



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
The people's Democratic Of Algeria
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي



Ministry Of Higher Education and scientific Research

جامعة قاصدي مرباح-ورقلة-

University Kasdi Merbah -Ouargla-

كلية الرياضيات وعلوم المادة

Faculty Of Mathematics and sciences Matiarial

قسم الكيمياء

Chemistry Department

مذكرة مقدمة ضمن إستكمال متطلبات لنيل شهادة ماستر أكاديمي في الكيمياء

التخصص: كيمياء المواد الطبيعية

من إعداد الطالبة: صالحى أسماء

بعنوان:

دراسة معايير وأسس اختيار طرق تقدير الفعالية المضادة للأكسدة
لبعض مستخلصات النباتات الطبية

نوقشت علنا يوم: 2021/60/20

أمام لجنة المناقشة:

رئيسا	أستاذ محاضر - أ. جامعة قاصدي مرباح ورقلة	د. علاوي عبد الفتاح
مناقشا	أستاذ محاضر - أ. جامعة قاصدي مرباح ورقلة	د. نجيمي محمد السعيد
مؤطرا	أستاذ محاضر - أ. جامعة قاصدي مرباح ورقلة	د. بن على مصطفى

السنة الدراسية: 2021/2020

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

أهدى

أهدي ثمرة عملي هذا إلى:

من تعجز كلماتي و تنحني هاماتي لعطائها، شمس حياتي الذي لا يغيب و الذي أخاف غيابه، ومشعة النور في الظلمات إلى خير الأنيس و الجليس إليك (يا جدي غاليتي مؤنستي) أدعو الله أن يطيلك لي عمرا وراحة .

إلى من علمتني الصبر والنجاح في مواجهة الصعاب وكافحت في دنياها في سبيلنا، إليك من منحتنا وقتها صحتها و كل ما ملكت (يا أمي) أدام الله عزك و طيب ثراك إلى صاحب السيرة العطرة و الفكر المستنير، إلى من كان له الفضل الأول في بلوغي العلم إليك (يا والدي مسند اضغفي).

إلى اخواتي الاشقاء (نريمان، منال، لينة، و عبد الحفيظ) و عائلتي الثانية (خالي، زوجته، إكرام، محمد الأمير، نزار، رتاج، ردينة و أحمد رامي) أجزاء حياتي و فرحتي و من كان لهم بالغ الأثر في تخطي كثير من العقبات.

إلى أصدقاء حياتي: بثينة رفيقة دربي، أماني ، صبرينال، و الأخ الذي لم تلده أمي هشام.

إلى كل أسرة الكيمياء بجامعة قاصدي مرباح ورقلة الذين لم يتوانوا في مد يد العون . إلى كل أحرار الأمة الإسلامية في كل بقاع العلم وإلى كل صاحب فكر مصلح يعيش لأجل فكره

أهدي إليكم بحثي المتواضع راجية من المولى سبحانه، أن يكون نافعا قواما لأمتي و ديني.

صالحي أسماء

مشاهدة وفقت

إن الشكر لله أولاً وأخيراً، الذي أنعم علي بالتوفيق لإتمام هذا البحث، و الذي أمل أن أكون قد وفقت لإتمام هذا الغرض الذي كان من أجله، و أصلى و أسلم على حبيبنا و قدوتنا خاتم النبيين و إمام المرسلين سيدنا محمد الذي علمنا حب العلم و السعي لأجله.

لقد أنجز هذا البحث بجامعة قاصدي مرباح -ورقلة -، تحت إشراف الأستاذ "بن علي مصطفى" الذي له مني جزيل الشكر والتقدير والاحترام وعظيم الامتنان على اقتراح موضوع المذكرة والأشراف عليها وعلى كل النصائح والتوجيهات القيمة والمساعدات وعلى مجهوده طوال مرحلة إنجاز هذا البحث، فجعله الله في ميزان حسناته وأرجوا من المولى عز وجل أن يمدّه الصحة والعافية.

كما أتوجه بشكري الجزيل إلى أساتذتي "نجيمي محمد السعيد" و "علاوي عبد الفتاح" في لجنة المناقشة لتفضلهم علي بقبول مناقشة هذه المذكرة، فهم أهل لسد خللها و تقويم نقصها و الإبانة عن مواقع النقص فيها، سائلة الله الكريم أن يجازيهم خيراً.

صالحى أسماء

قائمة الجداول

رقم الصفحة	عنوان الجدول	رقم الجدول
	الجزء النظري	
7	الأنواع الاكسجينية النشطة	1
67	النسب المئوية إختبارات المدروسة خلال السنوات 2015-2020	2
75	مجالات النسب المئوية الاختبارات المحددة بدلالة السنوات	3

رقم الشكل	عنوان الشكل	الصفحة
الجزء النظري		
الفصل الأول		
1	كيفية تشكل الجذور الحرة	06
2	المصادر الداخلية للجذور الحرة	11
3	المصادر الخارجية للجذور الحرة	11
4	إختلال التوازن بين الجذور الحرة و مضادات الأكسدة	13
5	الأضرار التي يسببها الإجهاد التأكسدي	14
6	البنية الفراغية لأنزيمات مضادات الأكسدة الطبيعية (a,b,c,d)	16
7	البنية فيتامين C	17
8	البنية فيتامين E	18
9	البنية β -كاروتين	18
10	المركبات الفينولية و مشتقاتها	19
11	البنية الكيميائية لمركب BHA	20
12	البنية الكيميائية لمركب BHT	20
13	البنية الكيميائية لمركب AG	21
14	البنية الكيميائية لمركب PG	21
15	البنية الكيميائية لمركب THBQ	22
الفصل الثاني		
16	قرص طيف الألوان	27
17	آلية عمل إختبار ORAC	29
18	آلية تشكل المعقد (Fe ⁺³ /Fe ⁺² -TPTZ) و التفاعل مع مضادات الأكسدة	33
19	آلية التفاعل لإختبار فيرسيانيد البوتاسيوم	34
20	إتحاد إلكترونات المدار للفلز Fe مع الروابط CN	35
21	آلية التفاعل لإختبار تقليل أيونات النحاس	37
22	آلية التفاعل لإختبار فولين سيوكالتيو	39
23	آلية التفاعل لإختبار الفوسفوموليبدنيوم	41
24	آلية التفاعل لإختبار تمخبل المعادن (تمخبل الحديدوز)	43
25	آلية التفاعل بيتا-كاروتين: (β -carotène)	45
26	آلية التفاعل كسح الجذور الحرة DPPH	48
27	آلية التفاعل لجذر الكاتيوني ABTS	51

53	آلية التفاعل لاختبار حمض ثيوبرباريك (TBA)	28
55	آلية التفاعل بيروكسيد الهيدروجين	29
57	آلية التفاعل الكسح الجذري لأكسيد النترريك	30
60	المنحني الجهدي التياري للفولطامتري الحلقي	31
61	منحنيات الجملة السريعة و البطيئة للفولطامتري الحلقي	32
61	الأجهزة المستعملة في الفولطامتري الحلقي	33
62	مجال الكهروفاعلية الفولطامتري الحلقي	34
62	نقاط الرئيسية لمنحني الفولطامتري الحلقي	35
الفصل الثالث		
68	القيم النسبية اختبار DPPH بدلالة السنوات المدروسة	36
68	القيم النسبية اختبار ABTS بدلالة السنوات المدروسة	37
68	القيم النسبية اختبار FRAP بدلالة السنوات المدروسة	38
69	القيم النسبية اختبار PR بدلالة السنوات المدروسة	39
69	القيم النسبية اختبار TPC بدلالة السنوات المدروسة	40
70	القيم النسبية لاختبار CUPRAC بدلالة السنوات المدروسة	41
70	القيم النسبية لاختبار ORAC بدلالة السنوات المدروسة	42
71	القيم النسبية لاختبار BC بدلالة السنوات المدروسة	43
71	القيم النسبية لاختبار TBA بدلالة السنوات المدروسة	44
71	القيم النسبية لاختبار CAA بدلالة السنوات المدروسة	45
72	توزع نسب الاختبارات المدروسة لعام 2015	46
73	توزع نسب الاختبارات المدروسة لعام 2016	47
73	توزع نسب الاختبارات المدروسة لعام 2017	48
74	توزع نسب الاختبارات المدروسة لعام 2018	49
74	توزع نسب الاختبارات المدروسة لعام 2019	50
75	توزع نسب الاختبارات المدروسة لعام 2020	51
الجانب العملي		
88	أسئلة الاستبيان الالكتروني على google Docs	52
91	ردود (إجابات) الاستبيان بشكلها البياني للمحور الأول	53
94	ردود (إجابات) الاستبيان بشكلها البياني للمحور الثاني	54

قائمة الرموز

الرمز	العربية	الأجنبية
ROS	أنواع الأكسجين التفاعلية	Reactive oxygen species
HO·	جذر الهيدروكسيل	Rdical hydroxyle
O ⁻²	جذر أيون فوق أكسيد	Anion superoxyde
H ₂ O ₂	بيروكسيد الهيدروجين	Peroxyde d'hydrogène
O ₂	الأكسجين	Oxygène
RO·	جذر الألكوكسيل	Radical alkoxyl
OH ⁻	أنيون الهيدروكسيل	hydroxyde 'anion
ROO·	جذر البيروكسيل	Radical peroxyde
NO·	جذر الأزوت	Rdical d'azote
¹ O ₂	أحادي الأكسجين	Oxygène singulet
H ₂ O ₂	بيروكسيد الهيدروجين	Peroxyde d'hydrogène
ROOH	بيروكسيل عضوي	Peroxyde organique
HClO	حمض هيدروكلوريد	Acide hypochloride
ONOO·	بيروكسي نيتريت	Peroxynitrite
Hb	هيمو غلوبين	Hemoglobin
NDPH	فوسفات ثنائي نيوكليوتيد الادينين و أميد نيكوتين	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
SOD	سبيروكسيد دوز ميثاز	Superoxide Dismutase
RNS	أنواع النيتروجين التفاعلية	Reactive Nitrogen Species
RSS	أنواع الكبريت التفاعلية	Reactive Sufre Speice
ATP	أدينوسين ثلاثي الفوسفات	Adenosine triphosphate
IR	اشعة تحت الحمراء	Infrarouge
UV-VIS	أشعة مرئية و فوق بنفسجية	Ultraviolet/Visible
UVB	أشعة فوق البنفسجية B	Ultraviolet B
CAT	كاتالاز	Catalase
GPX	غلوتاثيون بيروكسيداز	Glutathion peroxidase
GR	غلوتاثيون ريدكتاز	Glutathion reductase
BHA	بيوتيل هيدروكسي أنزول	Butylate hydroxyanisol
BHT	بيوتيل هيدروكسي تولين	Butyl hydroxy toluéne
AG	حمض الغاليك	Acide galique
PG	بروبيل الغالات	Propyle galat
THBQ	هيدروكينون ثلاثي بيوتيل	Hydroquinone tertabuty
AscH ⁻	أسكورات	Ascorbate
TO·	جدرتوكوفيروكسيل	Tocopheroxyl radical
TOH	توكوفرول	Tocopherol
J	قوة الجذب الإلكترونية	Electrostatic force of attractio
HAT	إنتقال ذرة الهيدروجين	Hydrogen Atom Transfer

قائمة الرموز

ORAC	قدرة إمتصاص الأكسجين الجذري	Oxygen Radical Absorption Capacity
TRAP	إجمالي محاصرة جذور البروكسيل	Total Peroxyl Radical Trapping Antioxidant Parameter
SET	إنتقال الألكترون الأحادي	Single Electron Transfer
FRAP	تقليل أيونات الحديدك	Ferric Ion Reducing Antioxidant Power
V	فولط	Volte
I%	نسبة التثبيط	The percentage of inhibition
CFT	نظرية المجال البلوي	Crystal Field Theory
A _{Control}	امتصاصية الشاهدة	Absorbance of control
A _{Extrait}	امتصاصية المستخلص	Absorbance of extrait
TAC	الفعالية المضادة للاكسدة الأجمالية	Total antioxidant capacity
F-C	فولين سيوكاليتو	Folin-Ciocalteu
PM	فوسفوموليبدنيوم	Phosphomolybdenum
TBA	حمض ثيوبرباريك	Thiobarbituric Acid
TBARS	الانواع التفاعلية لحمض الثيوباربتريك	Reactive types of Thiobarbituric Acid
MDA	مالونديالدهيد	Malondialdéhyde
TBA-MDA	معقد (حمض ثيوبرباريك- مالونديالدهيد)	Complex(Thiobarbituric Acid- malondialdéhyde)
AA	نشاط مضادات الأكسدة	Activity antioxidants
SA	حمض السلفانك	Acide sulfanic
NED	إثيلانديامين	Ethylenediamine
SNP	نيتروبروسيد الصوديوم	Sodum nitroprosid
DPPH	2,2-ديفينيل-1-بيكريل هيدرازيل	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
IC ₅₀	تركيز المستخلص الذي يثبط نصف كمية الجدر	Inhibition concentration 50%
K ₂ S ₂ O ₈	بيرسولفات بوتاسيوم	Potassium persulfate
MnO ₂	أكسيد منغنيز	Manganese dioxide
KH ₂ PO ₄	مونوبوتاسيوم فوسفات	Phosphate monopotassium
TEAC	فعالية مضادات الأكسدة المكافئة لترولوكس	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
Bu ₄ NPF ₆	تيترايوتيل امونيوم هيكلز افلوروفوسفات	Tetrabutylammonium hexafluorophosphate
I _{pa}	شدة التيار للنتوء المصعدي	current strength of the anodal bulg
I _{pc}	شدة التيار للنتوء المهبطي	The current strength of the cathode
SNDL	الأرضية الرقيمة لنظام التوثيق الوطني	Système National de Documentation en ligne
FR	تمخلب المعادن (تمخلب الحديدوز)	Metal Chelating (Feroous Ion Chelating) assay

الصفحة	المحتوى
I.....	قائمة الجداول
II.....	قائمة الاشكال
III.....	قائمة الرموز
IV.....	فهرس المحتويات
V.....	الخاتمة
VI.....	المراجع

الجزء النظري

الفصل الأول: الجذور الحرة ومضادات الأكسدة

1.....	مقدمة عامة
5.....	I. تمهيد
5.....	1.I تاريخ الجذور الحرة
5.....	2.I تعريف الجذور الحرة
6.....	3.I الأنواع المختلفة للجذور الحرة
6.....	1.3.I الجذور الحرة الأولية
6.....	2.3.I الجذور الحرة الثانوية
6.....	3.3.I أنواع الأكسجين النشطة
6.....	4.I طبيعة الجذور الحرة
6.....	1.4.I الأنواع الأوكسجينية النشطة
7.....	1.1.1.4.I الأنواع الأوكسجينية النشطة الجذرية
8.....	2-1-1-4-I أنواع أكسجين النشطة غير جذرية
9.....	2-1-4-I الأنواع النيتروجينية النشطة
10.....	3-1-4-I الأنواع الكبريتية النشطة
10.....	2-4-I حسب إستقرارها
10.....	3-4-I حسب الشحنة
10.....	5-I مصادر الجذور الحرة
10.....	1-5-I المصادر الداخلية

11.....	2-5-I مصادر خارجية
12.....	6-I خطوات توليد الجذور الحرة.
12.....	7-I متابعة حركية الجذور الحرة.
13.....	8-I فعالية الجذور الحرة.
13.....	9-I الدور الفيسيولوجي للجذور الحرة.
13.....	10-I الإجهاد التأكسدي وتأثيره على الأنظمة الداخلية.
13.....	11-I الأمراض و الأضرار الناتجة التي يسببها الإجهاد التأكسدي.
14.....	12.I دراسة طرق و صيد الجذور الحرة.
15.....	13.I تعريف مضادات الأكسدة.
15.....	1.13.I تصنيف مضادات الأكسدة.
15.....	1.1.13.I حسب طبيعتها.
15.....	1.1.1.13.I مضادات الأكسدة الأنزيمية (الحيوية).
16.....	2.1.1.13.I مضادات الأكسدة غير إنزيمية (الطبيعية).
19.....	3.1.1.13.I مضادات الأكسدة الصناعية.
22.....	2.1.13.I حسب آلية عملها.
23.....	2.13.I آلية عمل مضادات الأكسدة.
23.....	3.13.I شروط إضافة مضادات الأكسدة.

الفصل الثاني: دراسة اختبارات تقييم النشاط المضاد للأكسدة

26.....	II. تمهيد.....
26.....	1.II لماذا تظهر إختبارات مضادات الاكسدة ملونة؟
26.....	2.II ما هو سبب العمل بطول موجي معين؟
27.....	3.II لماذا يتم ملاحظة لون معين في تفاعل كيميائي مضاد للاكسدة؟
27.....	4.II الأساليب المختلفة المستخدمة لقياس النشاط المضاد للأكسدة.
28.....	5.II الإختبارات الكيميائية (الطيافية) لتحديد نشاط مضادات الأكسدة.
28.....	1.5.II الاختبارات المبنية على أساس إنتقال ذرة الهيدروجين (HAT Hydrogen Atom Transfer).
28.....	1.1.5.II اختبار تقدير إجمالي محاصرة الجذور الحرة (TRAP).

