في الخطوات المنجزة سواء على مستوى التجهيزات أو على مستوى المستخدم، و أهم خلل قد يقع فيه المستخدم لهذه التقنية هو نظافة سطح قطب العمل، فالملاحظ هنا أن تفاعل الأكسدة غير عكوس و بالتالي يجب بعد كل عملية قياس تنظيف سطح القطب جيدا.

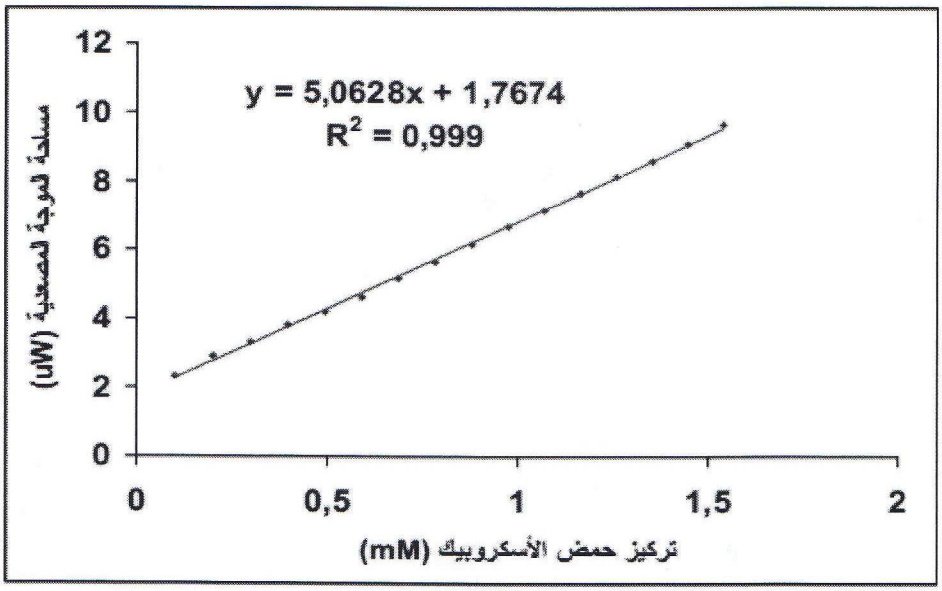
III.2.2.2.رسم المنحنى القياسي:

بعد رسم المنحنيات الفولطاأمبيرومترية الحلقية للتراكيز، نقوم بحساب مساحة الموجة المصعدية لكل منحني حتى نحصل على منحنى قياسي لحمض الأسكروبيك يمثل مساحة الموجة المصعدية بدلالة التركيز Sa = F(C).

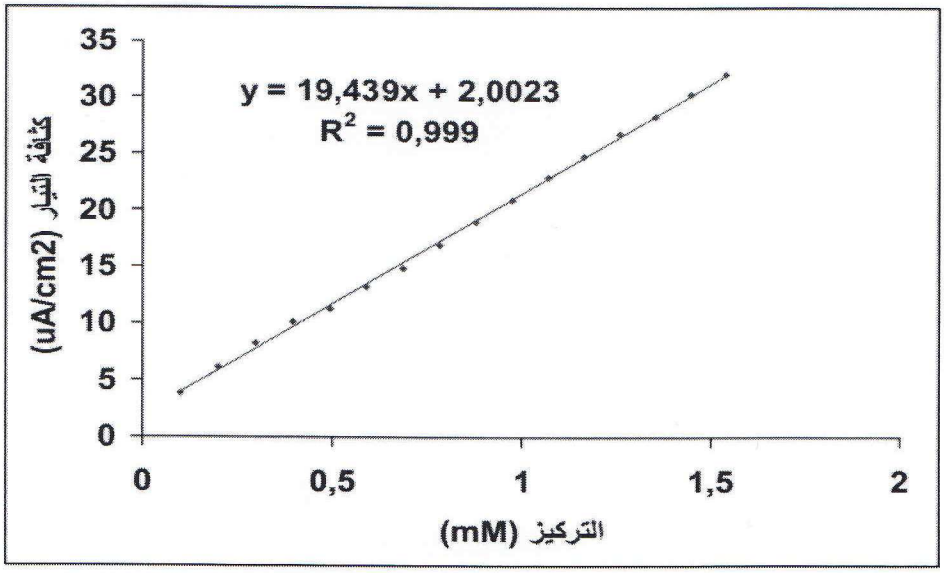
C: تركيز حمض الأسكروبيك(mM).

Sa: مساحة الموجة المصعدية(uW).

كما يمكننا أيضا رسم المنحنى القياسي لحمض الأسكروبيك و ذلك بأخذ كثافة التيار المصعدي بدلالة التركيز Ia = F(C).



المنحنى (4.III): المنحنى القياسي لـ (AA) Sa = F(C)

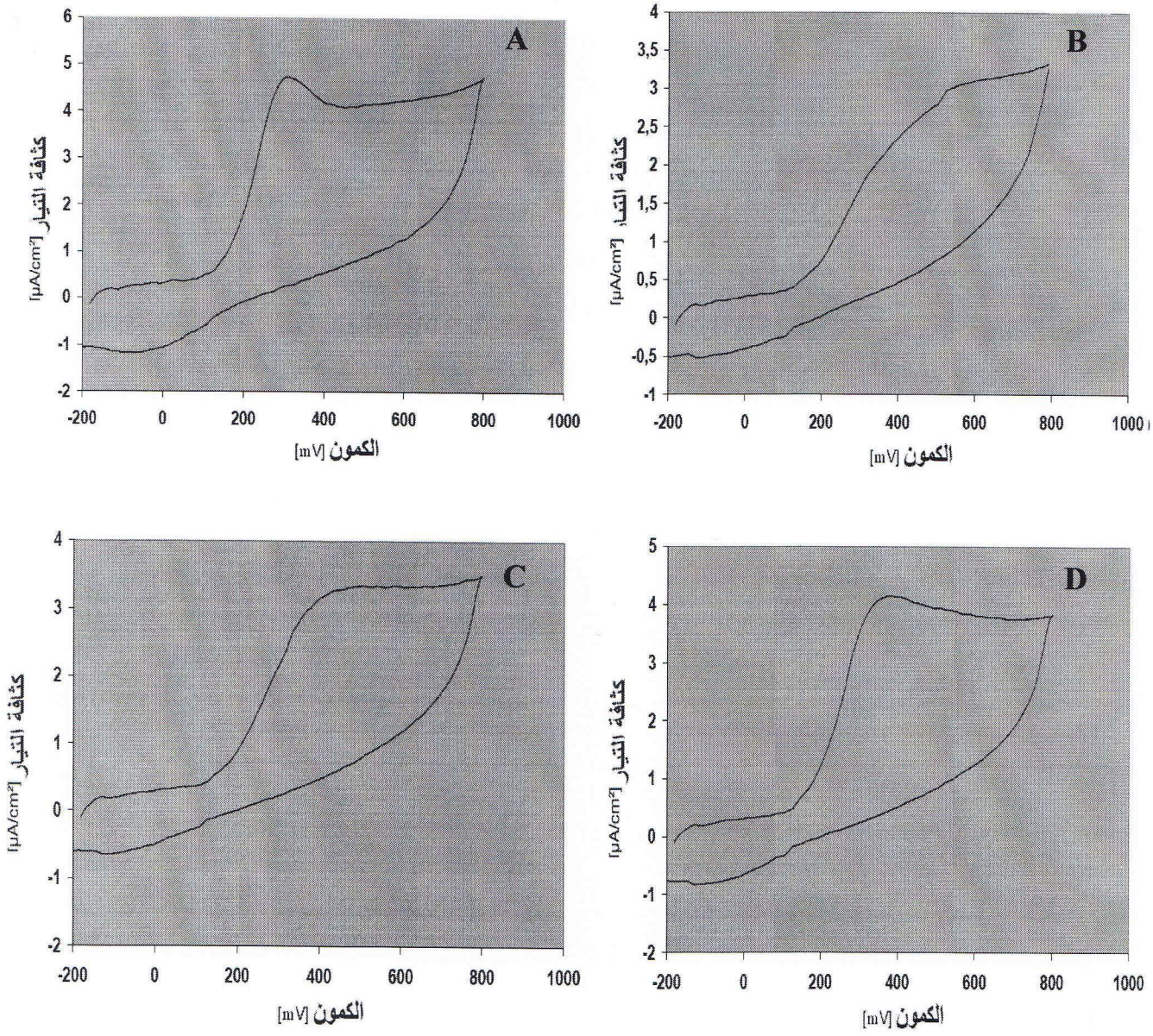


المنحنى (5.III): المنحنى القياسي لـ (AA) Ia = F(C)