- 28.....1.1.1.5.II اختبار قدرة امتصاص الأوكسجين الجذري(ORAC)
- 30.....1.1.1.1.5.II المنهجية العامة لإستخدام اختبار ORAC مخبريا
- SET Single Electron) (Transfer 2.5.II
31.....(Transfer
31.....1.2.5. II إختبارات تقليل مضادات الأوكسدة المحتملة
- 32.....1.1. 2.5.II إختبار تقليل القدرة الإرجاعية للحديديك(FRAP)
- 33.....1.1.1.2.5.II المنهجية العامة لإستعمال FRAP مخبريا
- 34.....2.1.1.2.5.II إختبار تقليل أيونات الحديديك (فيرسيانيد البوتاسيوم)
- 36.....1.2.1.1.2.5.II المنهجية العامة لإستعمال إختبار فيرسيانيد البوتاسيوم مخبريا
- 36.....3.1.1.2.5.II إختبار التقليل من أيونات النحاس(CUPRAC)
- 38.....1.3.1.1.2.5.II المنهجية العامة لإستعمال إختبار CUPRAC مخبريا
- 39.....4.1.1.2.5.II إختبار فولين سيوكالتيو(Folin-Ciocalteu)
- 40.....14.1.1.2.5.II المنهجية العامة لاستعمال اختبار Folin-Ciocalteu مخبريا
- 40.....5.1.1.2.5.II إختبار الفوسفوموليبدنيوم (PM)
- 42.....المنهجية العامة لاستعمال إختبار phosphomolybdenum مخبريا
- 42.....6.1.1.2.5.II إختبار تمخبل المعادن (تمخبل الحديدوز)
- 43.....1.6.1.1.2.5.II المنهجية العاملة لإستعمال إختبار (تمخبل الحديدوز) مخبريا
- 44.....8.1.1.2.5.II إختبار بيتا-كاروتين:(β -caroténe)
- 46.....1.8.1.1.2.5.II المنهجية العامة لأستعمال إختبار β -caroténe
- 47.....3.II إختبارات الوضع المختلط (HAT/SET)
- 47.....1.3.5.II إختبار كسح الجذور الحرة DPPH
- 49.....1.1.3.5.II المنهجية العامة لإستعمال إختبار DPPH مخبريا
- 50.....2.3.5.II إختبار الجذر الكاتيوني ABTS المعبر عنه بالترولوكس المكافئ (TEAC)
- 52.....1.2.3.5.II المنهجية العامة لإستعمال إختبار ABTS مخبريا
- 52.....4.5.II إختبارات أوأليات نشاط مضادات الأوكسدة في الجسم
- 53.....1.4.5.II إختبار حمض ثيوبرباريك(TBA)

54.....	1.1.4.5.II المنهجية العامة لإستعمال إختبار TBA
54.....	2.4.5.II إختبار بيروكسيد الهيدروجين
55.....	1.2.4.5.II المنهجية العامة لإستخدام إختبار بيروكسيد الهيدروجين مخبريا
56.....	3.45.II إختبار تقدير الكسح الجذري لأكسيد النتريك
57.....	1.3.4.5.II المنهجية العامة لإستعمال إختبار كسح جذور النيتروجين مخبريا
58.....	6.II الطرق الكهروكيميائية لتقدير النشاط المضاد للأكسدة
58.....	1.6.II العوامل التي ساهمت في ظهور التقنية الكهروكيميائية
58.....	2.6.II سلبيات و نقائص الطرق الطيفية
58.....	3.6.II مزايا الطرق الكهروكيميائية التحليلية
59.....	4.6.II الفولطامتري الحلقي
61.....	1.4.6.II الأجهزة المستعملة في الفولطامتري الحلقي
61.....	2.4.6.II مجال الكهروفاعلية
62.....	3.4.6.II تفسير منحني الفولطامتري الحلقي
63.....	4.4.6.II المنهجية العامة لاستعمال الفولطامتري الحلقي في تحديد النشاط المضاد للأكسدة

الفصل الثالث: دراسات سابقة حول تقدير الفعالية المضادة للاكسدة

66.....	III. توطئة
66.....	1.III الدراسات المتعلقة بالبحث ذات صلة
67.....	1.1.III التحليل
67.....	1.1.1.III 1 تحليل المنحنيات التي تمثل نسبة كل إختبار إلى السنوات المحددة
67.....	1.1.1.1.III القسم الأول: العلاقة الطردية للاستشهادات بدلالة سنوات الدراسة
70.....	1.1.1.2.III القسم الثاني: العلاقة العكسية للاستشهادات بدلالة سنوات الدراسة
72.....	2.1.1.1.III تحليل Hestogramme التي تمثل نسبة كل إختبار إلى السنوات المحددة

الجانب العملي

78.....	I. مدخل
88.....	1. I المحور الأول من ردود الاستبيان
92.....	2. I المحور الثاني من ردود الاستبيان

مقدمة عامة

مقدمة عامة :

تعتمد حياتنا على سلسلة جيدة التصميم ومنسقة من التفاعلات الكيميائية التي تحدث بشكل طبيعي، حيث أن وجود مليارات الخلايا في أجسامنا مهدد دائماً بالتعرض للأذى مما قد يؤدي إلى تطور الأمراض. إذ أن تطور الأمراض بين عشية وضحاها يرتبط بأحد الأسباب الرئيسية بـ "الإجهاد التأكسدي" الذي يشمل الجذور الحرة، يعتبر هذا الأخير الأكثر فحصاً والذي يزعج الأداء الطبيعي للخلايا المسؤول عن تلفها، مما يؤدي إلى العديد من الأمراض المستعصية بما في ذلك الاضطرابات العصبية (مرض الزهايمر والسرطانات، وأمراض القلب والأوعية الدموية، واعتلال الشبكية، والأمراض الجلدية) كآلية دفاع طبيعية، حيث يتفاعل جسمنا مع أي ضغوط معينة للتأكد من التوازن الخلوي الصحي. (Mozahheb, N.et al;2019)، ومع ذلك، فإن إنزيمات مضادات الأكسدة الموجودة في بعض الأحيان لا تكفي لمكافحة الجذور الحرة، وبالتالي من الضروري إما تناول الأطعمة الغنية بمضادات الأكسدة أو الاعتماد على أدوية للوقاية من الاضطرابات المرضية وعلاجها، فعلى الرغم من أن الجذور الحرة تسبب مجموعة من الأمراض والتي يمكن أن تكون السبب الرئيسي في حدوث السرطان، فمن المهم أن نتذكر أنها تظهر أيضاً تأثيرات علاجية مثيرة للاهتمام، خاصة في التطبيقات المضادة للميكروبات، على سبيل المثال، أصبح نظام إطلاق الجذور الحرة استراتيجية ناشئة لمكافحة مقاومة المضادات الحيوية وتكوينات الأغشية الحيوية (Fasiku, V.et al;2020).

كان هناك تزايد في الاهتمام بكيمياء الجذور الحرة منذ العقود الماضية، ففي العديد من الدراسات البحثية التي أجريت في مختلف المجالات، بغض النظر عما إذا كانت الدراسات متعلقة بالغذاء أو بالنبات، يتم فحص جميع العينات للتحقق من أنشطتها المضادة للأكسدة كعملية فحص أولية في السعي للحصول على مركبات جديدة ذات خصائص قوية مضادة للأكسدة (Nguyen, V.B.et al ;2018, Yahia, Y.et al;2020)، إذ يتم فحص العينات البيولوجية للقدرة المضادة للأكسدة باستخدام سلسلة من الاختبارات بدلاً من الاعتماد على اختبار واحد فقط هذا لأن أوبيتزر وآخرون (Opitz.et al;2014)، في فصل من كتابهم ذكروا أن اختباراً واحداً لا يعطي نتائج واقعية مقارنة بسلسلة من الاختبارات التي تنطوي على تفاعلات كيميائية مختلفة، من المسلم به أن النتائج غير حاسمة ومن الصعب إجراء مقارنات بين مجموعات الفحوصات المختلفة (Carocho, M.et al;2013). فلا تزال القيود والتمثيل الغذائي لمضادات الأكسدة تمثل تحدياً للبحث المستقبلي في مجال كيمياء الجذور الحرة، وبالتالي، يحاول الباحثون البحث عن بدائل أو حلول للتغلب على هذه القيود. تتضمن بعض القيود العامة ما يلي: (1) فيما يتعلق بحماية الأعصاب، لا تقدم مضادات الأكسدة الحماية المناسبة والفعالة فقط بسبب الحاجز الدموي الدماغي (Fortalezas, S.et al;2010)، (2) مضادات الأكسدة الغذائية أكثر حساسية لدى الفئران مقارنة بالبشر (Halliwell, B;2011) (3) في بعض الأحيان أثناء الاختبار في المختبر، تتفاعل مضادات الأكسدة مع الكواشف الموجودة في خليط التفاعل مما يؤدي إلى نتائج خاطئة (Carocho, M.et al;2013).

إلى يومنا هذا حضرت التقارير المتعلقة بتقدير نشاط الفعالية المضادة للأكسدة محل العديد من الإشكاليات و الأبحاث خاصة فيما يتعلق بتحديد نوع الإختبار أو الإختبارات المدروسة دون غيرها، أو بشكل أدق التمكن من إيجاد حل للمشكلة الأكبر والتي تكمن في عدم وجود إختبار شامل يمكن من قياس القدرات المضادة للأكسدة للأطعمة و العينات البيولوجية و النباتية بشكل موثوق (Nabeelah Bibi Sadeer.et al;2020)، فعلى سبيل المثال قام كل من (Huang, D.et al;2005) بتقييم العديد من مقاييسات مضادات الأكسدة من حيث حركتها للأكسدة التلقائية، بينما قام (Alam, M.N.et al;2013) بتقييم نشاط مضادات الأكسدة بناء على الإختلافات في الأساليب في الجسم الحي و في المختبر و العديد من الدراسات التي سعت إلى التحليل و التفصيل بشكل منهجي للتفاعلات الكيميائية لكل مقاسية (إختبار) من مضادات الأكسدة، بالإضافة إلى ذلك لم تصب الدراسات إهتماماتها على نقاط القوة و القيود الخاصة بكل إختبار أو شرح الأسباب الكامنة وراء تطوير الألوان في مثل هذه الإختبارات، علاوة على ذلك لم يتم إقتراح تحسينات موحدة حتى الآن لتطوير إختبارات مضادات الأكسدة (Nabeelah Bibi Sadeer.et al;2020).

لذا إرتئينا أن نساهم في هذه المذكرة بالبحث و دراسة ما هي الأسباب التي تجعل الباحثين على تقدير نشاط الفعالية المضادة للأكسدة بالإعتماد على إختبارات دون غيرها و ماهي الأسس و المعايير التي يتم من خلالها إختيار و إستعمال هذه الإختبارات؟ وهذا قصد المساهمة في إمكانية إستخدام النتائج المتحصل عليها والإستفادة منها في توضيح و تسهيل إختيار هذه الإختبارات في دراسات لاحقة، إذ إشتملت هذه الدراسة على مقدمة جزئين حيث :

الجزء النظري: ركزنا فيه على المسح البيبليوغرافي ، إحتوى على ثلاثة فصول، حيث تضمن الفصل الأول الدراسة النظرية حول الإجهاد التأكسدي ومضادات الأكسدة ، في حين إحتوى الفصل الثاني فقد تطرقنا فيه إلى تاريخ موجز لتطوير الإختبارات المختلفة ، وشرح المبدأ ، والمفهوم العام لكل اختبار ، وأسباب استخدام بعض الكواشف ، والتفاعلات الكيميائية التي تحدث بالتفصيل ، وتغير اللون الذي تم تطويره في كل اختبار ، وسبب قراءة الامتصاص في طول موجي معين مع مقياس الطيف الضوئي، يتم أيضاً سرد نقاط القوة والقيود الخاصة بكل اختبار ، مع إبراز بعض التحسينات الرئيسية التي يجب مراعاتها أثناء التحقق من صحة طريقة جديدة لمضادات الأكسدة، أما الفصل الثالث و الأخير فتطرقنا فيه إلى دراسة إحصائية لدراسات سابقة حول تقدير النشاط المضاد للأكسدة

الجزء العملي: إحتوي استبيان عملي تمت فيه مناقشة النتائج المتحصل عليها و أخير خاتمة تخلص فيها النتائج المدروسة.

تساؤلات البحث: من خلال تتبعنا للدراسات و الأبحاث المنشورة في مجال تقدير الفعالية المضادة للأكسدة لاحضنا إستعمال الباحثين لبعض الإختبارات دون غيرها و عليه تبادر إلينا السؤال التالي:

ماهي الأسس و المعايير التي يتم من خلالها إختيار طرق تقدير الفعالية المضادة للأكسدة بالنسبة للإختبارات دون غيرها ؟

أهداف البحث:

دراسة منهجية بخصوص المعايير التي تحدد إختيار الباحث لإختبار ما.

توجيه الباحثين المقدمين على الفعالية المضادة للأكسدة من خلال جمع و تلخيص دراسات سابقة في هذا المجال.

الأهداف الفرعية:

إحصاء و مناقشة ما ورد في الدراسات السابقة بخصوص: المقارنة بين نسب الإختبارات المستعملة و التي يتم استعمالها كحد تقريبي للتشابه.

الجانب

النظري



و الإجهاد
التأكسدي

الجدور الحرة

الفصل الأول

و مضادات الاكسدة

I. تمهيد:

يعتبر فساد الأطعمة من نتائج الأكسدة الذاتية للسلاسل الغير مشبعة في الأحماض الدهنية تتأكسد إلى أحماض كربوكسيلية ذات أوزان جزيئية أقل، معظمها ذات رائحة كريهة (س.ه.باين و آخرون؛ 1995)، كما يعتبر تلف معظم المواد العضوية عند تعرضها للهواء كجفاف الطلاءات وتغير تركيبة اللدائن و المطاط وتحول المذيبات إلى بيروكسيدات أحد نتواتج هذه الأكسدة (Vollhartt,P;2002).

والأكسدة في جسم الإنسان كل خلية من خلايا الجسم تحتاج إلى أكسجين إذ يتفاعل هذا الأخير مع جزيئات الطعام المهضوم منتجا عنه الماء والطاقة (محمد لخضر بلفار؛ 2016)، وبعض الأنواع الأوكسجين التفاعلية (ROS)، والتي تشمل الجنور الحرة و الجزيئات الفعالة و الأيونات المشتقة من الأوكسجين و التي تكون داخل الانسجة الحية كنواتج كيميائية لعمليات الميتابوليزم التي تحدث بصورة مهمة ومستمرة داخل العضوية لتنشيط الخلايا والعمليات الفيزيولوجية . (P.sharma,et al;2012).

بدورها الأغشية الخلوية والبروتينات و الدهون تتعرض للهجوم بواسطة الجنور الحرة و على مدى سبعين سنة إعتيادية من عمر الإنسان يولد حوالي ما يعادل سبعة عشرة طنا (Kg17.000) من الجنور الحرة (C.Enrique. et al;2002)، ومن لطف الخالق وعظمته و تدبيره أن أجسامنا تصنع مركبات دفاعية مضادة للأكسدة (علاوي،مسعودة؛2015)، لذا فإن إزالة الجنور الحرة بواسطة مضادات الأكسدة تبدو مهمة لحياة الإنسان و بهذا فهي تحمي المركبات العضوية في الجسم من الأكسدة، لكن لا يمكننا الجزم أو التعميم بضررها إذ أننا لا نستطيع أن نعيش بدونها، فالجسم يستخدمها في تحطيم الجراثيم بالإضافة إلى إستخدامها لإنتاج الطاقة لذلك تقوم مضادات الأكسدة الغذائية بالمساعدة على إعادة التوازن (C.Enrique. et al;2002).

في أول الأمر من المهم جدا إعطاء تعريف جيد للجنور الحر، بعد ذلك نتطرق إلى الميكانيزم الفيزيولوجي أو الناتج الذي يتم فيه تكوين هذه الاجسام، وأخيرا نتطرق إلى الأضرار المسببة من طرف هذه الجنور ومختلف الأمراض التي يمكن أن تنجر بطريقة مباشرة أو غير مباشرة بسبب هذه المركبات.

1.I تاريخ الجنور الحرة:

تم إكتشاف الجنور الحرة لأول مرة في الأنظمة البيولوجية منذ حوالي ستين عام، أين طرح العالم هارمن في عام 1956 فرضية تتعلق بالشيخوخة الخلوية في أنها سبب ناتج عن طريق الضرر الخلوي و الجزيئي للجنور الحرة بسبب الأوكسجين، بعدها ما أدى إلى إكتشاف الكيمياء الحيوية للجنور الحرة عندما أظهر الباحثان McCord et Fridoviche أن يفرز في الوسط الحي عام 1990. و في عام 1969 قام الباحثان الأمريكيان (McCord et Fridoviche) بعزل عن كريات الدم الحمراء نظام إنزيمي مضاد للأكسدة (SOD)، مما دل على أن الكائن الحي لأول مرة ينتج الأنواع (ROS) التي يجب أن يحمى نفسه منها، أين كان هذا الإكتشاف نقطة بدء الأبحاث العلمية حول الإجهاد التأكسدي (Souhila.Rouana. et al;2019).

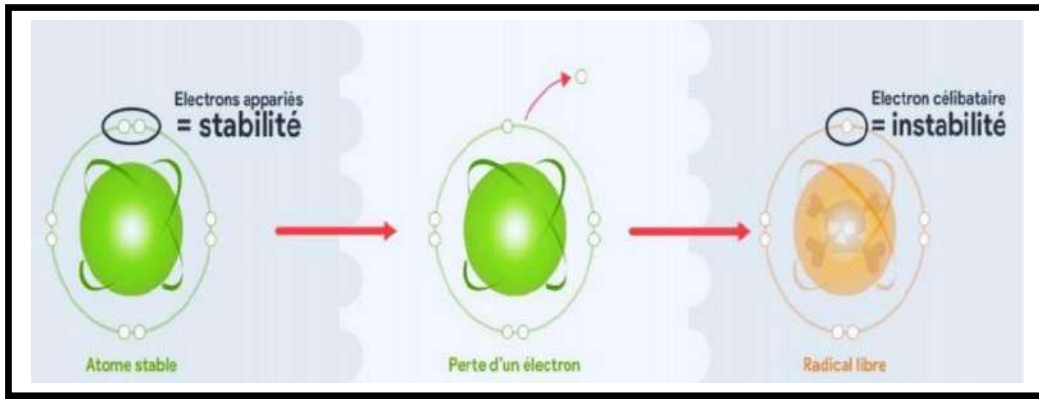
2.I تعريف الجنور الحرة:

عادة ما تكون الإلكترونات مرتبطة بصفة زوجية على مستوى الذرات و الجزيئات، حيث كل زوج يتحرك في منطقة في الفضاء جد معرفة متواجدة حول النواة، هذه المنطقة من الفضاء تسمى الأوربتال (Orbital) كل إلكترون لزوج (Spin) ذات قيمة تساوي (+1/2) لأحدهما و (-1/2) فالجنور الحر هو نوع كيميائي(جزئي أو ذرة) لديه إلكترون منفرد أو عدة إلكترونات غير مقترنة أو على الأقل أحد إلكتروناته يتواجد وحده على الأوربتال .

بالإتفاق يرمز للجنور الحر بنقطة متواجدة على اليمين لرمز الذرة و الجنرالأكثر بساطة هو ذرة H (طارق.بولديار؛2008)، حيث تسعى لإكمال هذا النقص الإلكتروني لإستقرارها بإقترانها أو هجومها على جزيئات بيولوجية بها ذرات تملك كما من الإلكترونات وتكون معظمها شديدة التفاعل (علاوي،مسعودة؛2015)، غالبا ما تسمى السلائف كما تتميز بأعمار حياة قصيرة جدا تتراوح بين

(10⁻³، 10⁻⁹s) (A.meroune,et al;2014) ، حيث يمكن تشكيلها إما عن طريق الأكسدة و الإختزال (إكتساب أو خسارة إلكترون واحد أو أكثر) أو أما عن طريق الإنشطار المتماثل(تمزق الرابطة التساهمية بين ذرتين (CH.Kochelin-Ramonatxo;2006) .

هناك عدد من الجذور المختلفة في الأنظمة البيولوجية على حسب الذرة الحاملة للجذر، فنجد جذور أكسجينية ، جذور كربونية , جذور آزوتية , سيلفيرية ، هيدروجينية ، ومن بين هذه توجد من لديها أهمية بالنسبة لنا ألا وهي الأنواع الأكسجينية الفعالة (ROS) والأشكال الأكثر شيوعا لها هي (Rdicalhydroxyle,HO·) و (Anion superoxydeO⁻²) و (Peroxyded'hydrogène,H₂O₂) (طارق.بولديار؛2008)، كلمة ROS تحوي كل الجذور ذات صفة جذرية متواجدة بالأكسجين، وكذلك بعض المركبات الغير جذرية والتي هي عبارة عن عوامل مؤكسدة أو سهلة التأكسد إلى أنواع جذرية (طارق.بولديار؛2008).



الشكل 1: صورة توضح كيفية تشكل الجذور الحرة

3.I الأنواع المختلفة للجذور الحرة:

هناك العديد من المركبات المؤكسدة التي تتشكل عن طريق الأكسدة عند إستهلاك الأكسجين الذي نتنفسه حيث:

1.3.I الجذور الحرة الأولية: وهي المشتقة مباشرة من تفاعل إختزال O₂ .

2.3.I الجذور الحرة الثانوية: تتشكل من تفاعل الجذور الحرة الأولية على العضيات المكونة للخلية الحيوية.

3.3.I أنواع الأكسجين النشطة: وهي عبارة عن جزيئات مقترنة الإلكترون (مزدوج)، لكن لديها قوة مؤكسدة قوية يمكن أن يؤدي

إلى الشوارد الحرة (M.mongens;2013).

4.I طبيعة الجذور الحرة:

1.4.I حسب العنصر الفعال:

تتشكل العديد من الجذور الحرة خلال عمليات الإستقلاب كالجذور الحرة الفينولية والعطرية لكن المجموعتين الرئيسيتين في الجسم هما:

(Mimie. et al;1999,Thomas P.et al;2004)

1.1.4.I الأنواع الاكسجينية النشطة:

إن الأكسجين(O₂) يعد عامل أساسي لعمليات الحياة الهوائية ، فبالرغم من ذلك يتم تحويل أو حوالي 5% أو أكثر من O₂

المستثنى إلى أنواع الأوكسجين التفاعلية ROS (P.I.Merkamer et al;2013) هذه الاخيرة تشكل مجموعة من المركبات المشتقة من الاختزال الكامل للأوكسجين الجزيئي حيث يتم تلخيصها في الجدول التالي إلى: (Souhila.Rouana et al;2019)

الجدول 1: الأنواع الاكسجينية النشطة

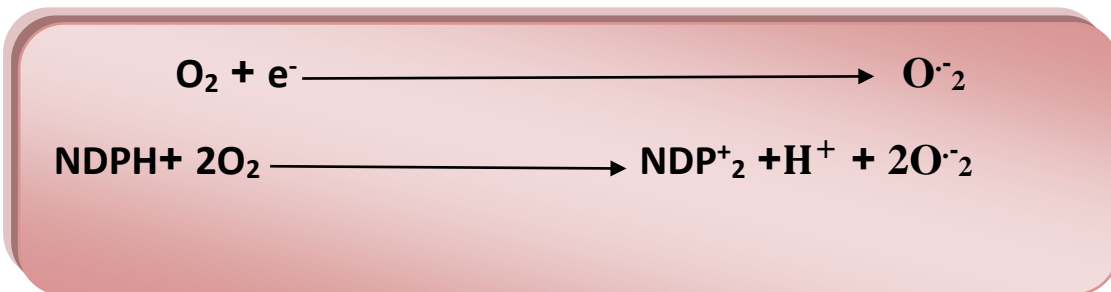
الأنواع الأوكسجينية الجذرية		الأنواع الأوكسجينية غير جذرية	
إسم الجذر	الرمز الموافق	إسم الجذر	الرمز الموافق
Anion superoxyde	$O_2^{\cdot-}$	Oxygène singulet	1O_2
Radical alkoxyde	$RO\cdot$	Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Rdical hydroxyde	$HO\cdot$	Peroxyde organique	$R OOH$
Radical peroxyde	$ROO\cdot$	Acide hypochloreux	$HClO$
Rdical d'azote	$NO\cdot$	Peroxynitrite	$ONOO\cdot$

1.1.1.4.I أنواع الأوكسجين النشطة الجذرية:

تمثل هذه الجذور الحرة الأكثر أهمية في جسم الإنسان، والتي تعرف بأنواع الأوكسجين الفعالة Reactive oxygen Species (ROS)، وهي النواتج الضارة لعمليات الإستقلاب وتلعب دورا في تلف الأنسجة (بن علي مصطفى؛2018). والأكثر شيوعا هي:

• **جذر أيون فوق أكسيد: ($O_2^{\cdot-}$ Superoxide radical anion):**

هو واحد من الأنواع الأوكسجينية النشطة الحرة الذي يعتبر في طبيعة العملية التأكسدية لكل خلايا الكائنات الحية التي تتنفس الأوكسجين في الميتوكوندريا (ربيبي عبد الكريم؛ 2016، Appel,K;2004)، يتم تكوينه في خلايا الدم الحمراء عن طريق أكسدة الهيموغلوبين Hemoglobin (Hb) إلى ميثموجلوبيين Methmoglobin (شربي، رقية؛2017)، حيث ينتج هذا الجذر عن طريق إرجاع الأوكسجين بإستقبالها للإلكترون واحد (ربيبي عبد الكريم؛2016) وفق إحدى المعادلات التالية:

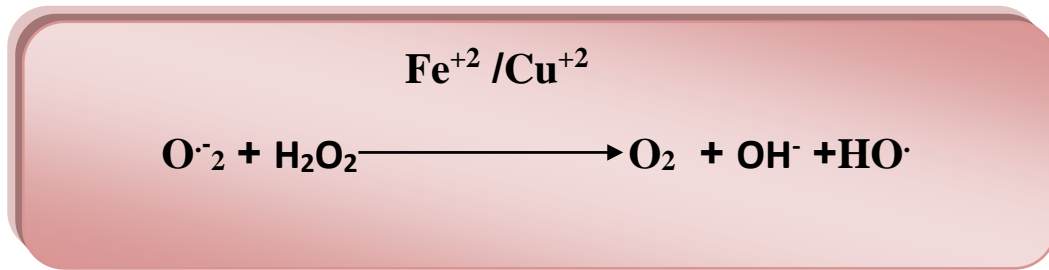


وهو جذر سام جدا لأن بإمكانه أن يتفاعل مع بيروكسيد الهيدروجين وفق تفاعل Haber-weiss لإعطاء جذر الهيدروكسيل شديد التفاعل و الذي يمكن أن يسبب أكسدة المكونات الخلوية، هذا التفاعل يحفز بواسطة أيونات بعض العناصر الإنتقالية ، مثل الحديد Fe^{+2} و النحاس Cu^{+2} . (W.H.Koppenol;1998).

• جذر الهيدروكسيل (HO·): Hydroxyle radical

يمكن أن يتكون HO· لأي تفاعل إنزيمي يتم تحفيزه بأيونات بعض العناصر الإنتقالية الحديد Fe أو النحاس Cu، حيث تسمى هذا التفاعل بتفاعل فنتون (Fenton)، و يعد هذا الجذر الأكثر نشاطا و أقل إستقرار من بين مجاميع (ROS) (C.Thomas et al;2009)، حيث يمتلك نصف عمر قصير جدا و يتفاعل مع الجزيئات التي تكون قريبة منه (ربيعي عبد الكريم؛2016)، خاصة البروتينات و الأحماض الأمينية و الليبيدات الاغشية الخلوية وغيرها من الجزيئات ليغير من تركيبها و يسبب تلفا لأنسجتها (Robert et al;2003)، إذ أنه يعمل على إزاله أو إضافة الهيدروجين لروابط غير مشبعة مما يؤدي على مضاعفة الأضرار و زيادة السمية التي يحدثها بشكل كبير في الخلية (ربيعي عبد الكريم؛2016).

يعتبر من الأنواع الأكسجينية شديدة التفاعل التي يتم إنتاجها من تفاعل بيروكسيد الهيدروجين وفق تفاعل Haber-weiss شديد التفاعل و الذي يمكن أن يسبب أكسدة المكونات الخلوية (W.H.Koppenol;1998).



• جذر هيدروبيروكسيل (HOO·): Hydoperoxy

هو عبارة عن شكل بروتوني للجذر فوق أكسيد، حيث يعتبر عامل إختزال أقوى من أيون فوق أكسيد، كما أنه أقل إستقرار منه بكثير عند قيمة معتدلة ل PH (M.Adjadj;2016).

• جذور الالكوكسيل (RO·) و جذور البيروكسيل (ROO·):

تتشكل هذه الجذور من أكسدة الأحماض الدهنية الغير مشبعة في الليبيدات بواسطة ايون فوق أكسيد الجذر الهيدروكسيلي، الأكسجين المنفرد و الأكسجين، فمثلا جذر (ROO·) يتشكل مباشرة من تفاعل الأكسجين مع جذر الألكيل (R·) (Rohilla et al;2012,J.lee et al;2004,Sies.H;1985)

2.1.1.4.I أنواع أكسجين النشطة غير جذرية:

• الأكسجين الأحادي $^1\text{O}_2$: Singelt oxygen

يعتبر الأكسجين الأحادي من الأنواع الأكسجينية الغير جذرية ، حيث يتميز بغياب إلكترون حر في المدار الخارجي و يتشكل في الأنسجة البيولوجية عن طريق عن طريق تفاعلات الأكسدة الخلوية (J.R.Kanofsky;1989)، أو بتفاعل الأصناف الأكسجينية النشطة فيما بينها (Sorg,O;2004) كما ينتج أيضا عن طريق التحفيز الضوئي (A,A.Krasnorskyjr;2008)، أو ينتج أيضا عن طريق إجهاد تأكسدي محفز بواسطة تنشيط الخلايا البالعة الكبيرة و البروتينات أو خلال أكسدة الدهون و DNA (Sorg,O;2004).

• بيروكسيد الهيدروجين (H₂O₂): Hydrogen peroxide

ينتج النوع H₂O₂ تلقائيا من الجذر O₂⁻ في وسط حمضي أو من تفاعل dismutation (يكسب احدهما ما يخسره الآخر) للأيون O₂⁻ بواسطة إنزيم (Superoxide dismutase SOD)، حسب التفاعل التالي: (Regina M.Dy.et al;2005).



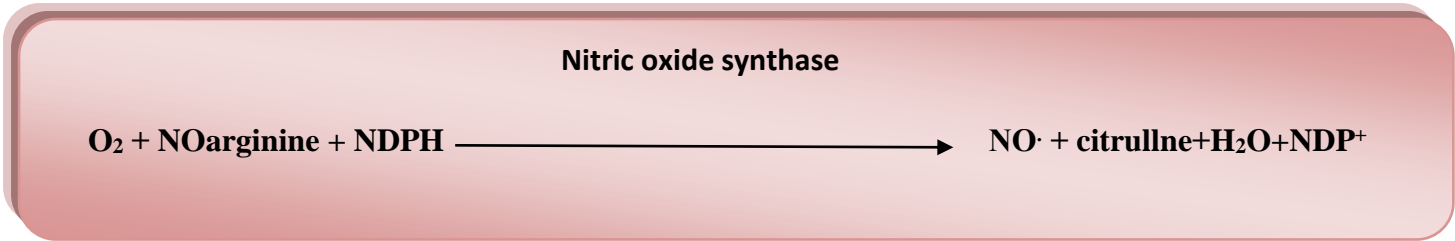
يعتبر بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 من الأنواع الأكسجين الأكثر سمية، لأن غياب الشحنة عليه يسمح له بالعبور عبر الأغشية البيولوجية، كما يمكن ل H_2O_2 أن يتحول إلى جذر الهيدروكسيل HO^{\cdot} في وجود بعض أيونات المعادن وفقاً لتفاعل (فنتون) بتفاعله مع جذر فوق أكسيد ($\text{O}_2^{\cdot-}$) وفق المعادلة السابقة (Birden, E. et al; 2009).

2.1.4.I الأنواع النيتروجينية النشطة:

تعرف بأنواع النيتروجين الفعال (Reactive Nitrogen Species (RNS) وهي:

- أكسيد الأزوت (NO): Nitric oxid:

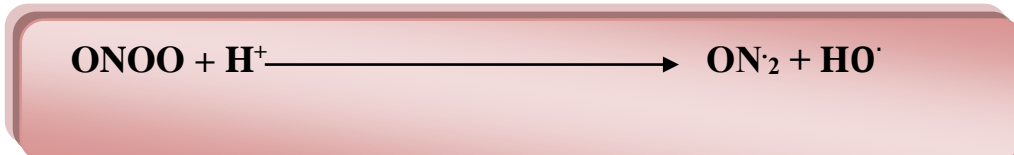
ينشأ جذر أكسيد النترريك NO^{\cdot} عن طريق أكسدة الأرجنين (L-arginine) بواسطة إنزيم Nitric oxide synthase (NOS) إلى (T.Munzel et al; 2005) L-citrulline، في وجود الأكسجين في العديد من الخلايا الحيوية (Sorg, O; 2004)، خاصة الخلايا العصبية حيث يكون له دور في نقل الإشارة العصبية (ربيبي عبد الكريم؛ 2016).



كما يمكن لهذا الجذر أن يتحد مع جذر فوق أكسيد $\text{O}_2^{\cdot-}$ لإعطاء جذر بيروكسي نترت ONOO^{\cdot} و يعتبر مؤكسد قوي و عالي النشاطية و الذي يمكن إتلاف الأنسجة في حالة الإلتهابات المزمنة وفق المعادلة التالية: (Bukman, L; 2013)



كما يمكن أن ينتج بيروكسي نترت في الأوساط الحامضية جذرين هما:



3.1.4.I الأنواع الكبريتية النشطة:

تعرف بالأنواع الكبريتية الفعالة (Reactive Soufre Species (RSS):

تنشأ الجذور الكبريتية النشطة من الأكسدة و الإختزال في للبروتينات أو البيبتيدات الصغيرة أو المركبات في حالة الثيول المختزل .

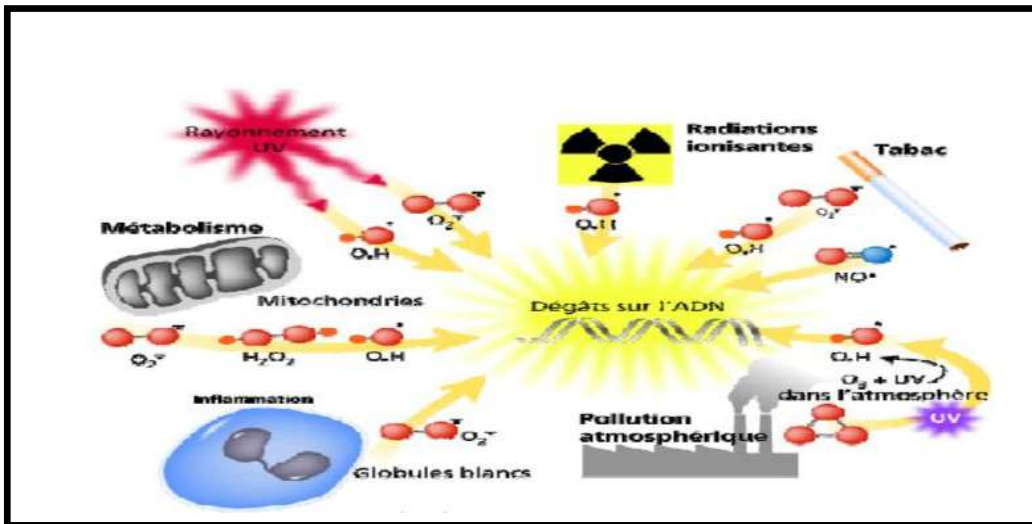
إنزيم (NADPH oxidase):

يلعب إنزيم (NADPH oxidase) دوراً أساسياً في الإستجابة المناعية ضد العضيات الدقيقة الذي يتواجد في العديد من الخلايا على مستوى الغشاء البلازمي، حيث يعمل على إنتاج كميات عالية من فوق أكسيد وفق المعادلة التالية. (Milardovic,S.et al;2006).