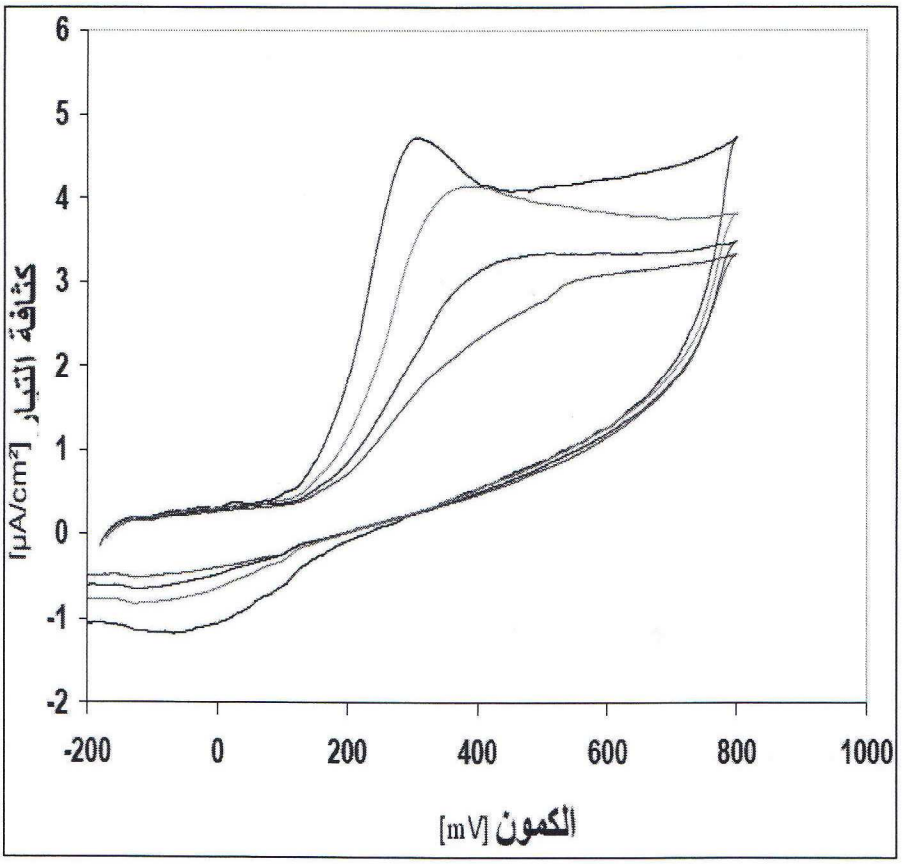
نلاحظ أن المنحنيات القياسية **(4.III)** و **(5.III)** لحمض الأسكروبيك جاءت دقيقة بحيث بلغ (R^2=0,999) و هو ما يجعل هذه التقنية دقيقة من حيث النتائج المستخرجة من هذه المنحنيات.

III.3.2.2.رسم المنحنيات الفولطاأمبيرومترية الحلقية للعينات:

بنفس الطريقة و تحت نفس الشروط السابقة التي تعاملنا بها مع حمض الأسكروبيك نعامل مستخلصات البروبوليس لمختلف المناطق و نرسم المنحنيات الفولطاأمبيرومترية الحلقية بحيث نضع كمية محددة من المستخلص.



المنحنى (6.III): المنحنيات الفولطاأمبيرومترية الحلقية لمستخلصات البروبوليس



المنحنى (7.III): مقارنة المنحنيات الفولطأمبيرومترية الحلقية لمستخلصات البروبوليس

A— خنشلة B — الوادي C— غرداية D— اليابان

من الواضح في المنحنيات (6.III) و (7.III) أن لكل مستخلص من مستخلصات البروبوليس خصائصه الكهروكيميائية و هذا ما يسهل علينا مقارنة هذه الخصائص و ربطها بموضوع الدراسة حيث يظهر جليا أن الفارق في مساحة الموجة المصعدية يعكس الفارق في القدرة الإرجاعية و يمكننا مبدئيا من ترتيب المستخلصات وفق القوة الإرجاعية حسب فرضية (R.kohen) إذ يأتي بروبوليس خنشلة أولا يليه اليابان ثم غرداية و الوادي و هي نتائج معقولة تطابق نتائج الفصل الثاني.

الجدول (2.III): جدول للكمونات النصفية ($E_{p/2}$) البروبوليس حسب المناطق

	المستخلص	$E_{p/2}$ (V)
A	خنشلة	**0,23**
B	الوادي	0,44
C	غرداية	0,38
D	اليابان	0,31

الجدول (2.III) يحتوي على قيم الكمونات النصفية $E_{p/2}$ المستخلصة من المنحنيات **(6.III)** هذه الكمونات تعكس أيضا القدرة الإرجاعية للمستخلصات حسب دراسات (P.A. Kilmartin) [25] الذي وضع طريقته في تقدير الفعالية المضادة للأكسدة انطلاقا من أن المادة التي لها كمون نصفي اقل هي ذات قدرة أرجاعية اكبر.

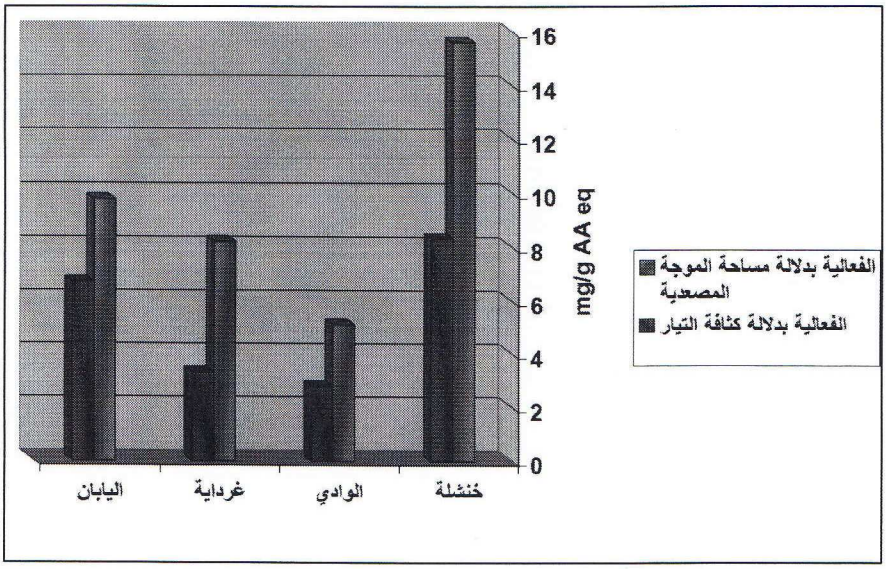
اذا وفق طريقة (P.A. Kilmartin) يمكننا ترتيب مستخلصات البروبوليس ابتداءا ممن يملك كمون نصفي اقل يعني قدرة ارجاعية اكبر و هو بروبوليس خنشلة (0,23V) ثم اليابان (0,31V) بعدهم تأتي غرداية (0,38V) و الوادي (0,44V).

الجدول (3.III): جدول لنتائج تقدير الفعالية المضادة للأكسدة بأخذ المنحني القياسي لحمض الأسكروبيك بدلالة مساحة الموجة المصعدية.

المستخلصات	المناطق	الفعالية المضادة للأكسدة المكافئة بـ(AA) (mg/g)
A	خنشلة	**15,616**
B	الوادي	5,125
C	غرداية	8,207
D	اليابان	9,766

الجدول (4.III): جدول لنتائج تقدير الفعالية المضادة للأكسدة بأخذ المنحني القياسي لحمض الأسكروبيك بدلالة كثافة التيار.

المستخلصات	المناطق	الفعالية المضادة للأكسدة المكافئة بـ(AA) (mg/g)
A	خنشلة	**8,3283**
B	الوادي	2,7733
C	غرداية	3,2922
D	اليابان	6,7027



المنحنى (8.III):مقارنة نتائج الفعالية المضادة للأكسدة بالطريقة الفولطاأمبيرومترية الحلقية لـ (AA)

4.2.2.III.مناقشة النتائج:

من خلال النتائج المدونة في الجدولين **(3.III)** و **(4.III)** أعلاه و الممثلة بالمنحنى **(8.III)** يمكن أن نستنتج مايلي:

إن الفعالية المضادة للأكسدة لبروبوليس خنشلة هي مرتفعة نسبيا بالمقارنة بباقي العينات فقد بلغت (15,616 mg/g) بينما كانت قيم فعالية بروبوليس اليابان و غرداية متقاربة حيث لم يتجاوزا (9,766 mg/g) و (8,207 mg/g) على الترتيب، اما بروبوليس الوادي فقد كانت فعاليته ضعيفة نسبيا اذا لم تتجاوز ثلث فعالية بروبوليس خنشلة بـ(5,125 mg/g). أما عند اخذ الفعالية بدلالة المنحنى القياسي لكثافة التيار فان الترتيب يبقى كما هو علية ما عد القيم التي جاءت في معظمها تقارب أنصاف قيم النتائج المتحصل عليها من المنحنى القياسي الأول بدلالة مساحة الموجة المصعدية، حيث بلغت فعالية بروبوليس خنشلة (8,3283 mg/g) كأكبر قيمة و لم تتجاوز فعالية بروبوليس الوادي (2,7733mg/g) كأقل قيمة.

نستطيع هنا الحكم على اقرب القيم للفعالية الحقيقية للمستخلصات حتى و لو لم يتم دراسة هذه المستخلصات بواسطة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الاداء (HPLC) حسب ما قام به (S.Chevion) و (R.kohen) في بداية أبحاثهم و وجدا إن اقرب القيم هي تلك التي اخذ فيها المنحني القياسي المرسوم بدلالة مساحة الموجة المصعدية و قد أصبحت هذه قاعدة متبعة من طرف الباحثين و ذلك بالاعتماد مباشرة على مساحة الموجة المصعدية.

رغم الفروق في الفعالية المضادة للأكسدة لمستخلصات البروبوليس إلا إن النتائج المتحصل عليها تظهر جليا أنها قيم معتبرة.