2.5.I مصادر خارجية: exogenous:

حوصلت الدراسات الطبية في الآونة الأخيرة على ما يقارب 120 سبب لتكوين الجذور الحرة داخل الجسم، حيث يأتي في مقدمتها التدخين، بعض الأدوية، الأسمدة الكيميائية، الأوزون، المواد الحافظة المستخدمة في الصناعات الغذائية و الأغذية الدهنية و الرياضة التي تتطلب زيادة في إستهلاك الأكسجين (Dilek Dzyurt et al;2007,K.A.et al;2013).

كما أن بعض أيونات المعادن مثل الحديد و النحاس تدخل في تفاعلات كيميائية حيوية داخل الجسم و التي تعرف بتفاعلات فتون (Fenton reactions)، ويؤدي إلى تكوين الجذور الحرة بعض أيونات الحديد والنحاس نتيجة تلوث مصادر مياه الشرب بمخلفات الصرف الصحي الصناعي و الزراعي او عن طريق النبات، حيث تدخل مركبات النحاس في صناعة بعض المبيدات الحشرية (Dilek Dzyurt et al;2007,K.A.et al;2013)، كذلك الأشعة المؤينة التي تستخدم في التصوير الطبي بالأشعة السينية و الأشعة تحت الحمراء IR التي تسبب في إنحلال جزئي الماء و تتولد عنه جزيئات شديدة التفاعل مثل الماء المؤين و التي من شأنها أن تسبب تلف الحمض النووي DNA (P.A.Riley;1994)، ويمكن للأشعة فوق البنفسجية (UV-V) و خاصة الأشعة (UVB) وهو نوع من الأشعة (UV-) V القادرة على تنشيط الإنزيمات (No5) التي تساهم في إنتاج ONOO⁻ ، O₂⁻ ، NO[•] (J.Yao et al;2009,W.liu and S WU;2010,S.U et al;2010)



الشكل 3: صورة تلخص المصادر الخارجية للجذور الحرة

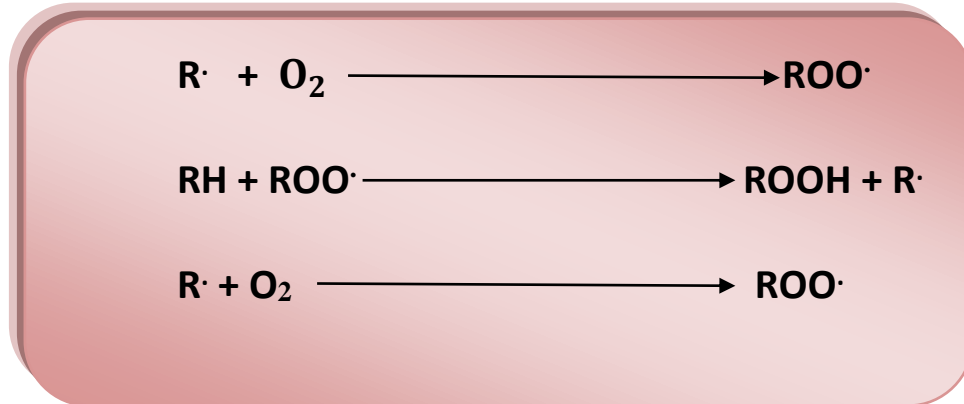
6.I خطوات توليد الجذور الحرة:

تلعب الجذور الحرة في الكيمياء دور تفاعلات الإضافة الجذرية و الإستبدال الجذري و التي تنقسم إلى ثلاث مراحل: A.D.Sarma. et al;2010)

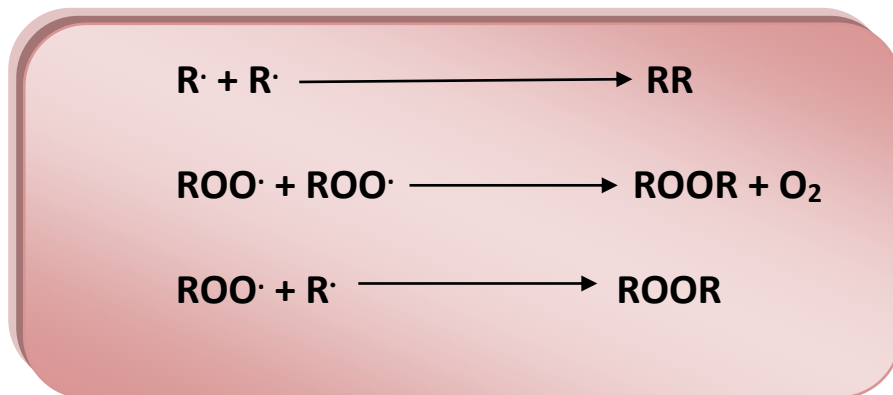
- تفاعلات البداية: تؤدي هذه المرحلة زيادة في عدد الجذور، وقد تتضمن تكوين جذور حرة مع مركبات ثابتة أو تفاعل الجذور الحرة مع فئات ثابتة. (A.D.Sarma. et al;2010)



- **تفاعلات الانتشار:** في هذه المرحلة الجذور الحرة تجدد سلسلة من التفاعلات عن طريق الأكسدة التلقائية للمركبات العضوية بسهولة منحها الهيدروجين من خلال التفاعل (3) (Russell,G;1957)، حيث أن العدد النهائي للجذور يبقى كما هو. (A.D.Sarma. et al;2010)



- **تفاعلات النهاية:** وهي التي ينشأ عنها قلة في عدد الجذور الحرة وغالبا ما تتضمن إتحاد جذرين لتكوين جذر أكثر ثباتا. (A.D.Sarma. et al;2010)



7.I متابعة حركية الجذور الحرة:

إن الجذور الحرة إما أن تكون لها أعمار حياة طويلة أو قصيرة، القصيرة منها لا يمكن متابعة حركية تفاعلاتها إلا بالطرق الطيفية السريعة مثل أطياف الكتلة و أطياف الرنين النووي المغناطيسي، أما الجذور المستقرة نسبيا فيمكن متابعة حركية تفاعلاتها الطرف التقليدية مثل القياس التغير التوصيلة 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 إمتصاص المادة الناتجة. (م.بوقوادة؛2008).

8.I فعالية الجذور الحرة:

أن معظم الجذور الحرة على درجة عالية من الفعالية وعادة لا يمكن فصلها حيث أنه في بعض الأحيان لا بد من استخدام طرق غير مباشرة للكشف عن أحد الجذور، وطاقت التنشيط بين جذرين حرين ضئيلة للغاية تقترب من الصفر غالبا ومع ذلك فالمعدل الحقيقي للتفاعل يعتمد على سرعة تقابل الوحدتين مع بعضهما البعض ومثل هذه التفاعلات توصف بأنها محكومة بالانتشار، وينطبق

هذا التفاعل على خطوة الإيقاف في كثير من التفاعلات المتسلسلة على الإتحاد بين الجذور السريعة (م.بوقوادة؛2008، موريس وبويد ترجمة فاروق قنديل؛2000)

9.I الدور الفسيولوجي للجذور الحرة:

للجذور الحرة لها دور مزدوج إما أن تكون نافعة أو ضارة للأنظمة الحية ففي حالة إنخفاضها وفي شروط معتدلة تلعب الجذور الحرة دورا حيويا في : (بلفار آسية؛2018)

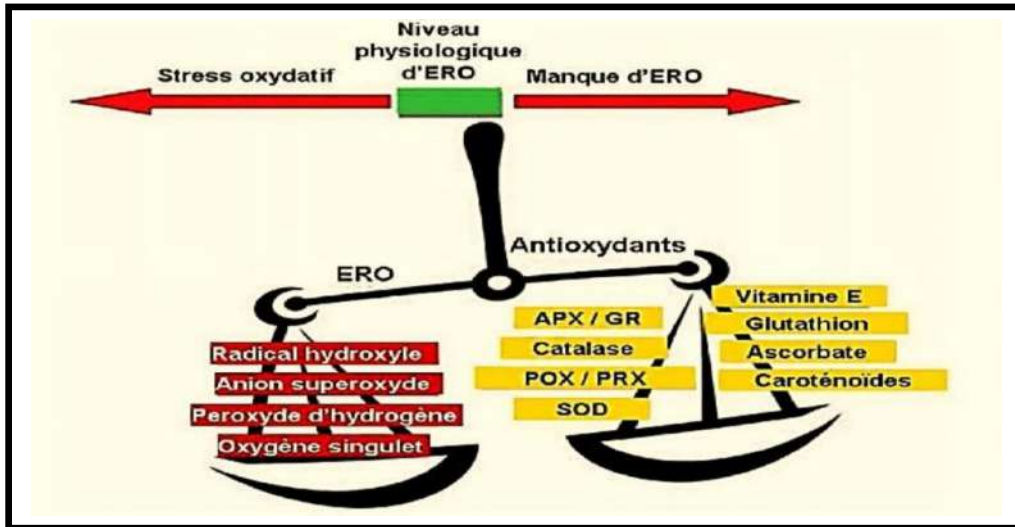
✓ الحفاظ على الوظائف الفسيولوجية الطبيعية للجسم في الجهاز المناعي كإنضاج هيكل الخلية . (Mazumder.P.M.et al;2012)

✓ تمايز الخلايا بشكل عام تؤدي إلى ارتفاع معدلات التنفس المقاومة للسيانيد. (Solah.R ,et al;1986)

✓ قتل الجراثيم باستخدام إنزيم الميليوكسيداز و ذلك عن طريق تحفيز من بيروكسيد الهيدروجين (Thomas.S,et al;2004)

10.I الإجهاد التأكسدي وتأثيره على الأنظمة الداخلية:

كما رأينا سابقا أن الجذور الحرة هي أنواع كيميائية جد فعالة تكون بصفة دائمة في الجسم ، لكن الجدير في الامر أن هذه المركبات عندما تكون كمية إنتاجها في الجسم تفوق قدرته على حذفها حينها ندخل في مرحلة تسمى بالتوتر التأكسدي (Oxidative strees) أو الإجهاد التأكسدي (طارق.بولديار؛2008).، الذي يعرف في النظام البيولوجي على أنه حالة من عدم التوازن بين إنتاج أنواع مختلفة من الجذور الحرة ROS (Reactive oxygen specie) أو NOS (Reactive nitrogen specie) العوامل المؤكسدة مع أنظمة الدفاع المضادة للأكسدة (antioxidants)، حيث يرجع هذا الإختلال إلى الإنتاج المفرط لمولدات الأكسدة أو نقص في مضادات أو هما الإثنان معا . (Dosek et al;2007,M.Schieber et al;2014, Scandalios;2002).

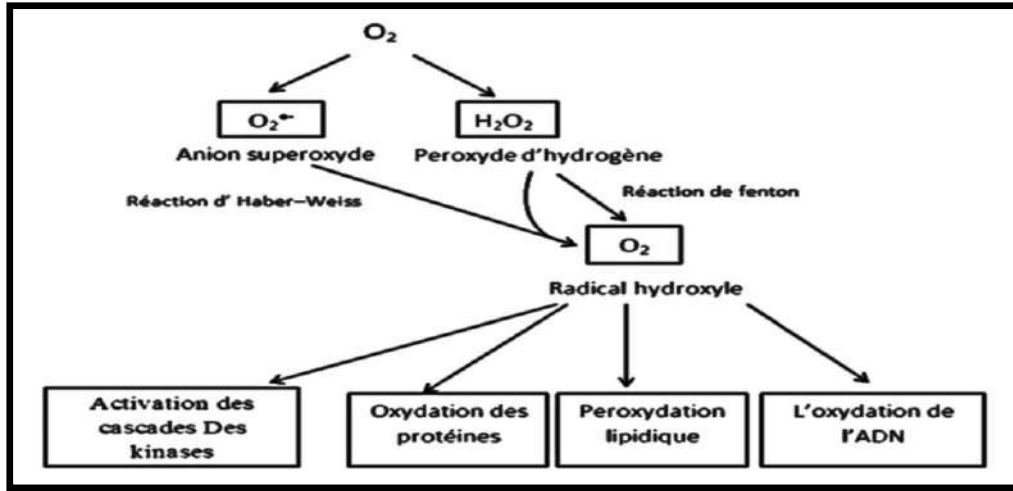


الشكل4: صورة توضح إختلال التوازن بين الجذور الحرة و مضادات الأكسدة

11.I الأمراض و الأضرار الناتجة التي يسببها الإجهاد التأكسدي:

عند عدم تكمن الأنظمة المضادة للأكسدة من مواجهة تدفق و إختراق الأنواع الأكسجينية النشطة للغشاء الخلوي، تخضع الخلية لظاهرة التوتر التأكسدي (طارق.بولديار؛2008)، فإن الضرر الذي تلحقه هذه الجذور يكون أكبر فبالرغم من أن الخلية لديها حماية ذاتية و خط دفاعي لإفرازها مضادات أكسدة، لكن الزيادة في الجذور تضعف تلك القدرة للمضادات الذاتية و الإنزيمات التي تفرزها الخلايا (Gurkan,H;2008) و يسبب هذا الأخير على هذا الأساس أضرار إما ضرر واقع على مستوى الحامض النووي DNA الذي يؤدي إلى تغيير على مستوى القواعد النووية أو إحداث كسور على مستوى السلاسل الأحادية و الثنائية كل هذا يقود إلى خطأ في القراءة أثناء عملية الإستنساخ (Milardovic,S.et al;2006, Van den Berg,R.et al;1999) وهنا تكمن خطورة الجذور الحرة بإمكانية تفاعلها مع الأحماض النووية الذي يؤدي للإضرار بالخلية وقد يسبب تدميرها أو ضعف في المناعة، و أما ضرر على مستوى البروتينات و الذي

يؤدي إلى تغيير طبيعة البروتينات أو التغيير في بنيتها في حالة الإنزيمات يمكن أن تقود هذه التغيرات على مستوى الموقع النشط إلى تثبيطه (Milardovic,S.et al;2006) و من ثم تحويل في وظيفتها مؤديا بذلك إلى حدوث أمراض المناعة الذاتية، و أخطر ضرر هو الضرر الواقع على مستوى الدهون أو الأكسدة الفوقية لها، إذ تنتج عنها أضرار أخرى كأمراض القلب، والأوعية الدموية. (بلغار آسية؛2018)، إتهاب المفاصل الروماتيدي و البنكرياس (Van den Berg,R.et al;1999)، إضطرابات الرئوية مثل إتهاب الكلية و الفشل الكلوي المزمن. (Anyasor G.et al;2010)



الشكل 5: صورة الأضرار التي يسببها الإجهاد التأكسدي

12.I دراسة طرق و صيد الجذور الحرة:

إن دور التوتر التأكسدي في مختلف الميكانيزمات المرضية أدى بالباحثين إلى دراسة دقيقة للأضرار المسببة من قبل هذه الأنواع الكيميائية و أيضا البحث عن مركبات لديها القدرة على صيد هذه الجذور و قبل هذه المرحلة من الضروري إعطاء نظرة حول هذه الجذور كيميا و نوعيا في آن واحد و ذلك من أجل تقييم قدرة مضادات الاكسدة لصيدهم ، إن مصطلح مضادات الأكسدة أو المضادات الجذرية تستعملان بطريقة عشوائية لفاعليتها على الجذور عامة ، كما أن الفاعلية المضادة للأكسدة تعود على فاعلية أي مركب مردع مضاد للأكسدة مهما كان ميكانيزم الفاعلية سواء الأكسدة أو الإرجاع أو تحويل الشحنات أو تثبيط تفاعلات كيميائية ، أما الفاعلية المضادة للجذر مثل فاعلية مضادة للأكسدة يمكن أن تحدث بصيد مباشر للجذر المعني أو بتثبيط تكوين هذا الجذر، كما يمكن أن يكون مركب فعال على جذر و أقل فاعلية على جذر آخر، لذا فإن كلمة مضاد للجذر يجب أن تستعمل بأكثر دقة من كلمة المضادات للأكسدة و التي تعبر عن فاعلية مركب ضد جذر ما. (بلغار آسية؛2018) .

13.I تعريف مضادات الأكسدة:

المضاد للأكسدة هو كل مادة متواجدة بأقل تركيز بالنسبة لتركيز (Substrat oxydable) التي تؤخر أو تمنع أكسدة هذا (Substrat). (Halliwel,B.et al;1995) أي أنها مركبات إما تثبط الجذور الحرة فتعمل على تقويضها لتستقر و تمنع بذلك التأثير الضار الذي تلحقه بالجسم ، إذ تعتبر نضاما دفاعيا ضد الضغط التي تسببه ذرات الأوكسجين الشاردي لحماية خلايا الجسم ، و إما أنها تمنع تكوين الجذور الحرة أو تصلح الضرر الناتج عنها، و الدور الأساسي لمضادات الأكسدة هو كسر سلسلة التفاعلات الجذرية الناتجة عن الأكسدة ،كما تستطيع تعديل أو إصلاح الإتلاف الذي تسببه الجذور الحرة (أل دبليو.ترجمة عادل جورج ساجدي؛1983، ديباسل كامل دلالي و آخرون؛1981) .