III.3.2.تقدير الفاعلية المضادة للأكسدة بأخذ حمض الغاليك كمركب قياسي:

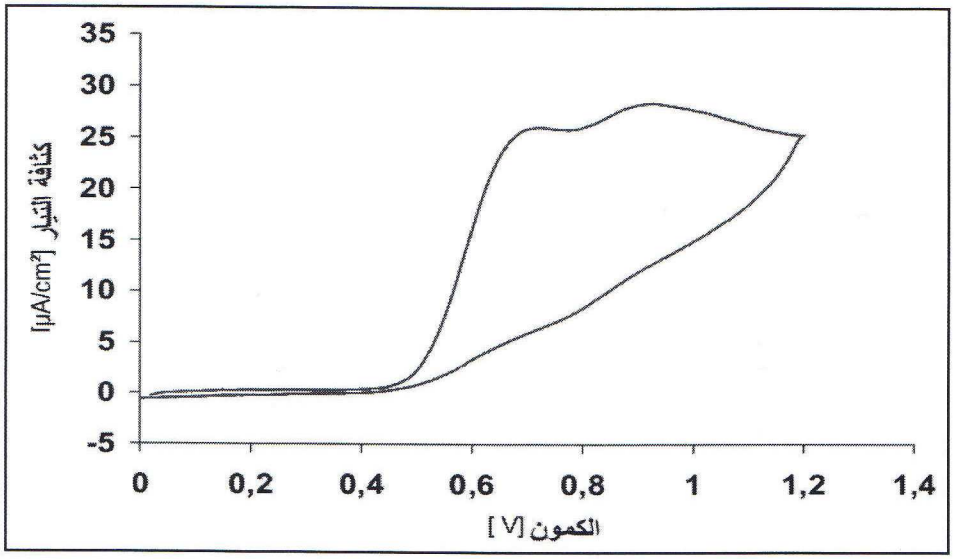
III.3.2.1. الدراسة الكهروكيميائية لحمض الغاليك:

تحضير المواد وطريقة العمل: نقوم بتحضير (40 mM) من حمض الغاليك، محلول مـــــــوقي (pH = 2). نحضر الخلية الكهروكيميائية التي تحتوي في البداية على المحلول الموقي و الكهروليت المساعد(KCl) تركيز 0.1M.

نبدأ برسم المنحنيات الفولطاأمبيرومترية الحلقية الخاصة بحمض الغاليك، حيث يتم الرسم وفق تراكيز متدرجة و بالشروط التالية:

- الكمون (E) من (0 الى 1200 mV)
- سرعة المسح 100 mV/s.

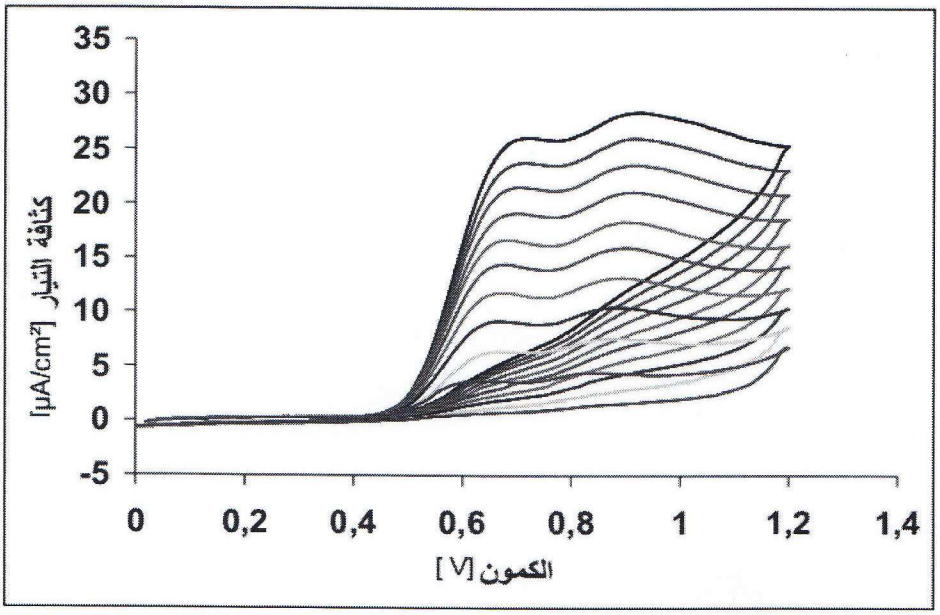
تم الحصول على المنحنى التالي لـ(1 mM)من (GA):



المنحنى (III.9): المنحنى الفولطاأمبيرومتري الحلقي لـ (1 mM) لـ (GA)

نلاحظ في المنحنى **(9.III)** ان لدى حمض الغاليك نتوءان مصعديان و لا وجود لنتوء مهبطي و يدل هذا على أن أكسدة حمض الغاليك في هذه الشروط هي تفاعل غير عكوس و نستطيع من هذا المنحنى أن نعرف (E(I)p/2= 0,85V) و (E(II)p/2= 0,58V) و هو يتطابق مع ما وجد في الدراسات السابقة [48].

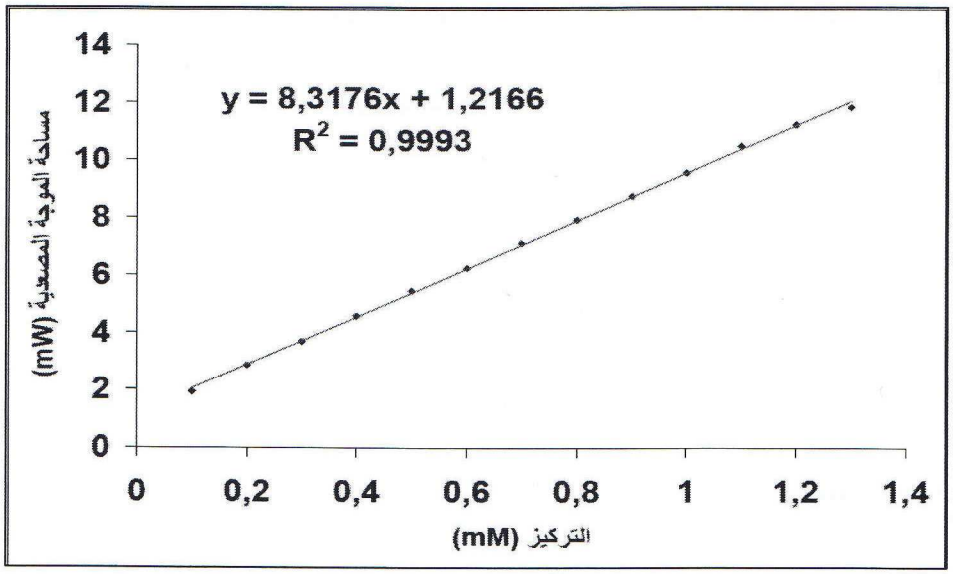
تم الحصول على المنحنيات التالية لتراكيز (1 -0.1 mM) من (GA):



المنحنى (10.III): المنحنى الفولطاأمبيرومتري الحلقي لتراكيز (1 -0.1 mM) لـ (GA)

2.3.2.III.رسم المنحنى القياسي:

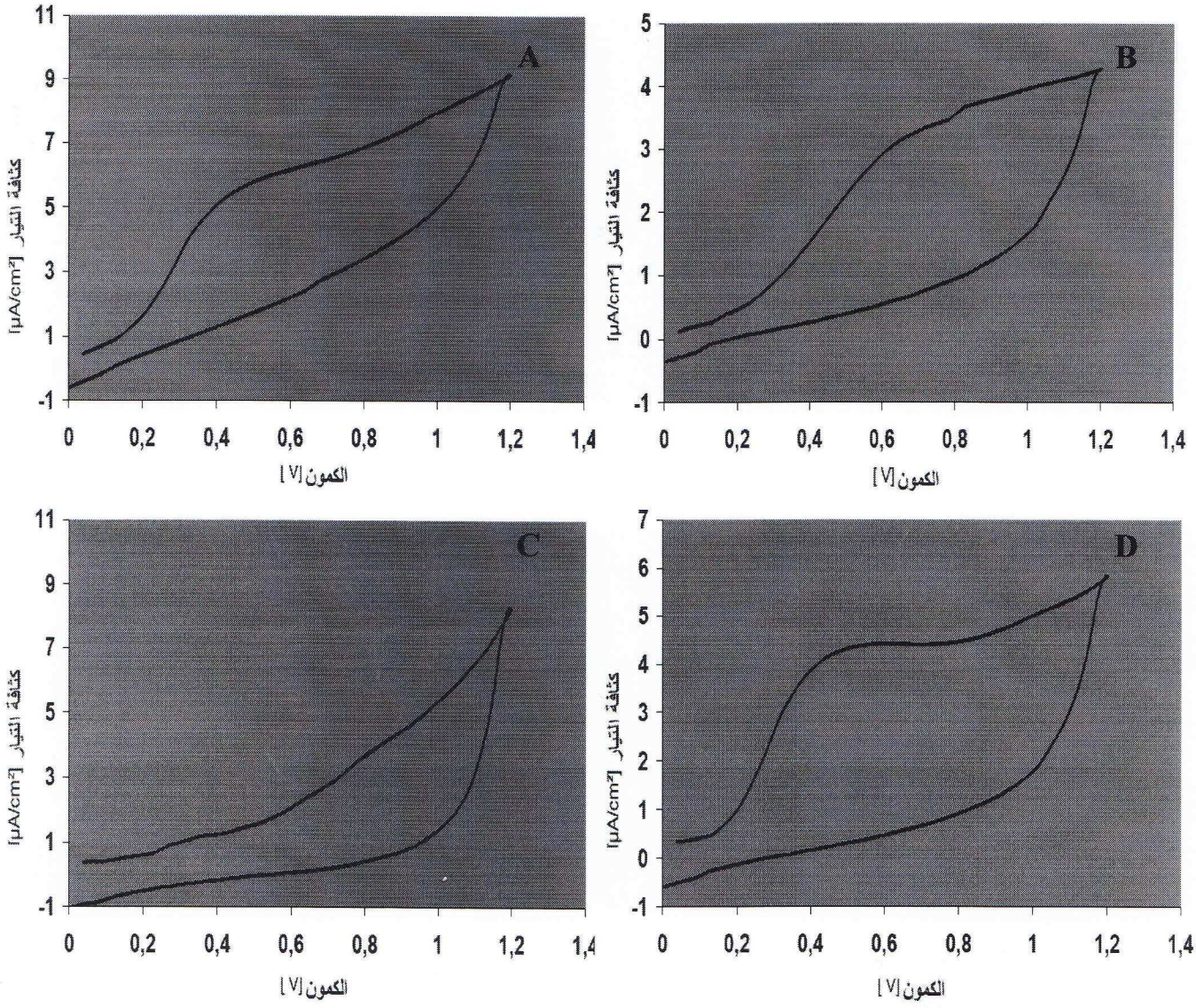
بعد رسم المنحنيات الفولطاأمبيرومترية الحلقية لتراكيز متدرجة و مختلفة، نقوم بحساب مساحة الموجة المصعدية لكل منحني حتى نحصل على منحنى قياسي لحمض الغاليك يمثل المساحة المصعدية بدلالة التركيز Sa = F(C).



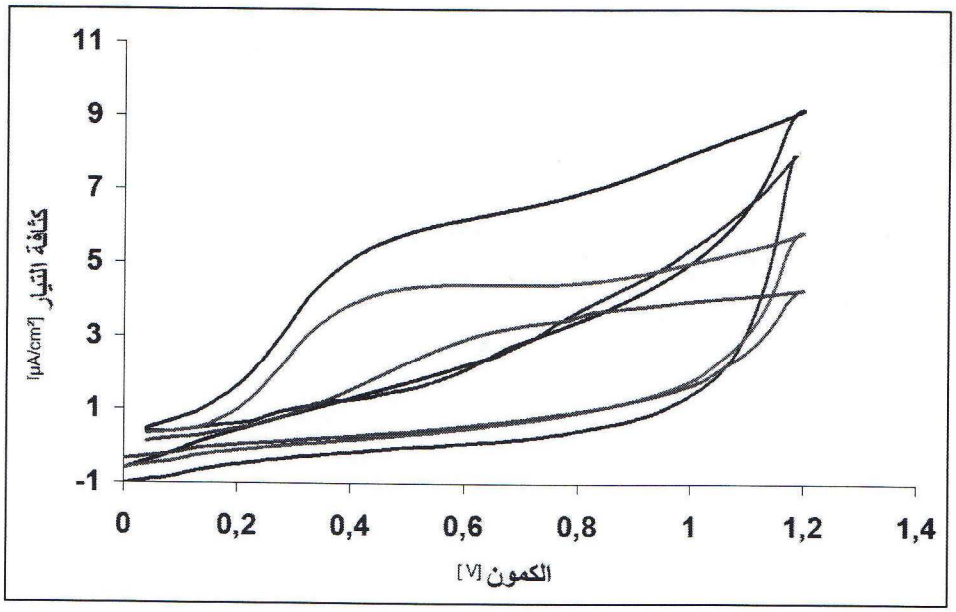
المنحنى (11.III):المنحنى القياسي لـ (GA) Sa = F(C)

3.3.2.III.رسم المنحنيات الفولطاأمبيرومترية الحلقية للعينات:

بنفس الطريقة و تحت نفس الشروط السابقة التي تعاملنا بها مع حمض الغاليك نعامل مستخلصات البروبوليس لمختلف المناطق و نرسم المنحنيات الفولطاأمبيرومترية الحلقية بحيث نضع كمية محددة من المستخلص، انظر المنحنيات **(12.III)** و **(13.III)**.



المنحنى (12.III): المنحنيات الفولطأمبيرومترية الحلقية لمستخلصات البروبوليس



المنحنى (13.III): مقارنة المنحنيات الفولطأمبيرومترية الحلقية لمستخلصات البروبوليس

Aـــ خنشلة **B**ـــ الوادي **C**ـــ غرداية **D**ـــ اليابان

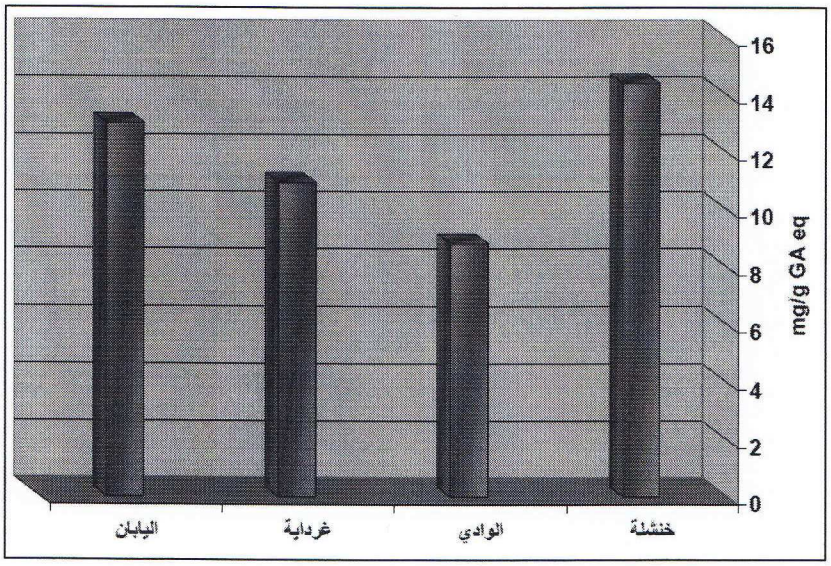
الجدول (5.III): جدول للكمونات المصعدية لمستخلصات البروبوليس حسب المناطق

	المستخلص	E(I)p/2 (V)	E(II)p/2 (V)
A	خنشلة	0,39	--
B	الوادي	0,58	--
C	غرداية	0,31	0,82
D	اليابان	0,4	--

وفق طريقة (P.A. Kilmartin) [25] يمكننا ترتيب مستخلصات البروبوليس ابتداءا ممن يملك كمون نصفي اقل يعني قدرة أرجاعية اكبر و هو بروبوليس خنشلة(0,39V) ثم اليابان(0,4V) بعدهم تأتي الوادي (0,58V). أما غرداية فقد كان لها نتوءان مصعديان و بالتالي كمونان نصفيان الأول (0,31V) و الثاني (0,82V).

الجدول (6.III): جدول لنتائج تقدير الفعالية المضادة للأكسدة بأخذ المنحني القياسي لحمض الغاليك بدلالة مساحة الموجة المصعدية

المستخلصات	المناطق	الفعالية المضادة للأكسدة المكافئة بـ(GA) (mg/g)
A	خنشلة	**14,4019**
B	الوادي	8,8205
C	غرداية	10,9530
D	اليابان	13,0117



المنحنى (14.III):مقارنة نتائج الفعالية المضادة للأكسدة بالطريقة الفولطاأمبيرومترية فى حالة (GA)

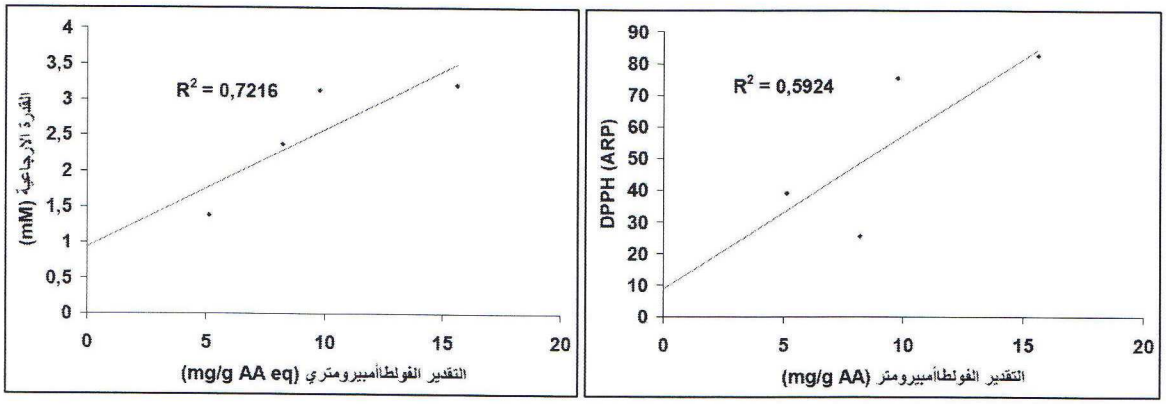
4.3.2.III.مناقشة النتائج:

من الواضح في الجدول **(4.III)** و المنحنى **(14.III)** إن الفعالية المضادة للأكسدة لمستخلصات البروبوليس في هذا الجزء جاءت متقاربة فقد بلغت قيمتها القصوى (14,4019 mg/g) من اجل مستخلص خنشلة بينما كانت (13,0117 mg/g) لليابان، و لم تتجاوز قيم غرداية و الوادي (10,9530 mg/g) و (8,8205 mg/g) على التوالي.