1.13.I تصنيف مضادات الأكسدة:

1.1.13.I حسب طبيعتها:

1.1.1.13.I مضادات الأكسدة الأنزيمية:

توجد مضادات الأكسدة في جسم الكائن الحي في صورة إنزيمات أو مرافقات إنزيمية (Co-enzyme) أو مركبات تحتوي على عنصر الكبريت المختزل (محمد لخضر، بلغار؛2016)، حيث يمتلك الجسم العديد من مضادات الأكسدة ، دورها الأساسي في منع تكوين الأنواع الأكسجينية الفعالة SOD وهي تنقسم إلى أربعة فئات هي:

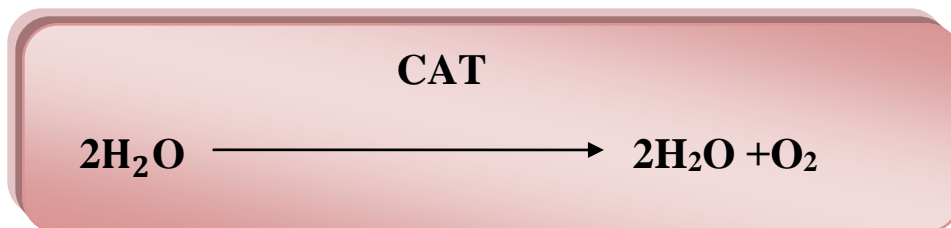
• إنزيم (Superoxide dismutaseSOD):

يعتبر من أهم الأنزيمات المضادة للأكسدة في جسم الإنسان، الذي يدخل في تحليل النواتج السامة للميتابوليزم الخلوي (T.Fukai.et al;2011) حيث يعمل على تحفيز على التخلص من الجذر الحر الأيوني النشط فوق الأكسجين بتحويله إلى أكسيد الهيدروجين و H₂O₂ و أكسجين وذلك بتسريع معدل إزالته حوالي 4 مرات بمساعدة بعض المعادن كالزنك و النحاس وهو يوجد على ثلاث اشكال الشكل (Cu/Zn-SOD) الذي يتواجد أساسا في السيتوزول و النواة و الشكل (Mn-SOD) الذي يتواجد في الميتوكوندري، أما الشكل Ec- (SOD) فيتواجد خارج الخلية (K.Yen.et al;2009) .



• إنزيم الكاتالاز (CAT) Catalase:

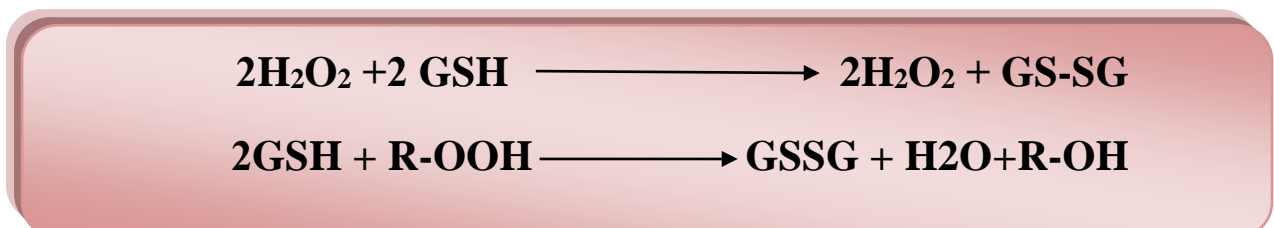
إنزيم الكاتالاز هو واحد من الإنزيمات المضادة للأكسدة ، يلعب دورا محويا في حماية الخلايا من التأثير السام للمواد المؤكسدة و ذلك من خلال أكسدتها أي تثبيط فعاليتها ، حيث يتواجد في أغلب أعضاء الجسم و بنسب متفاوتة (B.J.Day;2007)، حيث يعمل هذا الإنزيم على التخلص من H₂O₂ و ذلك بتحويله إلى H₂O و O₂ (T.Takigwa.et al;2010)



حيث أن الماء و الأكسجين الناتجة ثابتة و مستقرة ولا ضرر منها (محمد لخضر، بلغار؛2016) .

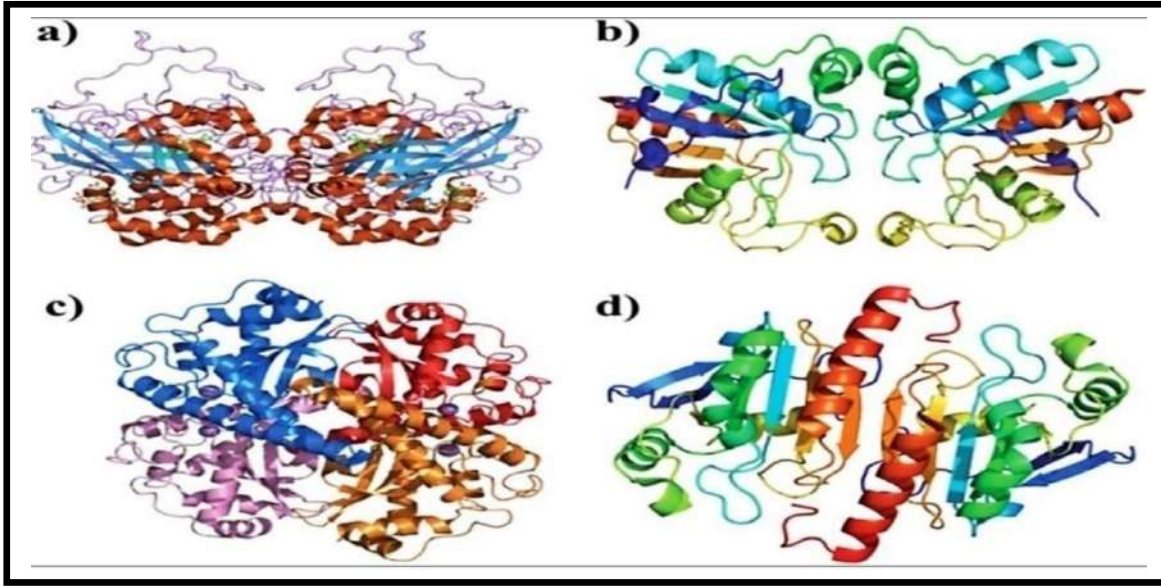
• إنزيم (GPX)Glutathion peroxidase و (GR)Glutathion reductase:

يتواجد كل من (GPX) و (GR) في العديد من الأنواع الخلوية ، حيث يتمركزان في السيتوزول و الميتوكوندري ، ويعتبران من أهم الأنظمة البيولوجية الإنزيمية المضادة للأكسدة لقدرتهما على إزالة عدد من الجذور الحرة و الهيدروبيروكسيدات الناتجة عن أكسدة الكوليسترول و الأحماض الدهنية وفق التفاعلات التالية: (S.Herbette.et al;2007)



• إنزيم Peroxiredoxins:

يعرف أيضا باسم Thioredoxin peroxidase، وقد تم تحديد تأثيرها المضاد للأكسدة حديثا (X.W U.Z.FU.et al;2010)، حيث توجد ستة أنواع منها عند الثدييات توضع أساسا في السيتوزول و الميتوكوندري، كما تتصل هذه البروتينات بالنواة و الأغشية الخلوية (L.Flohé.et al;2008)، حيث يلعب هذا الإنزيم في التخلص من الهيدروبيروكسيدات وذلك لكميتها المعتبرة، إذ تمثل 0.1-0.8% من البروتينات الحرة الخلوية (M.N.Alvare R.et al;2011).



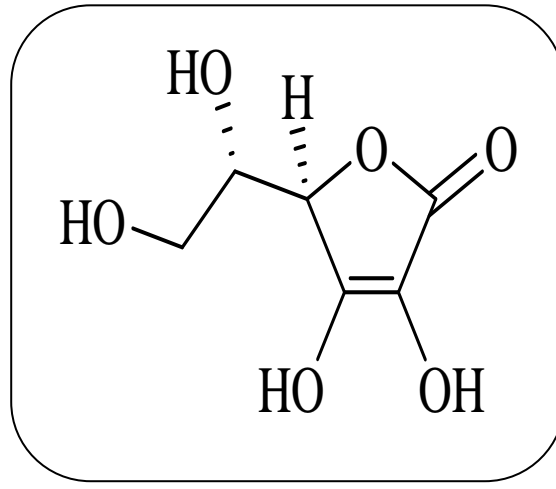
الشكل 6: البنية الفراغية لأنزيمات مضادات الأكسدة الطبيعية

2.1.1.13.I مضادات الأكسدة غير إنزيمية (الطبيعية):

على عكس مضادات الأكسدة الإنزيمية فإن معظم المركبات لا تنتج من طرف العضوية يكون مصدرها نباتي، منها الخضروات و الفواكه و الحبوب و النباتات الطبية، الأعشاب العطرية التي تحتوي على المركبات الفينولية و مشتقاتها، حيث أثبتت عدة دراسات أن الفاعلية المضادة للأكسدة لهذه المركبات راجع إلى خاصية الأكسدة والإرجاع والتي يمكن أن تلعب دورا هاما في إمتصاص و تعديل الجنور الحرة أو التي مصدرها حيواني منها اللحوم و الدواجن و الأسماك التي تحتوي على الفيتامينات (A, E, C)، الأحماض الدهنية كالأوميغا - 3 - الكاروتينويدات وبعض المعادن النادرة كالزنك و السيلينيوم (Larson,R.A.;1988).

• فيتامين C :

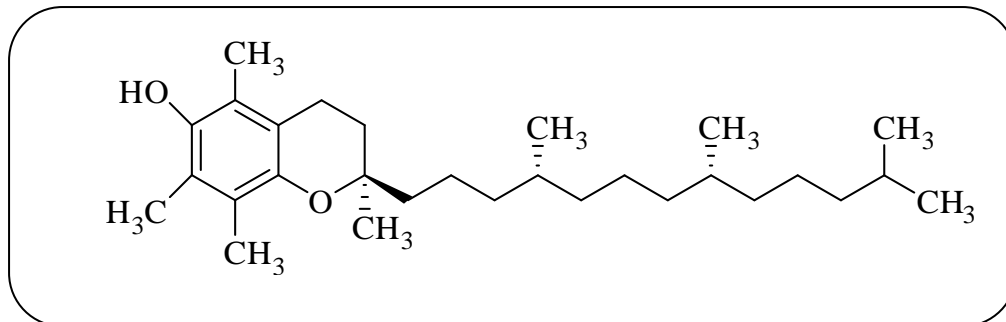
أو ما يسمى حمض الأسكوربيك (Acide ascorbique) من مضادات الأكسدة القطبية القابلة للذوبان في الماء (Hydrophilic)، حيث بفضل نضامه الخارج خلوي يوفر حماية للغشاء الخلوي و ذلك التفاعل مع الجنور الحرة قبل وصولها إلى الغشاء، كذلك حماية مكونات الخلية و المتمثلة في الدهون و البروتينات و DNA و بالتالي يقي الأنسجة الخلوية من الأضرار التأكسدية للعديد من الأمراض كما يمكن أن يعمل كمضاد للأكسدة بتجديد الفيتامين E عن طريق إرجاع التوكوفيرول المتأكسد (Tcophoroxytle) في الأغشية الخلوية إلى (α-Tocopherol) بالإضافة إلى دوره في أمتصاص الحديد، حيث بإمكان أغلب الحيوانات و النباتات تصنيعه لكن الإنسان و عدد قليل من الحيوانات لا تستطيع (شربي، رقية؛2017)، حيث إن نقصه يؤدي إلى داء الأسقربوط (إلتهاب اللثة)، تلف الأوعية الدموية، تورم العظام ويتم الحصول عليه من الحمضيات و البقدونس وخاصة التوت (Pelli.K.and Kyly.M;2003).



الشكل 7: البنية الفيتامين C

• فيتامين E: Tochothreiol و tochophérol

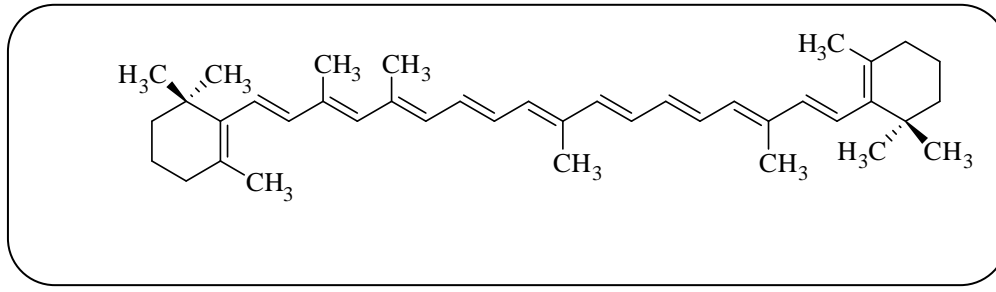
إسمه العلمي توكوفيرول (Tcopherol) (Lehr.H.A.et al;1999) من العناصر الغذائية الهامة (Cham.B.E.et al;1999) حيث يعرف منه حتى الآن حوالي 8 أنواع من المماكبات وهي : 4 توكوفيرولات α (δ - γ - β -Tcophrerols) و 4 توكوترينولات (δ - γ - β -Tocotriennols α) (Tyler Basker.et al;2015) ، وهو عبارة عن مضاد أكسدة يذوب في الدهون ، يتميز بقدرته على إلتقاط الجذور الحرة مثل جذر البيروكسيد الليبيدي و هذا ما يساعد على توقيف الأكسدة الفوقية للبييدات في مرحلتها الأولى (C.G.Jose et al;2016) وحماية الأغشية الخلوية من التلف التأكسدي وبذلك يقلل خطر الإصابة بأمراض السرطان و أمراض القلب الوعائية و تصلب الشرايين خاصة عند المدخنين و ذلك من خلال منع أكسدة البروتينات الدهنية عالية الكثافة و بالتالي منع الكوليسترول من الإلتصاق بجدران الشرايين ، حيث أن هذا الفيتامين يقوم بإقتناص الجذور البيروكسية في الأغشية الخلوية ، كما أن نقصه يؤدي إلى فقر الدم الإنحلالي و إلتهاب الشبكية (Johnson-Dvis.K.L.et al;2009) ويتم الحصول عليه من الزيوت النباتية كذور القمح (Pelli.K.et al;2003).



الشكل 8: البنية فيتامين E

• الكاروتينويدات: Crotenoids

هي عبارة عن صبغات عضوية تيتراإينويدية صفراء اللون، توجد بشكل طبيعي في الخضروات و الفواكه و تكثر في بعضها كالجزرو مثل (β -Caroten) الطماطم و المشمش و غيرها من بانيات الألوان (سحر درويش؛2003) قابلة للذوبان في الدهون (de Quiros.A.R- B.et al;2006)، تكمن الفاعلية المضادة للأكسدة لهذه المركبات بصفة عامة لوجود سلسلة كربونية أليفاتية طويلة حاملة لعدة روابط ثنائية، حيث أن نقصه يؤدي إلى إعتدाम عدسة العين، أمراض القلب و الأوعية الدموية (طارق بولديار؛2008).