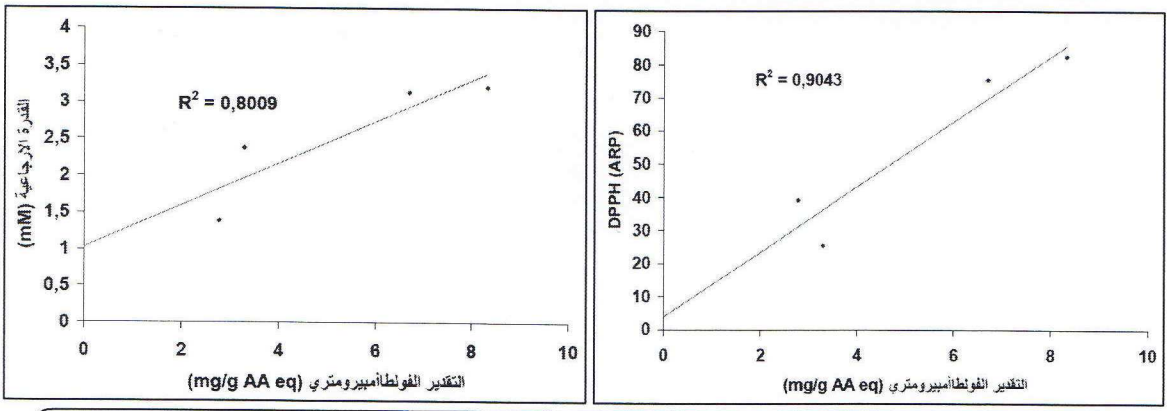
أن السبب في اختلاف النتائج المتحصل عليها بـ (AA) و (GA) هو الاختلاف في الوسط والشروط التي وضع فيها كل من المركبين، مثل الحموضة و مجال المسح.

4.2.III.مقارنة النتائج:

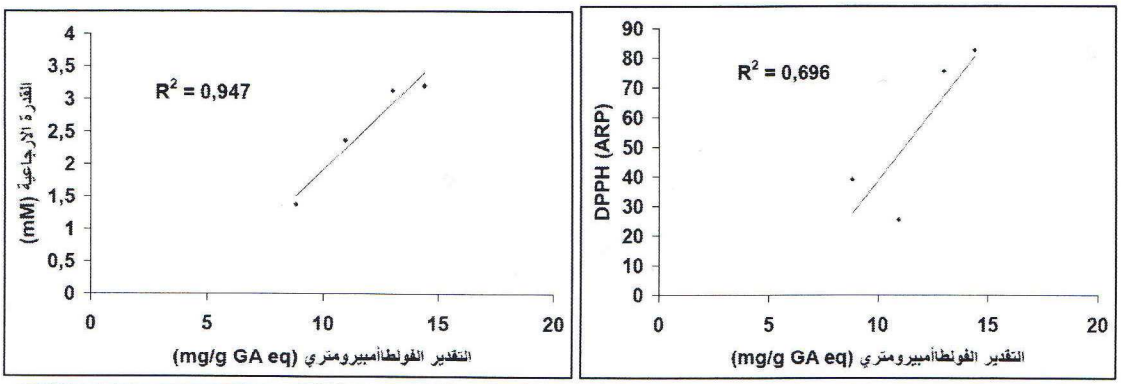
من اجل الخروج بنتائج مقنعة من حيث اعتماد الطريقة الفولطاأمبيرومترية الحلقية (CV) كطريقة لتقييم الفعالية المضادة للأكسدة تمت مقارنة النتائج المتحصل عليها في الفصل الثاني و التي تمثل نتائج الطرق الطيفية بنتائج هذا الفصل و التي هي نتائج الطريقة الفولطاأمبيرومترية الحلقية و ذلك بناءا على مدى الترابط بين هاته النتائج.



المنحنى (15.III): يوضح علاقة الارتباط بين نتائج اختبار التقدير الفولطاأمبيرومتري الحلقي(CV) و اختباري DPPH و (RP) للمستخلصات في حالة الاعتماد على مساحة الموجة المصعدية لـ(AA)



المنحنى (16.III): يوضح علاقة الارتباط بين نتائج اختبار التقدير الفولطاأمبيرومتري الحلقي(CV) و اختباري DPPH و (RP) للمستخلصات في حالة الاعتماد على كثافة التيار المصعدي لـ(AA)



المنحنى (17.III): يوضح علاقة الارتباط بين نتائج اختبار التقدير الفولطاأمبيرومتري الحلقي(CV) و اختباري DPPH و (RP) للمستخلصات في حالة الاعتماد على مساحة الموجة المصعدية لـ(GA)

يظهر جليا في المنحنيات أعلاه إن هناك علاقة ترابط قوية بين الطريقة الفولطاأمبيرومترية الحلقية (CV) و الطرق الطيفية المتمثلة في اختباري (DPPH) و القدرة الإرجاعية (RP) حيث أن:

اكبر ترابط وجد بين الطريقة الفولطاأمبيرومتري الحلقية (CV) و اختبار القدرة الإرجاعية (RP) في حالة اخذ حمض الغاليك كأساس مرجعي (R^2=0,947)، اما علاقة الترابط بين الطريقة الفولطاأمبيرومتري الحلقية (CV) و اختبار (DPPH) فقد كانت اكبر ما يمكن في حالة الاعتماد على المنحنى القياسي لـ(AA) بدلالة كثافة التيار حيث بلغ (R^2=0,904)، و اقل علاقة ترابط كانت بين الطريقة الفولطاأمبيرومتري (CV) و اختبار (DPPH) في حالة المنحنى القياسي لـ(AA) بدلالة مساحة الموجة المصعدية حيث لم يتجاوز (R^2=0,592).

من خلال هذه النتائج نستطيع إن نقول إن هناك علاقة ترابط قوية بين الطرق الكهروكيميائية و الطرق الطيفية خاصة اختبار القدرة الإرجاعية (RP) و هذا ما يشجع على التوجه نحو هذه الطريقة كطريقة تعطي نتائج سريعة و اقل تكلفة، و مبدئيا يمكننا الحكم بأن أدق طريقة هي الطريقة الفولطاأمبيرومترية الحلقية (CV) و هذا يبقى محصور على مستوى هذه الدراسة إلى أن يتم إجراء دراسات أخرى تساهم في تطوير و تأكيد النتائج المتحصل عليها.

المراجـــع

1.L.M. Magalhaes, M.A. Segundo, S. Reis, J.L.F.C. Lima. *Anal. Chim. Acta*. 613 (2008) 1–19.

2.M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M.T.D. Cronin, M. Mazur, J. Telser, *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 39 (2007) 44.

3.E.N. Frankel, J.B. German, *J. Sci. Food Agric*. 86 (2006) 1999.

4.E.N. Frankel, *Food Chem*. 57 (1996) 51.

5.E.I. Korotkova, Y.A. Karbainov, A.V. Shevchuk. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 518 (2002) 56–60

6.J. Psotová, J. Zahálková, J. Hrbáč, V. Šimánek, J. Bartek. *Biomed. Papers* 145(2), 81–83 (2001),

7. T. Grune, P. Schröder, H.K. Biesalski: Low-molecular weight antioxidants. In: Oxidants and Antioxidant Defense Systems. Handbook of environmental chemistry. Vol. 2. Reactions and Processes. T. Grune (Ed.). – Berlin, Heidelberg: Springer 2005, pp. 77-90.

8.A.Ya.Yashin, N.I.Chernousova. Amperometric method and the device for express determination of the antioxidant activity of medicine, food, drinks and biological liquids, *American Journal of Enology and Viticulture* 6(2007)22-23.

9. K.Z.Brainina, N.A.Malakhova, N.Y. Stojko. Fresenius J Anal Chem. 2000 Oct;368(4):307-25.

10.L.K. Shpigun, M.A. Arharova, Kh.Z. Brainina, A.V. Ivanova, Analytica Chimica Acta 573–574 (2006) 419–426.

11.Kh.Z. Brainina, A.V. Ivanova, E.N. Sharafutdinova, E.L. Lozovskaya, E.I. Shkarina, Talanta 71 (2007) 13–18.

12.Kh.Z. Brainina, A.V. Ivanova, E.N. Sharafutdinova, S.Yu. Saraeva. Procedure 40 Potentiometric determination of antioxidant activity of food and herbal extracts *Comprehensive Analytical Chemistry*, Vol 49, 2007, pp 277-283

13.Kh. Z. Brainina, A.V. Ivanova, Mean of solutions oxidant/antioxidant activity determination, Patent of RF No. 2235998 (Priority date14/11/2002).

14.G.K.Ziyatdinova, H.C.Budnikov, V.I.Pogorel'tzev. *Anal Bioanal Chem*. 381(8): (2005)1546-51.

15.G.K.Ziyatdinova, H.C.Budnikov, V.I.Pogorel'tzev, T.S.Ganeev. *Talanta*. 15;68(3) (2006)800-805.

39. R.Nicholson et I.Schain , *Anal:chem*, (1964).

40. Allen. J.Bard. Larry . R. Faulkner, «electrochimie principe , methode et application ».ED Masson, (1983), 318-323.

41. W. R.Sousa; C.da Rocha; C. L.Cardoso; S. D. H.Silva; B. M. N.Zanoni, *J. Food Comp. Anal.* 17 (2004) 619.

42. S. Jovanovic, S. Steenken, Y. Hara, M. Simic, J. *Chem. Soc. Perkin* 2 (1996) 2497.

43. S. V.Jovanovic; S.Steenken; M.Tosic; B.Marjanovic; M.Simic, *J. Am. Chem. Soc.*, 116(1994)4846.

44. A. J.Blasco; M. C.González,; A.Escarpa, *Anal. Chim. Acta*, 511(2004)71.

45. H. Hotta; M.Ueda; S.Nagano; Y.Tsvjino; J. Koyama,. *Anal. Biochem.*, 303(2002)66.

46. S.K.Trabelsi; N.B.Tahar; R.Abdlhedi, *Electrochim. Acta*, 49(2004)1647.

47. A.Simić; D.Manojlović; D.Šegan; M. Todorović, *Molecules*, 12(2007)2327.

48.S. P:Gunckel. G.Santander, J.Cordano, S.Ferreira, L.J. Munoz, N.Vergara, *J.A. Squella,Chemico-Biological Interactions* 114 (1998) 45–59

49. O. Hammerich, B. Svensmark, Anodic oxidation of oxygen-containing compounds, in: H. Lund, M. Baizer (Eds.), Organic Electrochemistry, Marcel Dekker, New York, 1990, p. 615

50. C. Le Bourvellec, D.Hauchard, A.Darchen, J.L.Burgot, M.L.Abasq .*Talanta* 75 (2008) 1098–1103

51.D.T. Sawyer, Oxygen Chemistry, Oxford University Press, Oxford, 1991, p. 27.

52.M.E. Ortiz, L.J. Nunez-Vergara, J.A. Squella, *J. Electroanal.* Chem. 519 (2002) 46–52.

53.C.P. Andrieux, P. Hapiot, J.M. Sav´eant, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 3768–3775.

54.C.M. Collins, C. Sotiriou-Leventis, M.T. Canalas, N. Leventis, *Electrochim. Acta* 45 (2000) 2049–2059.

55. N. Cotelle, P. Hapiot, J. Pinson, C. Rolando, H. V´ezin, *J. Phys. Chem.* B 109 (2005) 23720–23729.

16.G.K.Ziyatdinova, A.V.Voloshin, A.Kh.Gilmutdinov, H.C.Budnikov, T.S.Ganeev. *J Pharm Biomed Anal*.40(4) (2006)958-63.

17.V.I. Pogorel'tzev, G.K. Ziyatdinova, H.C. Budnikov, Determination of total antioxidant capacity of Biological fluids, Patent of Russian Federation No. 2,253,114. براءة اختراع

18. E.I. Korotkova, Y.A. Karbainov, O.A. Avramchik, *Anal. Bioanal. Chem.* 375 (2003) 465.

19. S. Chevion, E.M. Berry, N. Kitrossky, R. Kohen, *Free Radic.Biol. Med.* 22 (1997) 411.

20. L. Barros, S. Falcão, P. Baptista, C. Freire, M. Vilas-Boas, I.C.F.R. Ferreira, *Food Chem.* 111 (2008) 61–66.

21. S: Chevion,., M. A: Roberts,M.Chevion,. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(6) (2000) 860–870.

22 E. Shohami, I. Gati, E. Beit-Yannai, V. Trembovler, R. Kohen,*J. Neurotrauma* 16 (1999) 365.

23. S. Chevion, M. Chevion, P.B. Chock, G.R. Beecher, *Journal of Medicinal Food*, 2 (1999) 1-11.

24. M.d.S.Raymundo, M.M.da Silva Paula, C. Franco, R.Fett, *LWT* 40 (2007) 1133–1139.

25.P.A. Kilmartin, C.F. Hsu, *Food Chemistry* 82(2003) 501–512

26. R. Kohen, E. Beit-Yannai, E.M. Berry, O. Tirosh, *Methods Enzymol.* 300 (1999) 285.

27.D. Sun-Waterhouse, B.G. Smith, C.J. O'Connor, L.D. Melton, *Food Chemistry* 111 (2008) 580–585

28.W.R. Sousa, C.d.Rocha, C.L. Cardoso, D.H. Silva, M.V. Zanoni, *Journal of Food Composition and Analysis* 17 (2004) 619–633

29. J. Chen, L. Gorton, B.Akesson. *Analytica Chimica Acta* 474 (2002) 137–146

30. P. A Kilmartin,., H.Zou, A. L.Waterhouse, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (2001a) 1957–1965.

31.Y.I. Tur'yan ,P.Gorenbein, R.Kohen. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 571 (2004) 183–188.

32.Joseph Wang, Analytical electrochemistry,2nd ED, A johen Wiley & Sons, INC, Publication, NEW YORK, (2001)1-100

34. B. TREMILLON,«électrochimie analytique et réaction en solution », tome 2, réaction et méthodes électrochimies , ED Masson, Paris, Million ,Barcelene, (1993)69-97, 132 -134.

35.J.E.B.Rindles; Trans Faraday; *Soc*,(1948).,44,349.

36. A.Sevick, *Chemi. Com. Soc*, (1948)13,349.

37. P.Delhay,*J.Am.Chem.Soc*,(1953),75,95.

38. H.Matsuda et Y.Z.Ayabe, *Elecctrochem*, (1964), 36, 706.

الخاتمــــة

الخاتمة

يعتبر هذا العمل لبنة أولى في إطار تثمين مادة البروبوليس ذات الأهمية الكبيرة في المجالات الصيدلانية و الغذائية، حيث يهتم هذا العمل بإجراء دراسة مقارنة على مستوين هما المحتوى الكمي للمواد الفعالة و التي تمثل هنا المركبات الفينولية و الفعالية المضادة للأكسدة و التي تمثل القدرة على تثبيط الجذور الحرة هذا من جهة، من جهة أخرى اهتمت هاته الدراسة أيضا بتجربة طريقة جديدة لتقدير الفعالية المضادة للأكسدة تعتمد على التقنية الفولطاأمبيرومترية الحلقية (CV).

كخطوة أولية في دراستنا قمنا باختيار أحسن طريقة لاستخلاص البروبوليس و تم ذلك بناءا على التجارب التي أجريت و التي استطعنا من خلالها الحصول على اكبر مردود للمركبات الفينولية إذ كانت كميتها 14,2332 mg/g بالنسبة إلى بروبوليس خنشلة، كما تم أيضا اختيار أحسن مذيب في عملية الاستخلاص و ذلك طبقا لنتائج المقارنة بين الإيثانول و الميثانول هذا الأخير الذي أعطى مردودا اكبر بكثير من سابقه حيث بلغ فيها الفرق الثلث.

بعد استخلاص البروبوليس بالطريقة المختارة تم تقدير كمية الفينولات حيث أن اكبر كمية سجلتها اليابان وصلت إلى 21.5495 mg/g كذا الفلافونويدات التي بلغت 4.7145 mg/g أما بقية المستخلصات و هما خنشلة و الوادي فكانت كميتهما متقاربة الى حد ما حيث كانت الكمية في بروبوليس خنشلة 14,2332 mg/g من الفينولات و 3.4599 mg/g من الفلافونويدات و الوادي 10.9879 mg/g من الفينولات و mg/g 2.1255 من الفلافونويدات، أما اقل نتيجة فسجلها بروبوليس غرداية حيث كانت 4.9349 mg/g للفينولات و 1.9493 mg/g من الفلافانويدات، يظهر جليا من خلال النتائج غنى مادة البروبوليس بالمركبات الفينولية، لكن رغم هذه النتائج المعتبرة إلا أن كمية الفينولات و الفلافونويدات في بروبوليس المنطقة الصحراوية مازال لم يصل إلى مستوى المناطق الأخرى سوءا على المستوى الوطني الذي تمثله في هذه الدراسة خنشلة أو على المستوى الدولي المتمثل في هذه الدراسة باليابان و يرجع هذا الفارق إلى ضعف الغطاء النباتي و كذا طبيعة المنطقة.

بعدها قمنا بدراسة الفعالية المضادة للأكسدة للمستخلصات الميثانولية وتم ذلك بواسطة ثلاث اختبارات هي اختبار (DPPH)، واختبار القدرة الإرجاعية (PR) و تقنية (CV) وتبين لنا أن جميع المستخلصات تملك فعالية معتبرة وخاصة مستخلص خنشلة و اليابان، حيث تم إجراء مقارنة النتائج المتحصل عليها بمركبات قياسية هي حمض الأسكوربيك (AA) و حمض الغاليك (GA).