الشكل 9: البنية β-كاروتين

- الزنك Zn:

من العناصر المعدنية الضرورية لجسم الإنسان، حيث يدخل في تركيب كثير من الإنزيمات الضرورية للتمثيل الغذائي للكربوهيدرات و البروتينات و الدهون وهو يدخل ضمن مركبات وجدار خلايا الجسم، كما أن نقصه أثناء الطعام يؤدي إلى قصور في النمو (بشرى البشير؛ 2003)

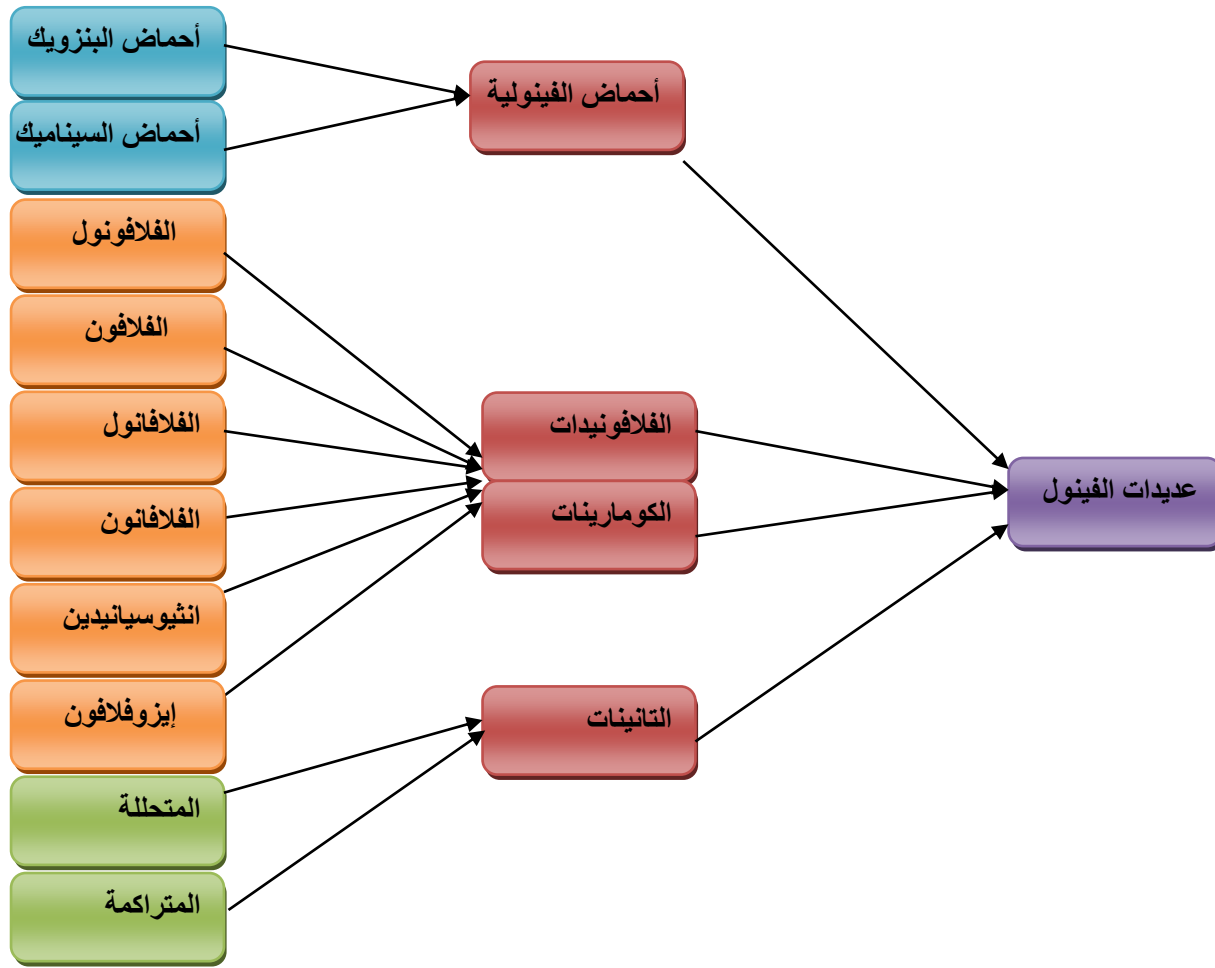
- السيلينيوم Se:

يعد من العناصر المعدنية التي يحتاج إليها جسم الإنسان بكميات ضئيلة، و له فائدة هذا العنصر في أنه مع فيتامين E يكونا مضادات أكسدة دفاعية تقلل من فاعلية المواد السامة و الضارة في الجسم و تقلل الإصابة بأمراض فقدان المناعة. (بشرى البشير؛ 2003)

- المركبات الفينولية:

تعد هذه المجموعة من أهم المركبات النباتية و التي تتمتع بفعالية جد عالية وهي عبارة عن مركبات عطرية أروماتية أيضا ثانوية (Cia.y et al;2004,Wang.J.et al;2009) غير آزوتية لها القابلية على الذوبان في الماء و المذيبات العضوية، حيث تشمل الآلاف من الجزيئات الكيميائية مصنفة إلى عدة تصنيفات حيث تشترك في أنها تملك على الأقل حلقة عطرية واحدة مرتبطة بواحدة أو أكثر من مجاميع الهيدروكسيل أو مستبدلة مع مجموعات أخرى (إيثر، سكر، أستر) إذ أن إسطناعها الحيوي أغلبها ينبع من حمض الشيكيميك (Antonio J.Leon-Gonzàlez et al;2015) وأهم هذه المجموعات المكونة هي الأحماض الفينولية، الفلافونيدات، التانينات. (L.Flohé and F.Ursini;2008)

تعتمد الفعالية المضادة للأكسدة في المركبات الفينولية على ذرة الهيدروجين في المركبات الفينولية و مدى إستقرار الهيكل الفينولي، حيث أن هذه المواد لها القدرة على أسر الجذور الحرة و مخلبة الشوارد المعدنية بالإضافة إلى حماية الأنظمة الداخلية المضادة للأكسدة (أحلام.بوسطلة؛ 2014).



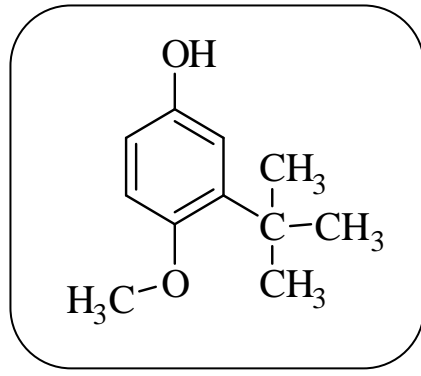
الشكل 10: المركبات الفينولية و مشتقاتها

3.1.1.13.I مضادات الأكسدة الصناعية :

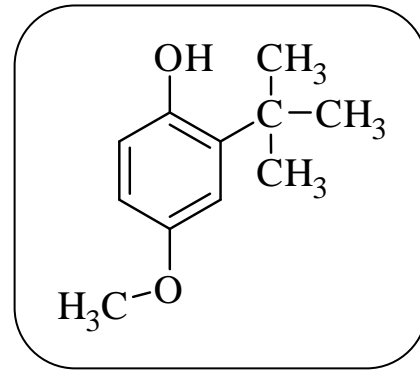
تستخدم مضادات الأكسدة على نطاق واسع كمضادات غذائية نظرا لأدائها العالي، و إنخفاض تكلفتها و إنتشارها الواسع (Xiu- Bara.D,et al;2009) ومؤخرا زاد الإهتمام بمضادات الأكسدة الصناعية لأن هذه المغذيات تعتبر علاجية ووقائية (al;2006) وهناك أربعة أنواع من مضادات الأكسدة الصناعية تستخدم على نطاق واسع في الأطعمة وهي :

• BHA:

اسمه التجاري (Butylate hydroxyanisol) (بن ساسي.شيماء؛2018)، لا يوجد هذا المركب في الطبيعة لكن صنع بطريقة Btulation للمركب (Paramethoxyphenol) (فؤد عبد العزيز الشيخ؛1999 ،دياسل كامل دلالي وآخرون؛ 1981) حيث أن BHA صيغتين هما (-3-tert-butyl-4-hydroxyanisol) و (-2-tert-butyl-4-hydroxyanisol) (بن ساسي.شيماء؛2018) ولكليهما رائحة الفينول (فؤد عبد العزيز الشيخ؛1999) ومن أهم خواص هاذين المركبين هو قدرتهما على المحافظة على قابليتهما كمضاد للأكسدة في الغذاء أثناء التسخين كالقلي مثلا (فؤد عبد العزيز الشيخ؛1999 ،دياسل كامل دلالي وآخرون؛ 1981) لذا فإن من خواص هذا المركب أنه أبيض شمعي له درجة إنصهار منخفضة، يذوب في المذيبات العضوية و الجليسيريدات ولا يذوب في الماء (أ.عاشور أحمد،ع وآخرون؛2006)، له رائحة خاصة تظهر عند إرتفاع درجة حرارته (أ.عاشور أحمد،ع وآخرون؛2006) حيث يسمح إضافته بتركيز لا يزيد عن % 0.02 (Jayathilakan.k.et al;2007,Fritsch.k.et al;1997) و الكمية المسموح بتناولها هي 1mg/kg في اليوم (Crocho.M et al;2013) و صيغته كالتالي:



3-tert-butyl-4-methoxyphenol

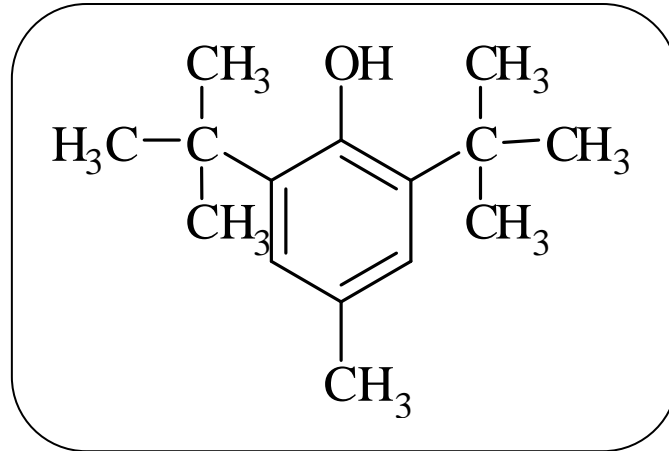


2-tert-butyl-4-methoxyphenol

الشكل 11: البيئة الكيميائية لمركب BHA

• Butyl hydroxy toluéne :(BHT)

من مضادات الأكسدة التي تصنع تجاريا لإستعماله في المنتجات البترولية و المطاط ، و أستعمل بعد ذلك في المنتجات الغذائية (تامة نور الدين؛2018) ، يمتاز بعدم ذوبانيته في الماء (إ.عاشورأحمد،و آخرون؛2006) و يذوب في الدهون و بعض مذيبات قليلة القطبية (Pokorn.J,et al;2001) ، وهو ذو لون أبيض بلوري صلب يعطي اللون الأصفر في الأغذية وله ثباتية في درجات الحرارة العالية وهو أقل كفاءة من BHA ، عديم الرائحة (إ.عاشورأحمد،و آخرون؛2006) حيث يسمح بإضافته بتركيز لا يزيد عن 200ppm للأغذية (فؤاد عبد العزيز الشيخ؛1999) والكمية المسموح تناولها هي 0.25mg/kg في اليوم. (Carocho.M,et al;2013)

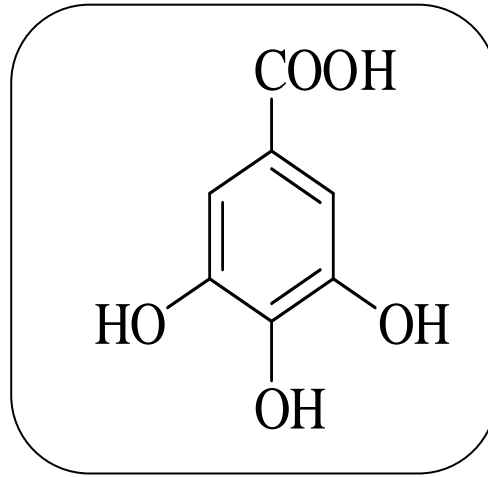


2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol

الشكل 12: البيئة الكيميائية لمركب BHT

• Acide galique :(AG)

يذوب حمض الغاليك في الماء و لكنه قليل الذوبان في الزيوت (إ.عاشور أحمد،و آخرون؛2006)، مضاد للخلايا السرطانية دون الضرر بالخلايا الطبيعية (Lu.Y,Jiahg.F,et al;2010) ، ولأجل السماح باستعمال هذه المواد في الأغذية يجب أن تكون ذات درجة سمية ضعيفة و أن تكون فعالة بتركيز منخفضة و أن لا تضيف نكهة و رائحة و لون غير مرغوب فيه (أل دبليو.ترجمة عادل جورج ساجدي؛1983، د.باسل كامل دالي و آخرون؛1981) .

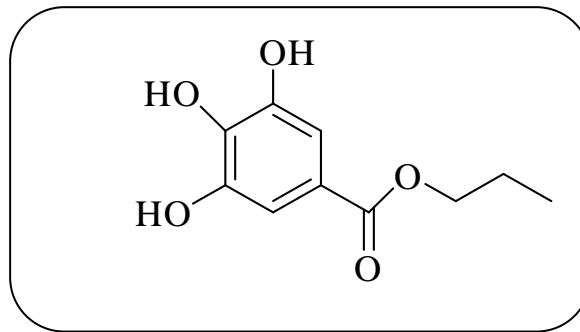


3,4,5-trihydroxybenzoic acid

الشكل 13: البنية الكيميائية لمركب AG

• Propyl galat:(PG)

وهو عبارة عن أستر تشكل من التكتيف لحمض الغالات و بروبانول ، وهذا المضاد للأكسدة يضاف للأطعمة التي تحتوي على زيوت و الدهون لمنع الأكسدة (تامة نور الدين؛2018)، ويتم إستخدامه في الأغذية المصنعة و مستحضرات التجميل **Jacobi.H,et al;1998**) لمنع أكسدة الدهون الغير مشبعة (**Wu.T.W,et al;1994**)، حيث يتم إستخدامه تحت الرقم E_{310} . (**Fritsche.K,et al;1997**)



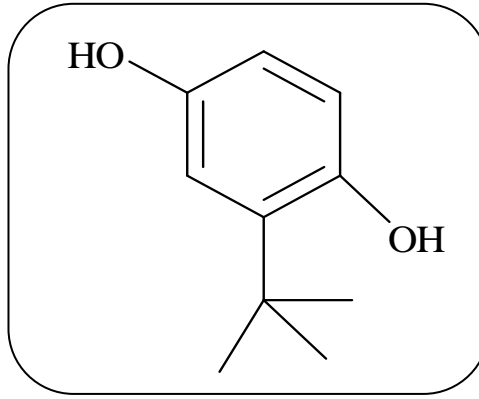
Propyl 3,4,5-trihydroxybenzoate

الشكل 14: البنية الكيميائية لمركب PG

• Hydroquinone tertabutyl :(THBQ)

هو أحد مضادات الأكسدة الفعالة للغاية في الأغذية و يستخدم كمادة حافظة للزيوت النباتية الغير مشبعة و الكثير من الدهون الحيوانية الصالحة للأكل لا يسبب تلون في وجود الحديد، ولا يغير طعم و رائحة المواد المضاف إليها. حيث يضاف إلى مجموعة واسعة من الأطعمة كالأسمك المجمدة و المنتوجات السمكية ميزته الأساسية هو تعزيز حياة التخزين، كما يستخدم صناعيا باعتباره عامل إستقرار لمنع تبلر ذاتي للبيروكسيدات العضوية كما يستخدم في صناعة العطور لخفض معدل التبخر و تسخين الثباتية , حيث يضاف للأطعمة وفقا لأعلى حد (1000mg/kg) وهو يستخدم تجاريا تحت الرقم E_{319} (**جمال عبد العظيم؛**) من خواصه أنه غير قابل

للذوبان في الماء و يذوب في الدهون و الإيثانول و الإيثر وهو مسحوق ذو لون ابيض و رائحة خاصة يتميز بدرجة إنصهار بين 126.5 - 128.5 ودرجة غليان 300°C كما يعتبر من مضادات الأكسدة القوية مقارنة بالمضادات السابقة. **Frank@** (Fengchengroup.com)



Hydroquinone tertabutyl

الشكل 15: البنية الكيميائية لمركب THBQ

2.1.13.I حسب آلية عملها:

تصنف مضادات الأكسدة في هذه الحالة إلى مضادات أكسدة أولية و مضادات أكسدة ثانوية حيث:

• مضادات الأكسدة الأولية: (تفاعلية)

هي المركبات التي تتفاعل مع الجذور الليبيدية (R^\cdot , RO^\cdot , ROO^\cdot) لإنتاج مركبات أكثر إستقرار (ROOH, ROH, RH) بإعتبارها مانحات للبروتون نشطة، حيث أن مشتق الجذر المضاد للأكسدة (A^\cdot) يحول إلى ناتج مشتقر. مثل حمض الأسكوربيك و مشتقاته (Butuariu.M,et al;2012,Devasagayan,et al;2004).

• مضادات الأكسدة الثانوية: (وقائية)

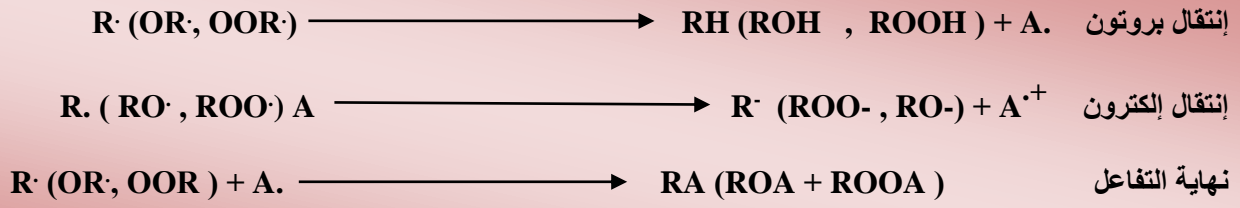
وهي المركبات التي تمنع أو تؤخر أكسدة الدهون في تفاعلات مختلفة كإخماد الأكسجين الأحادي ، إمتصاص الأشعة فوق البنفسجية، تفكك الهيدروبيروكسيد... إلخ (Gordon,M.H;1990).

2.1.13.I آلية عمل مضادات الأكسدة:

تعتبر الخواص البنوية لمضادات الأكسدة من العوامل الأساسية التي تؤثر على فاعليتها المضادة للأكسدة وقد حددت عدة آليات أهمها: (شربي، رقية؛2017)

الإقتناص المباشر للجذور الحرة:

بإمكان مضادات الأكسدة في هذه الحالة منح إلكترون أو بروتون عن طريق إقتناص الجذور الحرة الأكسجينية الحرة (M.Brewer;2012)



• الإتحاد مع الأيونات المعدنية (Cu^+ , Fe^{+2} , Mn^{+2}):

إن تمخبل المعادن الحديد و النحاس يشكل أحد أهم آليات الفاعلية المضادة للأكسدة، حيث يمكن لمضادات الأكسدة (كالفلافونيدات مثلا) أن تتحد مع هذه المعادن و تشكل مركب مخلبي (مقعد) كستقر و بالتالي تساهم في خفض نسبة الجذور الحرة من خلال تثبيط تفاعل Fenton. (M.Brewer;2011)

• تثبيط الإنزيمات:

تتميز المركبات الفينولية و مشتقاتها (فلافونيدات، تانينات) بقدرتها على كبح بعض الإنزيمات من خلال تفاعلات الأكسدة و الإرجاع (Oxydo-reductase)، والتي تنتج خلال دورتها التنشيطية جزيئات جذرية، من أهم هذه الإنزيمات (Xanthine oxidase Cyclooxygenase, Lipooxygenase) (R.Muralikrishma Adibhatla ,et al;1999).