تمت مقارنة نتائج الاختبارين (DPPH) و القدرة الإرجاعية (PR) بنتائج الطريقة (CV) و وجد إن هناك شبه تطابق في ترتيب المستخلصات حسب قوتهم الإرجاعية إذ احتل بروبوليس خنشلة الصدارة يليه اليابان ثم غرداية و الوادي، أما فيما يخص قيم (كمية) المواد المضادة للأكسدة (LMWA) فهناك اختلاف واضح يعكس خصائص كل طريقة إلا أننا وجدنا أن طريقة (CV) تعطي نتائج متقاربة من حيث القيم فقد استعملنا في

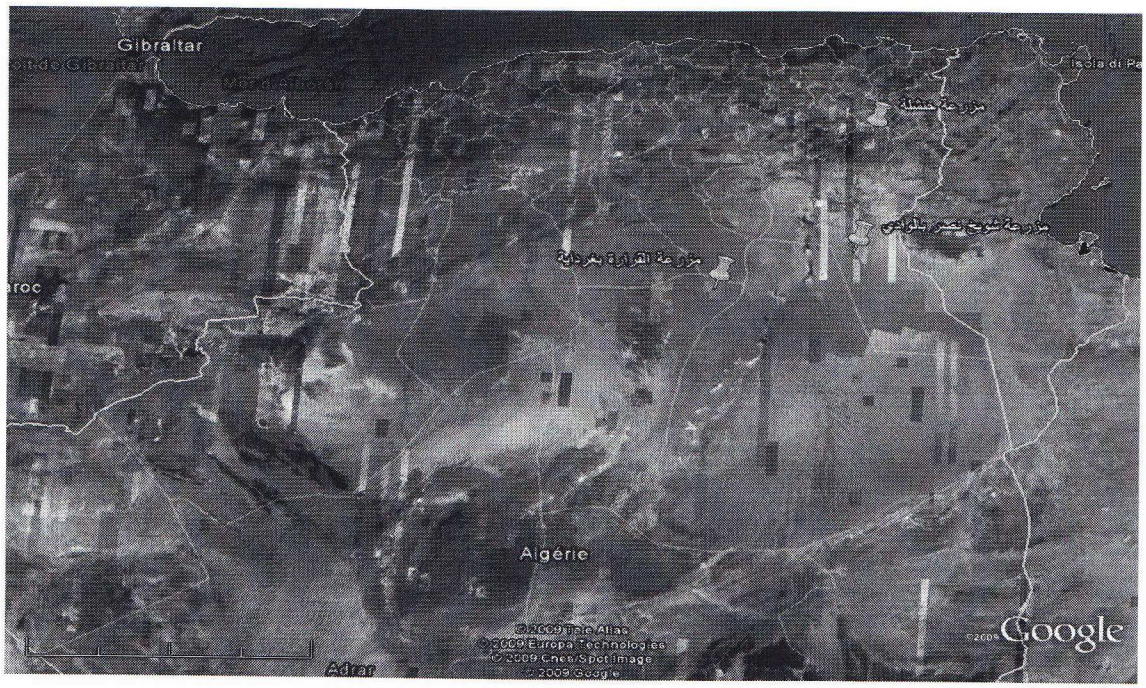
الملحق

هذه الطريقة مركبين قياسيين (AA) و (GA) و وسطين مختلفين معتدل (pH=7) و حمضي (pH=2) ، رغم هذا فقد جاءت النتائج متقاربة مما يعطي انطباع أن هذه الطريقة أكثر دقة، و من اجل الخروج بنتائج مقنعة من حيث اعتماد الطريقة (CV) كطريقة لتقييم الفعالية المضادة للأكسدة تمت المقارنة و ذلك بناءا على مدى الترابط بين هاته النتائج. حيث وجد إن اكبر ترابط بين الطريقة (CV) و اختبار القدرة الإرجاعية (PR) في حالة اخذ (GA) كأساس مرجعي (R^2=0,947)، أما علاقة الترابط بين الطريقة (CV) و اختبار (DPPH) فقد كانت اكبر ما يمكن في حالة الاعتماد على المنحنى القياسي لـ(AA) بدلالة كثافة التيار حيث بلغ (R^2=0,904).

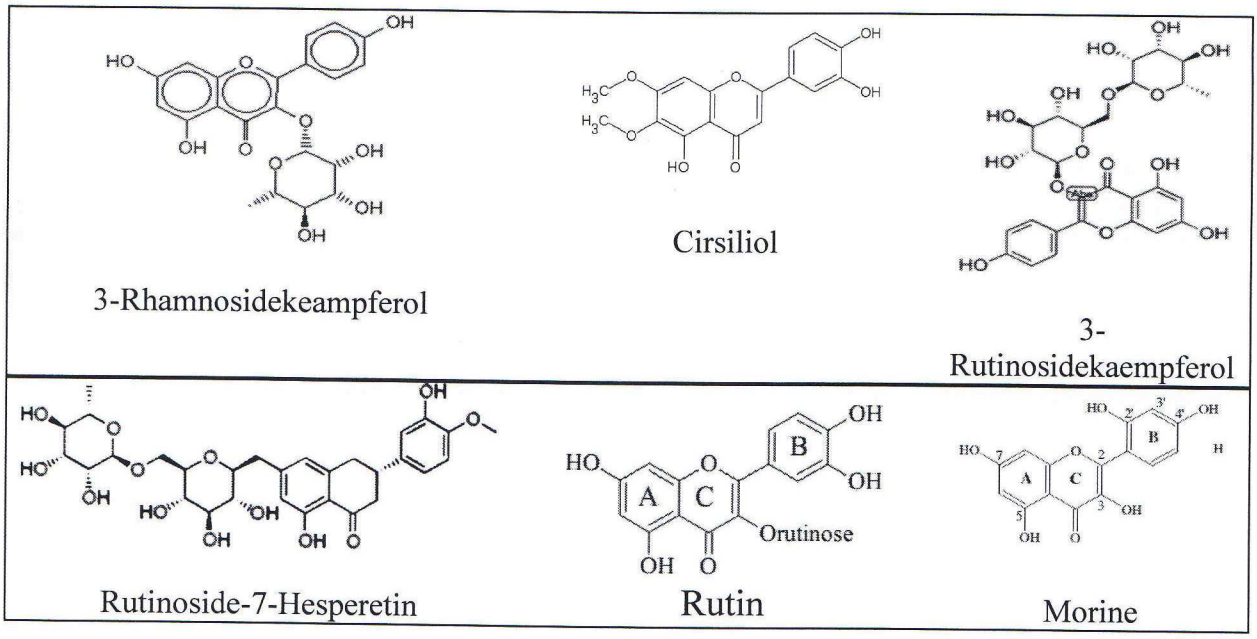
كنتيجة أكيدة لهذا العمل الذي يقوم على تجربة دقيقة ونتائج مؤكدة، نستطيع أن نقول أن طريقة (CV) هي طريقة ذات كفاءة عالية لتقدير الفعالية المضادة للأكسدة (LMWA) للمواد الطبيعية، فتحضير العينة للدراسة بواسطة (CV) بسيط و سريع و لا يتطلب إجراءات معقدة، كما إن منحنى(CV) يمكننا من استنتاج القدرة الإرجاعية للعينة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

وفي الأخير ارجوا من الباحثين و المهتمين بمثل هذه الدراسات تكثيف أبحاثهم في هذا المحور و المتعلق بتقدير مضادات الأكسدة بالطرق الكهروكيميائية لعدة اعتبارات أهمها أن هناك توجه عالمي غير اعتيادي لهذه الدراسات خاصة على مستوى الدول: روسيا، الولايات المتحدة الأمريكية و الكيان الاسرائيلي هذا الأخير الذي له حصة الأسد من هاته الأبحاث، ذكرت هذا لأهمية الموضوع و سعة المجالات التي يمكن إن يستخدم فيها.

الملحق (1): صور مأخوذة من (Google Earth) تبين مواقع و مقدار المساحات الخضراء حول المزارع التي أخذت منها العينات.



الملحق (2): صيغ بعض الفلافانويدات المستخدمة في الصناعة الصيدلانية



الملحق (3): الجداول و الحسابات الخاصة بحمض الأسكروبيك (AA) و الغاليك (GA)

كثافة التيار (uA/cm^2)	مساحة الموجة المصعدية (uW)	تركيز حمض الأسكروبيك (mM)
3,836	2,3216	0,09975
6,15	2,9153	0,199004
8,267	3,3234	0,297766
10,12	3,8196	0,396039
11,3	4,2026	0,493827
13,22	4,6211	0,591133
14,85	5,1756	0,68796
16,92	5,6535	0,784313
18,97	6,1691	0,880195
20,84	6,687	0,975609
22,88	7,153	1,070559
24,73	7,684	1,165048
26,73	8,17	1,259079
28,28	8,618	1,352657
30,24	9,115	1,445783
32,02	9,667	1,538461

تركيز حمض الغاليك (mM)	مساحة الموجة المصعدية (uW)
0,09975	1,9307
0,199004	2,8508
0,297766	3,6988
0,396039	4,5749
0,493827	5,4457
0,591133	6,236
0,68796	7,093
0,784313	7,9
0,880195	8,729
0,975609	9,531
1,070559	10,481
1,165048	11,214
1,259079	11,82

جدول للنتائج المستخلصة من المنحنيات (CV) و المتعلقة بالموجة المصعدية لمختلف عينات البروبوليس بأخذ (AA) كمركب قياسي

المستخلصات	المناطق	كتلة المستخلص في الخلية (g)	مساحة الموجة المصعدية (uW)	تركيز AA المكافيء (mM)	كتلة AA المكافئة (mg)	كمية AA المكافئة لـ(g) من المستخلص بـ(mg)
A	خنشلة	0,18	3,4168	0,3257	2,8109	**15,616**
B	الوادي	0,18	2,3085	0,1069	0,9225	5,125
C	غرداية	0,18	2,3822	0,1214	1,4773	8,207
D	اليابان	0,18	2,7991	0,2037	1,758	9,766

جدول للنتائج المستخلصة من المنحنيات (CV) و المتعلقة بكثافة التيار المصعدي لمختلف عينات البروبوليس بأخذ (AA) كمركب قياسي

المستخلصات	المناطق	كتلة المستخلص في الخلية (g)	كثافة التيار (uA/cm^2)	تركيز AA المكافيء (mM)	كتلة AA المكافئة (mg)	كمية AA المكافئة لـ(g) من المستخلص بـ(mg)
A	خنشلة	0,18	5,38	0,1737	1,4991	**8,3283**
B	الوادي	0,18	3,127	0,05785	0,4992	2,7733
C	غرداية	0,18	3,337	0,06866	0,5926	3,2922
D	اليابان	0,18	4,72	0,1398	1,2065	6,7027

جدول للنتائج المستخلصة من المنحنيات (CV) و المتعلقة بالموجة المصعدية لمختلف عينات البروبوليس بأخذ (GA) كمركب قياسي

المستخلصات	المناطق	كتلة المستخلص في الخلية (g)	مساحة الموجة المصعدية (uW)	تركيز حمض الغاليك المكافيء (mM)	كتلة حمض الغاليك المكافئة (mg)	كمية GA المكافئة لـ(g) من المستخلص بـ(mg)
A	خنشلة	0,18	3,5557	0,2812	2,5923	**14,4019**
B	الوادي	0,18	2,7227	0,1811	1,5877	8,8205
C	غرداية	0,18	2,995	0,2138	1,9715	10,9530
D	اليابان	0,18	3,3279	0,2540	2,3421	13,0117

الملحق (4): بعض نتائج دراسات استعملت فيها الطريقة (CV).

جدول لنتائج تقدير الفعالية المضادة للأكسدة بالطريقة (CV) لبعض أنواع الخضر.

	الفعالية المضادة للأكسدة المكافئة (AA) بـ(mg/100g)	الفعالية المضادة للأكسدة المكافئة (AA) بـ(mg/100g) حسب (USDA)
القرنبيط	117.5	93.2
الذرة	13	6.8
الطماطم	22.8	19.1
البطاطس	122.5	19.7

USDA. *USDA nutrient database for standard reference* (12th ed.).

جدول لنتائج تقدير الفعالية المضادة للأكسدة بالطريقة (CV) لبعض أنواع الفطر.

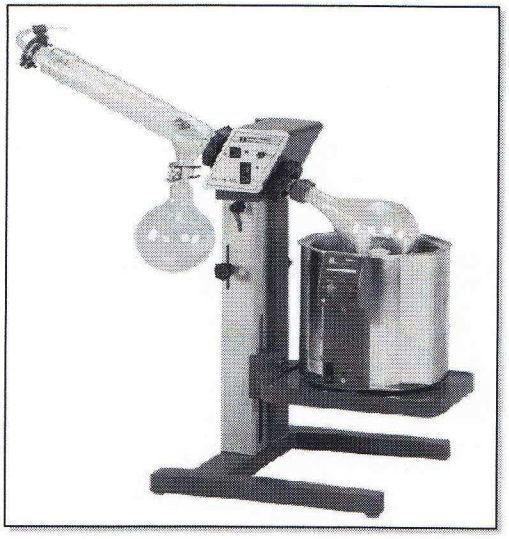
مستخلصات الفطر	الفعالية المضادة للأكسدة المكافئة (AA) بـ(mg/100g)	الفعالية المضادة للأكسدة المكافئة (GA) بـ(mg/100g)
A. arvensis	310	270
A. bisporus	190	160
A. romagnesii	280	240
A. silvaticus	440	370
A. silvicola	460	400

L. Barros et al.Food Chemistry 111 (2008) 61–66

الملحق(5): بعض الاجهزة المستعملة

جهاز التبخير الدوار(Rotary Evaporators) IKA RV

Type of cooling	RV 06-ML 1-B: diagonal
Cooling surface	1200 cm2
Evaporator capacity	1000 ml/h
Motor principle	DC
Motor rating input	45 W
Motor rating output	36 W
Speed range	10 - 240 1/min
Lift	Motor
Stroke	150 mm
Heating temperature range	room temp. - 225°C
Heat output	1000 W
Heat control accuracy	5±K
Bath volume max.	4 l
Vacuum controller integrated	no
Permissible ambient temperature	5 - 40°C
Permissible relative moisture	80%
Voltage	220 - 240 / 100 - 120 V
Frequency	50/60 Hz
Power input	1050 W

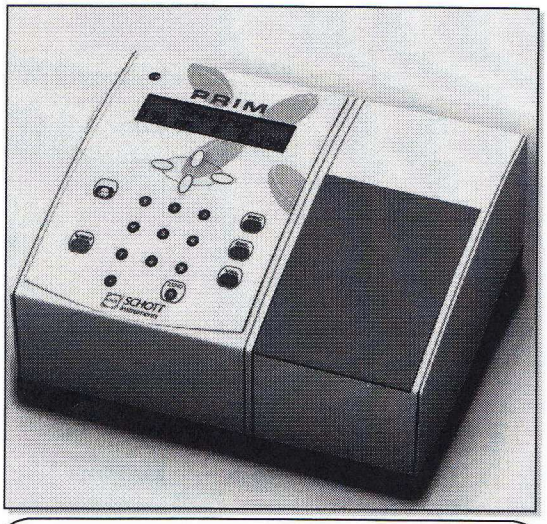


جهاز التبخير الدوار **Rotavapeur**

المؤسسة المصنعة: IKA Werke Staufen/Germany

جهاز قياس طيف الأشعة فوق البنفسجية (PRIM Advanced Spectrophotometers)

Technical specifications PRIM Light and PRIM Advanced	
Spectral range	330–990 nm
Bandwidth	10 nm
Accuracy	±1.5 %
Precision	±1 nm
Photometric range	–0.3 ... 2.5 Abs, 0 ... 200 %T
Accuracy	±2 %
Drift	< 0.003 A/h @ 500 nm
Stray light	0.5 %T @ 340 & 400 nm
Display	Alphanumeric, LCD, back-lit, 2 lines, height 8 mm, 16 characters
Zero	Automatic
Light source	Halogen
Detector	Silicon diode
Interface	Serial RS232C
Cell holder	1 cuvette 10 mm
Power	115/230V ... 50/60Hz
H x W x D, Weight	180 x 280 x 220 mm, 2.5 kg

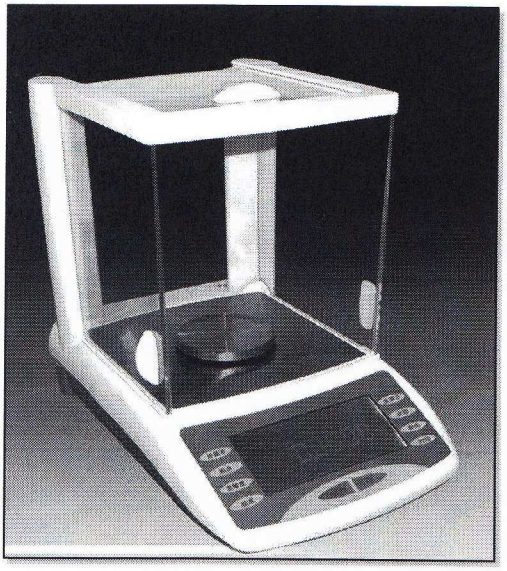


جهاز (UV-Vis) المستعمل:
PRIM Advanced Spectrophotometers

المؤسسة المصنعة: SCHOTT Instruments GmbH/Germany

الميزان التحليلي نوع (FA2004):

Model	FA2004
Capacity	0-200g
Reading Accuracy	0.1mg
Pan Diameter	φ 80mm
Output Interface	RS232C
Overall Dimensions	324mm*217mm*335mm
Net Weight:	7kg
Power Supply	220V/50Hz, 110V/60Hz.

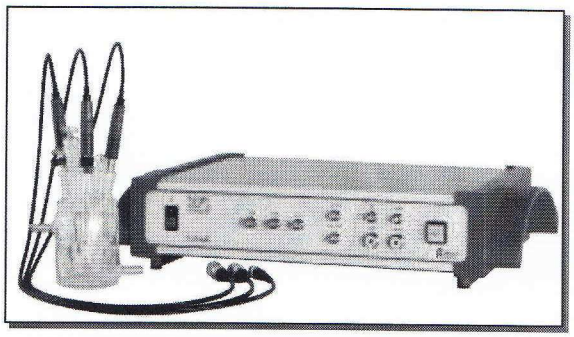


ميزان تحليلي نوع (FA2004)

المؤسسة المصنعة: Shanghai Sunrise Instrument Co.,Ltd.

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

Model	VOLTALAP 40
Scan rate	20 V/s
Best current resolution	30 pA
EIS Maximum frequency	100 kHz/40 kHz
EIS Modes	Potentiostatic Galvanostatic
Recommended for	Development
Maximum compliance voltage	±30 V
Maximum current output	±1 A
Maximum polarisation voltage	±15 V
Power Supply	(230 V)



جهاز (VOLTALAP 40, 230 V)

المؤسسة المصنعة: Radiometer Analytical SAS