• تجديد مضادات الأكسدة المرتبطة بالغشاء (α -Tocopherol):

إن المركبات الفينولية دور هام في تجديد مضادات الأكسدة مثل: فيتامين E الغشائي، حيث تعمل مضادات الأكسدة مثل فيتامين C على تجديد الفيتامين E من خلال التأكسد وذلك بمنحه ذرة هيدروجين. (M.Brewer;2011)



3.13.I شروط إضافة مضادات الأكسدة:

إن إضافة فائض من مضادات الأكسدة في الغذاء ينتج عنه تسمم، و بالتالي تعرض صحة الإنسان للخطر لهذا وجب مراعاة إضافتها في الأغذية بدقة محدودة (Bara.D,Lahiri,et al;2006) مع مراعاة مايلي:

- ✓ نزع نكهة غير مرغوب فيها (Jayathilakan.k,et al;2007).
- ✓ فعالة بتركيز منخفضة في أنواع كثيرة من الدهون مع مسبة السمية ضعيفة (Newkirk.K.A,et al;1993).

الفصل الثاني:

إختبارات تقييم الفعالية المضادة للأكسدة

II. تمهيد:

حققت الطرق والتقنيات المستخدمة لقياس النشاط المضاد للأكسدة تقدماً ملحوظاً في العقود القليلة الماضية في البحث عن مضادات الأكسدة الطبيعية والفعالة لمكافحة المضاعفات المرضية المرتبطة بالجذور الحرة إذ تلعب فحوصات مضادات الأكسدة دوراً حاسماً في التقييم العالي والفعال من حيث التكلفة لقدرات مضادات الأكسدة للمنتجات الطبيعية مثل النباتات الطبية وعينات الأغذية (Nabeelah Bibi Sadeer;2020)، منها ما كانت تعتمد على كواشف وتجهيزات ونظم آلية، حيث نشرت العديد من الدراسات التي تتناول هذا الميدان أعتمدت فيه على عدة تقنيات مبنية على القياس المباشر و الغير مباشر لسرعة التفاعل و مردوده على أن تفي الطريقة الواحدة بشكل مثالي بالمتطلبات التالية:

- ✓ استخدام مصدر جذري ذات صلة بيولوجية.
- ✓ البساطة (و ذلك بإمكانية تحديد ما يمكن من تبسيط و تحليل النتائج كتحديد نقطة النهاية و الآلية الكيميائية).
- ✓ التوفر المخبري للمواد الكيميائية والأجهزة المطلوبة.
- ✓ قابلية التكيف لتقدير كل مضادات الأكسدة الحبة للماء و الدهون و الجذور من مصادر مختلفة (Irina Georgiana, Munteanu.et al;2021)

ومع ذلك فقد أعرب العديد من الباحثين عن مخاوفهم بشأن موثوقية الفحوصات الموجودة في المختب ، حيث تنشأ مثل هذه المخاوف بشكل رئيسي من الارتباط الضعيف بين النتائج في المختبر وداخل الجسم الحي، وحتى الآن يتم قياس النشاط المضادة للأكسدة باستخدام لائحة من المقاييسات حيث لكل مقاييسة مزاياها ومحدودياتها و من خلال ما سبق يتم أيضاً تناول الأسئلة التالية:

1. ما الذي يجعل فحوصات مضادات الأكسدة ملونة؟
2. ما هو سبب العمل بطول موجي معين؟
3. ما هي مزايا وقيود كل اختبار؟
4. لماذا لوحظ لون معين في التفاعلات الكيميائية المضادة للأكسدة والأكسدة؟

علاوة على ذلك، توضح هذه الدراسة الآلية الكيميائية للتفاعلات التي تحدث في كل اختبار مع شريط ملون لتوضيح التغييرات في

اللون (Nabeelah Bibi Sadeer et al;2020) .

1.II لماذا تظهر إختبارات مضادات الاكسدة ملونة ؟

إن ظهور اللون هو ناتج عن التفاعلات بين الذرات و الجزيئات و الذي يعد مؤشرا عن الخصائص الفيزيائية للمواد الكيميائية على المستوى الذري، حيث يؤدي التغيير في الإنتقالات الإلكترونية إلى تغيير في الضوء الذي تمتصه الجزيئات، إذ يرجع تشكل المعقدات الملونة في الإختبارات مضادات الأكسدة إلى الإنتقال الإلكتروني فيها و كتنفسير آخر إن إتحاد جزيئين مختلفين أو أكثر ينتج عنه نقلا للشحنة أو الشحن الإلكترونية بين(الجذور الحرة و مضادات الاكسدة) مما ينتج عنه قوة جذب إلكتروناتية مما يوفر قوة إستقرار للمعقد (Nabeelah Bibi Sadeer et al;2020) .

2.II ما هو سبب العمل بطول موجي معين؟

بعد تلقي الإلكترون تدخل العديد من المركبات في حالة إثارة الناتجة عن إنتقال الإلكترون من مستوى طاقي أولي إلى مستوى طاقي أعلى في المنطقة المرئية من الطيف الكهرومغناطيسي، مما يؤدي إلى تكوين مركبات ملونة بشكل مكثف، و يكون الطول الموجي المجال مميز من حيث الأنواع المتبرعة و المستقبلة للإلكترون و التي يتم التعبير عنهم بقوة المتبرع بالإلكترون و قوة قبول الإلكترون بمعادلة رياضية التالية:

$$\Delta E = E_A - E_I + J$$

حيث أن:

(E_A): الألفة الإلكترونية

(E_I): طاقة التأين

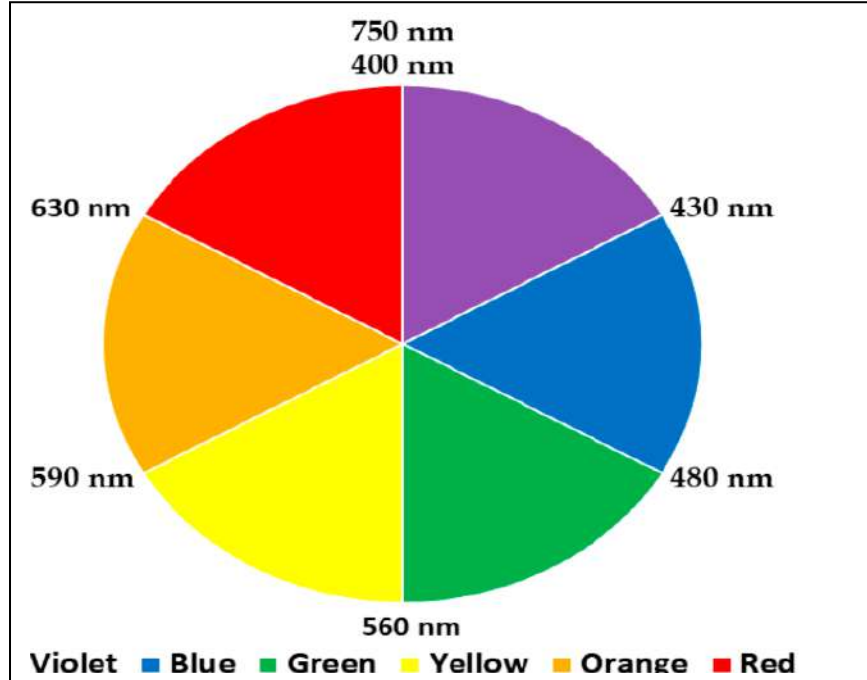
(J): قوة الجذب الإلكترونيستاتيكية

(ΔE): فرق في الطاقة

و الجدير بالذكر أن الاختلاف في الطاقة يرتبط مباشرة بمجال الإنتقال الشحني الذي يكون محدد في طيف كهرومغناطيسي و هذا ما يفسر أهمية العمل عند طول موجي معين. (Nabeelah Bibi Sadeer et al;2020)

3.II لماذا يتم ملاحظة لون معين في تفاعل كيميائي مضاد للأكسدة؟

إن الضوء عبارة عن مزيج من الألوان حيث تتكون في المنطقة المرئية من الطيف الكهرومغناطيسي من ألون مختلفة وهي: الأحمر و البرتقالي و الأصفر و الأخضر و الأزرق و البنفسجي و التي تغطي طول موجي في حدود 400 nm إلى 750 nm كما تمثلها ألوان القرص في الشكل 16، حيث عندما يمتص جزئي ما الضوء عند طول موجي معين، فإن اللون الذي يظهر هو اللون التكميلي (أو القريب) من الطول الموجي المحدد على قرص الألوان (Nabeelah Bibi Sadeer et al;2020).



الشكل 16: قرص طيف الألوان

4.II الأساليب المختلفة المستخدمة لقياس النشاط المضاد للأكسدة:

هناك العديد من التقنيات التحليلية المتاحة لقياس خاصية مضادات الأكسدة للعينات، و التي تم تصنيفها إلى ثلاث فئات رئيسية، وهي القياس الطيفي، والتقنية الكهروكيميائية، والكروماتوغرافيا (اللونية) و مع ذلك سنتم مناقشة الصنف الأول

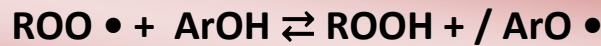
و الثاني بإعتبارها أكثر الطرق التي يمكن الوصول إليها و الأكثر إستخداما لتقييم الأنشطة المضادة للأكسدة للعينات النباتية و البيولوجية (Nabeela h Bibi Sadeer et al;2020).

5.II الإختبارات الكيميائية (الطيفية) لتحديد نشاط مضادات الأكسدة:

وفقا للتفاعلات الكيميائية التي قد تتضمنها فحوصات المضادات للأكسدة، أمكن تقسيمها إلى ثلاث فئات رئيسية :

1.5.II الإختبارات المبنية على أساس إنتقال ذرة الهيدروجين (HAT_{Hydrogen Atom Transfer}):

يقيس هذا النوع من الإختبارات قدرة أحد مضادات الأكسدة على إزالة الجذور الحرة عن طريق إعطاء ذرة هيدروجين، حيث أن آليات عمل (HAT) تثبت عمل مضادات الأكسدة عن طريق نقل ذرة (H) من الفينول (ArOH) إلى جذور البيروكسيل وفق الآلية التالية:



(Apak, R.et al; F;2018).

حيث يتميز $ArO \bullet$ بإستقراريته الأكبر مقارنة $ROO \bullet$ ، كما يعمل على المشاركة في تفاعلات المتتالية للسلاسل الإضافية. ومن بعض الأمثلة النموذجية للاختبارات المستندة إلى إنتقال ذرة الهيدروجين هي قدرة امتصاص الأكسجين الجذري (ORAC)، إجمالي معامل مقاومة الأكسدة إفتناص للجذور البيروكسيلية (TRAP) (Çekiç, S.D.; Çetinkaya, A.; Avan, A.N.; Apak, R;2013).

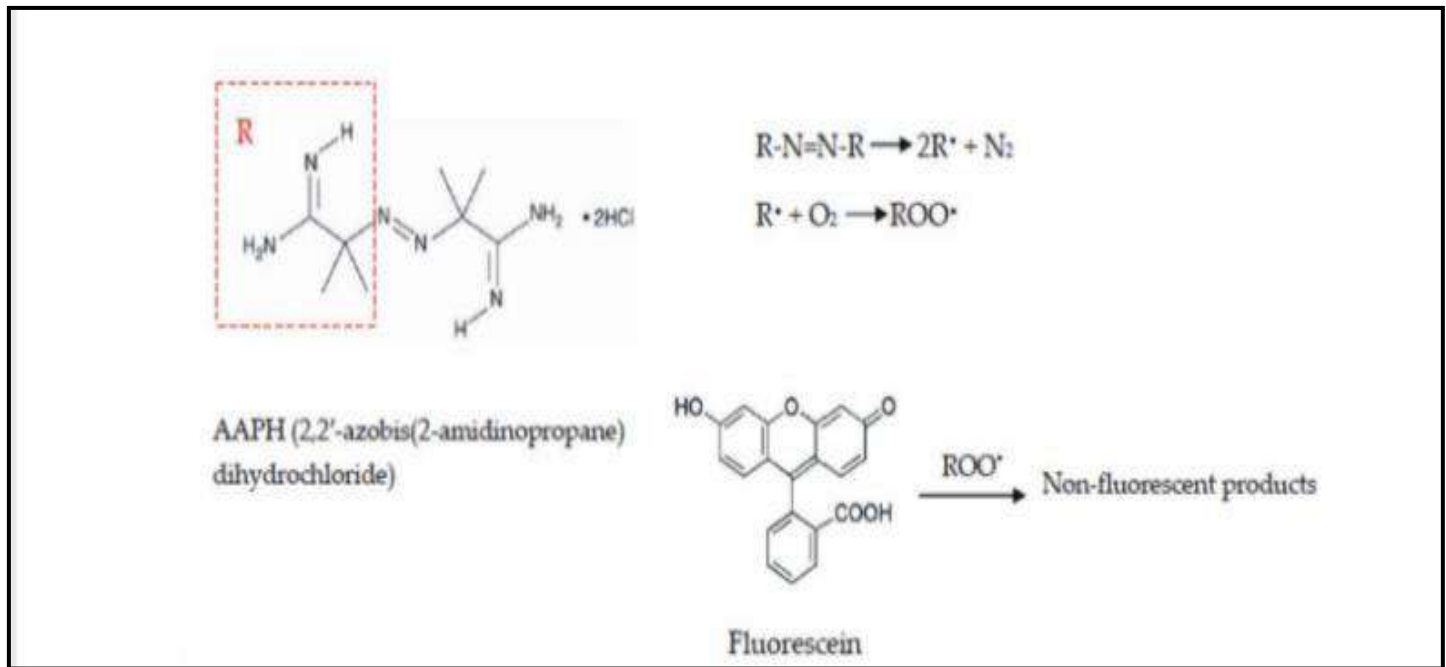
1.1.5.II إختبار تقدير إجمالي محاصرة الجذور الحرة: (TRAP) Total Peroxyl Radical Trapping Antioxidant Parameter assay

هو واحد من أقدم الطرق المستخدمة لقياس التقدير الكمي لمضادات الأكسدة في بلازما الدم أو الأمصال و التي أقتُرحت من قبل (Wayner et al;1985)، يقوم اختبار TRAP على الحماية التي توفرها مضادات الأكسدة ضد المركبات الجذرية المتولدة من التحليل الحراري لأحد مركبات الأزو على اضمحلال المركب الفلوري (المسبار المستهدف) حيث يعتمد مراقبة كل تلك المواد المتفاعلة عن طريق قياس الأكسجين المستهلك أثناء التفاعل على سطح قطب الأكسجين، يتضمن هذا إختبار في بدء عملية الأكسدة لتوليد جذور البيروكسيل القابلة للذوبان في الماء و حساسة لجميع مضادات الأكسدة التي تكسر تفاعلات السلاسل الجذرية (Prior et al. 2005)، حيث تسمح هذه الطريقة بالتحديد الكمي لمضادات الأكسدة على وجه التحديد تجاه ثلاث مؤكسدات وهي (جذور الهيدروكسيل، جذور البيروكسيل و جذور البيروكسينيتريت) (Regoli and Winston; 1999) . واحدة من كبرى مشاكل اختبار TRAP الأصلي تكمن في الاستخدام من قطب الأكسجين ككاشف، لأنه قد لا يحافظ على استقراره خلال المدة الزمنية المطلوبة (Rice-Evans and Miller;1996) إذ جرت العديد من التحسينات في هذا الإختبار بإستخدام مجموعة واسعة من العينات البادئة في التفاعل مثل (AAPH، ABAP، Peroxidise) و (وفلورسين، ثنائي هيدروفلوريسين ثنائي أسيتات DCFH-DA، و Liminoll) كمركبات ناهية للتفاعل (Lissi, E.et al;1995) .

2.1.5.II إختبار قدرة امتصاص الأكسجين الجذري (ORAC): Oxygen Radical Absorption Capacity assay

تعد قدرة امتصاص جذور الأكسجين (ORAC) من الإختبارات الحديثة المثيرة التي يمكن الاستفادة منه لاختبار قوة مضادات الأكسدة للأغذية والمواد الكيميائية الأخرى (Alam, M.N.et al;2013) ، و التي تم إقتراحها من طرف (Coa et

(al;1993) هذا الإختبار يقيس قدرة كسر السلسلة الجذرية لمضادات الأكسدة من خلال مراقبة تثبيط الأكسدة الناتجة عن جذور البيروكسيل (ROO[•]) باعتبارها من أكثر الجذور التي تسود في أكسدة الدهون في الأنظمة البيولوجية وكذلك في المواد الغذائية في الظروف الفيسيولوجية (Irina Georgiana Munteanu;2021) حيث يصف هذا الإختبار قدرة المادة الفلورنسية في الحفاظ على وميضها الضوئي وذلك من خلال المنافسة بين المركبات المضادة للأكسدة (القدرة على التبرع بذرة الهيدروجين) (Huang, D.et al;2005) لتثبيط عمل جذور البيروكسيل في التأثير على شدة الوميض (Remmlt van der werf;2013)، (وهي عبارة عن مركبات كيميائية تتمتع بخاصية الوميض و التألّق مثل β-phycoerythrin أو fluorescein أو dichlorofluorescein الأكثر إستخداما مؤخرا كونه أقل تفاعلا وأكثر إستقرار (Ou et al. 2001)). نتيجة لذلك، يتم إستعمال مولدات جذور البيروكسيل شائعة الاستخدام في هذا الإختبار بواسطة مركبات الأزو(جزيئات كروموفورية أي حاملات اللون) منها المحبة للدهون مثل α,α,-azobisisobutyronitril (AIBN) أو 2,2azobis(2-amidinopropane)chlorhydrate (ABAP) و منها المحبة للماء 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) (Becker, E.M.; Nissen, L.R.; Skibsted, L.H;2004) المتولدة من التحلل الحراري في وجود الأكسجين لأحد هذه المركبات وفق التفاعل الممثل في شكل 17



الشكل 17: آلية عمل إختبار ORAC

حيث ترتبط حركية التحلل التأكسدي لجزيئ الفلورسنت إرتباطا مباشرا بتفاعل تركيز الجذور الحرة في الوسط و ذلك بعد إضافة مولد الجذور الحرة (Remmlt van der werf;2013) وفقاً لهذا الإختبار، يتفاعل شق البيروكسيل المنبعث من المولد مع عينة الفلورسنت التي تؤدي إلى فقدان التألّق المسجل على مقياس التألّق بمرور الزمن، تستخدم هذه الطريقة في وجود مضادات الأكسدة وغيابها. كمركب مرجعي، يتم استخدام أحد مضادات الأكسدة القياسية، عادةً trolox، ويتم وصف قيم ORAC لمضادات الأكسدة التي تم تقييمها على أنها مكافئة لـ trolox (Huang, D.et al;2005) .

الميزة الرئيسية لهذه الطريقة أن لها القدرة على تقييم حركية المركبات الفعالة المضادة للأكسدة إذ تسمح على وجه الخصوص باكتشاف زمن عمل هذه الأخيرة، حيث تعتبر هذه النقطة مثيرة للإهتمام بشكل خاص لدراسة المستحضرات النباتية، الأغذية أو المكملات الغذائية التي تحتوي على أكثر من مضادات أكسدة سريعة الإستجابة أو بطيئة الإستجابة والتي يصعب التنبؤ بها بسبب تأثيراتها المشتركة كما أنها طريقة حساسة جدا ومتكيفة مع مركبات المحبة للماء والدهون (CQV.B;2008).

ولهذه الطريقة أيضا سلبيات في أنها تقيس نشاط المضاد للأكسدة لجذور البيروكسيل فقط وتتجاهل الجذور الفيسيولوجية الأخرى (CQV.B;2008).

1.2.1.5.II المنهجية العامة لإستخدام إختبار ORAC مخبرياً: (Prior. et al; 2003)

• الكواشف والمواد المستعملة في الإختبار:

✓ 2,2'-azobis-2-amidinopropane dihydrochloride (AAPH or ABAP)

✓ Fluorescein

✓ Sodium phosphate dibasic (Na₂HPO₄)

✓ Sodium phosphate monobasic (NaH₂PO₄)

✓ 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox)

✓ Cary Eclipse Fluorescence spectrophotometer

• تحضير الكاشف والعينة للدراسة:

✓ تحضير محلول موقى فوسفات: صنع محلول الموقى فوسفات (75mM) (PH =7.4) بواسطة إذابة (1.58g) من (NaH₂PO₄) و (8.78g) من (Na₂HPO₄) في الماء المقطر ويصل إلى (1L).

✓ تحضير محلول Trolox القياسي: كمضاد أكسدة قياسي ذو تركيز (100μM) مذاب في المحلول الموقى وتخزينه عند 51°C والذي يكون مستقر في مثل هذه الظروف لعدة أشهر.

✓ تحضير المادة الفلورونسية: ذو تركيز (1mM) بإضافة حجم معين من Phosphat buffer المحضرة مسبقاً والتي

تم تمديدها للحصول على تركيز (4.19×10⁻³) وتخزينه في الضلام عند درجة حرارة 4°C .

✓ تحضير المولد الجذري (AAPH or ABAP): عن طريق إذابة (0.414g) من AAPH على سبيل المثال

من (10ml) Phosphat buffer ، يتم حضنها في حمام جليدي وفي الضلام، حيث يتم إستعماله مباشرة والتخلص منه فور الانتهاء من التجربة.

✓ تحضير العينة المدروسة: يتم تحضير مستخلص العينة وتخفيفها في محلول Phosphat buffer بنسب متفاوتة الأحجام من أجل الحصول على القراءات في نطاق المنحنى القياسي.

• البروتوكول التجريبي والتحليل الرياضي:

✓ تم أخذ (2.25ml) من محلول الفلورسين في خلية الجهاز تمت إضافة (375μL) من المحلول القياسي.

✓ تم تقليب الخليط بشكل مستمر باستخدام محرك مغناطيسي بعد ذلك يحضن لمدة 10 دقائق عند 37°C.

✓ هذه خطوة مهمة لأن إختبار ORAC حساس لدرجة الحرارة.

✓ بعد الحضنة، تتم إضافة (375μL) من AAPH بسرعة في الخلية ويتم قياس التآلق بعد كل دقيقة لمدة 70 دقيقة تقريباً حتى يتم قياساً لإنخفاض.

✓ بنفس الطريقة التي تم بها تحضير المحلول القياسي يحضر كذلك محلول يحتوي على مستخلص العينة.

✓ يتم تحضير عينة فارغة (أي بدون عينة) بنفس الخطوات السابقة.

✓ تتم جمع القراءات المعطاة من جهاز Cary Eclipse Fluorescence spectrophotometer.

✓ بعد رسم المنحنى المعطى لكل من المحلول القياسي و العينة و العينة الفارغة و يتم حساب قيم ORAC وفق المعادلة التالية :

$$AUC=[0.5 +f_1/f_0 +f_2/f_0 +f_3/f_0.....0.5(f_n/f_0)]$$

حيث:

f_0 : التآلق عن الزمن $t=0$

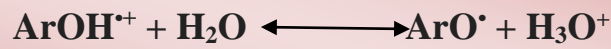
f_n : التآلق عند الزمن $t=n$

بعد حساب لكل منها يتم حساب التآلق النسبي وفق المعادلة التالية:

$$AUC = AUC_{\text{Sample/trolox}} - AUC_{\text{blank}}$$

2.5.II الإختبارات المبنية على أساس الإنتقال الإلكتروني الأحادي (SET Single Electron Transfer):

والتي تكشف عن قدرة مضادات الأكسدة على إنتقال الإلكترون واحد من أجل تخفيض الأيونات المعدنية ومجموعات الكربونيل والجذور الحرة (Wright, J.S.et al;2001)، حيث يمكن تليخيص آليات مجموعة عمل مضادات الأكسدة لهذا النوع بالتفاعلات التالية:



(Irina, Georgiana,et al;2021)

يعتمد التفاعل النسبي في طرق الإنتقال الإلكتروني الأحادي بشكل أساسي على إمكانية نزع البروتون والتأين للمجموعة الوظيفية التفاعلية، لذلك، تعتمد تفاعلات الإنتقال الإلكتروني الأحادي على الرقم الهيدروجيني (Apak, R.et al;2016) ومن الأمثلة النموذجية للاختبارات المستندة إليها:

II. 1.2.5 إختبارات تقليل مضادات الأكسدة المحتملة

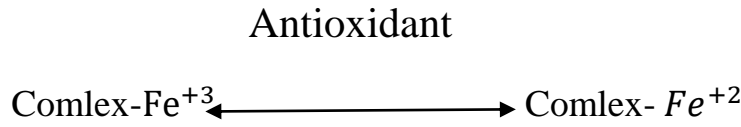
من المعلوم أنه يمكن لمضادات الأكسدة أن تثبت الجذور عن طريق إعطاء الإلكترونات، حيث يتضمن هذا النوع من إختبارامضادات الأكسدة إمكانية الاختزال للمعادن الانتقالية، وهي الحديد (Fe) والنحاس (Cu). فمن المعلوم أن هناك عدم يقين فيما يتعلق بدور مضادات الأكسدة تجاه الجذور الحرة في وجود أيونات المعادن، وبالتحديد (Cu^{+2}) و (Fe^{+2}). بإعتبار أن دور مضادات الأكسدة غير مؤكد في وجود هذه الأيونات المعدنية لأنه لا يزال من غير الواضح ما إذا كان مضادات الأكسدة سوف تثبت الجذور الحرة أو تتخلص من أيونات المعادن (Apak, R K.et al;2005)، بالإضافة إلى ذلك قد يكون من الصعب العمل مع الجذور الملونة مشكلة ، حيث يصعب تكوينها، إضافة إلى صعوبة الحفاظ على استقرارها وكتفسير أدق لا يمكن تقييم قدرة مضادات الأكسدة لعينة بيولوجية بإختبار واحدة ، حيث لا يتم أخذ العديد من العوامل في الاعتبار. سنناقش كل إختبار بمزيد من التفصيل فيما يلي:

II.1.1.2.5 إختبار تقليل القدرة الإرجاعية للحديدك:FRAP Ferric Ion Reducing Antioxidant Power (FRAP)

تم إقتراح هذه التجربة من قبل (Benzie and strain) عام 1996، والتي تم تطبيقها بشكل واسع في علوم التغذية حيث أستخدمت لإكتشاف إمتصاص مضادات الأكسدة من الأغذية خاصة الخاضعة لتأثير المعالجة و ممارسات الطهي التي تؤثر على مستوى مضادات

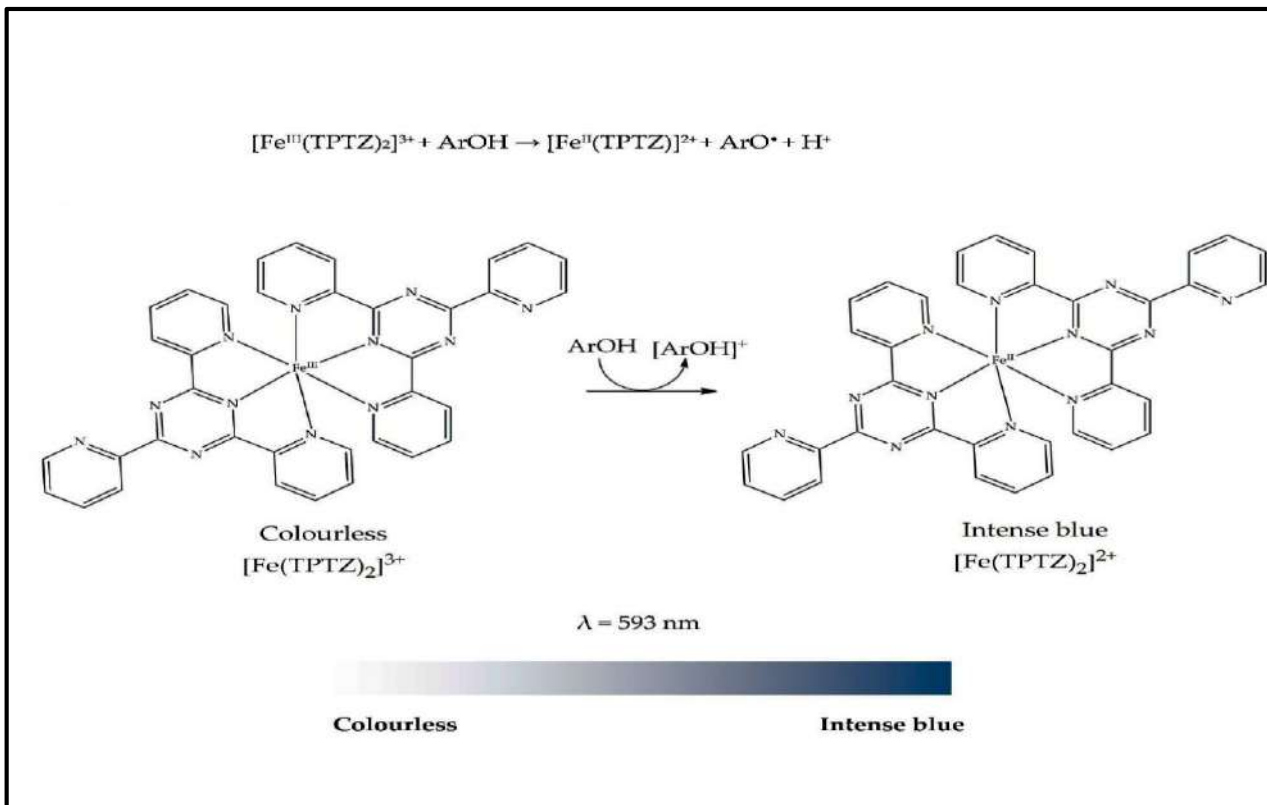
الأكسدة القابلة للتغيير كما أستخدمت أيضا كجزء من نظام مراقبة الجودة في الأغذية الزراعية لتقييم إختلاف التأثير الجيني ظروف النمو و التخزين على إجمالي مضادات الأكسدة (Ou B. at al;2002,Chen T-S et al;2010).

تعتمد طريقة FRAP على إرجاع المعقد الملحي للحديدك (Complex-Fe⁺³)، مكونا معقدا حديديا ذي اللون الأزرق القاتم (Comlex-Fe⁺²) عند PH حمضية في وجود مضادات الاكسدة و التي يتم تحديد نشاطها كزيادة في الإمتصاصية عند 593nm كما هو موضح بالشكل التالي: (Benzie, I.F.; Strain,J.J;1996)



يقوم إختبار FRAP على أنواع مختلفة من الكواشف لتشكيل معقد مع أيون Fe⁺³ منها Ferrozine لتقدير القدرة الإرجاعية لحمض الأسكوربيك (Molina-Diaz ,A;1998)، حيث أن مركب tripyridyltriazine (TPTZ) الأكثر إستخداما، و في الآونة الأخيرة كما تم إستخدام مركب فيريسبانيد البوتاسيوم و الذي يعتبر نوع آخر من إختبار FRAP (Irina Georgiana Muntean,et al;2021)

حيث تبلغ إمكانات الأكسدة و الإختزال لأيون الحديدك (0.70)، وهو ما يمكن مقارنتها أحيانا بإمكانية الأكسدة و الإختزال لإختبار ABTS (0.68Volt)، إلا أنه وجد في دراسة قام بها (Huang et al;2005) أين وجدوا أن نقطة الأختلاف بين الإختبارين تكمن في درجة الحموضة المختلفة لكل فحص، و مع ذلك فإن هذا الإختبار غير محدد لأنه إذا كان أي نوع موجود في خليط يمتلك إمكانية إختزال أقل من تلك الموجودة في Fe⁺³ (0.70vt) فستكون تلك الأنواع مسؤولة على تقليل المعقد ³⁺[Fe^{III}(TPTZ)₂] مثلما يؤدي إلى خطأ في النتائج (Benzie, I.F.et al;1996)، لذا من الضروري أثناء تحضير إختبار FRAP إضافة الكواشف بترتيب معين كإضافة الأسيئات ثم FeCl₃ و أخيرا إضافة TPTZ لمنع إختزال FeCl₃ بواسطة TPTZ (Nabeelah Bibi Sadeer et al;2020).



الشكل 18: آلية تشكل المعقد (Fe⁺³/Fe⁺²-TPTZ) و التفاعل مع مضادات الأكسدة

كما يتضمن هذا الإختبار بعض النقائص أو النقاط المحدودة المتمثلة في:

✓ تعتمد آليته على SET فقط و بالتالي لا يكشف عن نشاط مضادات الأكسدة التي تعمل وفق الآلية HAT

(M.Ali,Aboudzadech;2020).

✓ كغيره من بعض الفحوصات المخبرية و التي تحيد على القياس في الوسط البيولوجي كما أنه لا يقيس مضادات الأكسدة الانزيمية .

✓ لا يعد مقياسا لمعدن إنتقائي أو نشاط تمخبل الأيونات إذ أن إحتمالية أي مادة ممخبله للحديد في عينة مدروسة قد تعمل على تجريد الحديد من الكاشف، مثل هذا التأثير من شأنه أن يؤدي إلى الحصول على قيم FRAP بشكل خاطئ تماما.

✓ ثبوتية وقت التفاعل الموصى به حيث لا يعد إختبار نقطة نهاية حقيقي لمثل بعض مضادات الأكسدة المختزلة قد تستمر مستقلباتها في التفاعل ببطئ شديد حت بعد فترة 4 دقائق.

✓ لا يمكن إستخدامه لتحديد مضادات الأكسدة الحاوية على مركبات thiol و الكاروتينويدات ذات المجموعات المؤكسدة لان لها القابلية على التفاعل مع Fe^{+2} .

1.1.1.2.5.II المنهجية العامة لإستعمال FRAP مخبريا :

• الكواشف والمواد المستخدمة في الإختبار: (Pulido et al. 2000)

✓ Ferric chloride($FeCl_3$)

✓ 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ)

✓ hydrochloric acid (HCl)

✓ acid acetic (CH_3COOH)

✓ sodium acetate (CH_3COONa)

• تحضير كاشف FRAP:

يتم تحضير كاشف FRAP عن طريق عن طريق مزج (0.3M) من (CH_3COOH) ذو (PH=3.6) و(10 mM) من (TPTZ) في (40mM) من (HCl) و (20mM) ($FeCl_3$) (Zengin,G.et al;2015) .

• تحضير العينة المدروسة والقراءة الطيفية:

يتم إضافة (0.1ml) من محلول العينة إلى (2ml) من محلول الكاشف المحضر مسبقا، حيث يوضع في مكان مضلم مدة 30 دقيقة في درجة حرارة الغرفة.

بعدها تتم قراءة عينة الامتصاص عند 593nm. يمكن التعبير عن نشاط FRAP كمكافئات لـ Trolox أو حمض الغاليك أو حمض الأسكوربيك أو كيرسيتين أو ألفا توكوفيرول و التعبير عن النسبة المئوية للتثبيط وفق المعادلة التالية:

$$I\% = [(A_{control} - A_{Extrait})/A_{control}] * 100$$

(Zengin,G.et al;2015)

2.1.1.2.5.II إختبار تقليل أيونات الحديدك (فيرسيانيد البوتاسيوم): Potassium Ferricyanide Assay

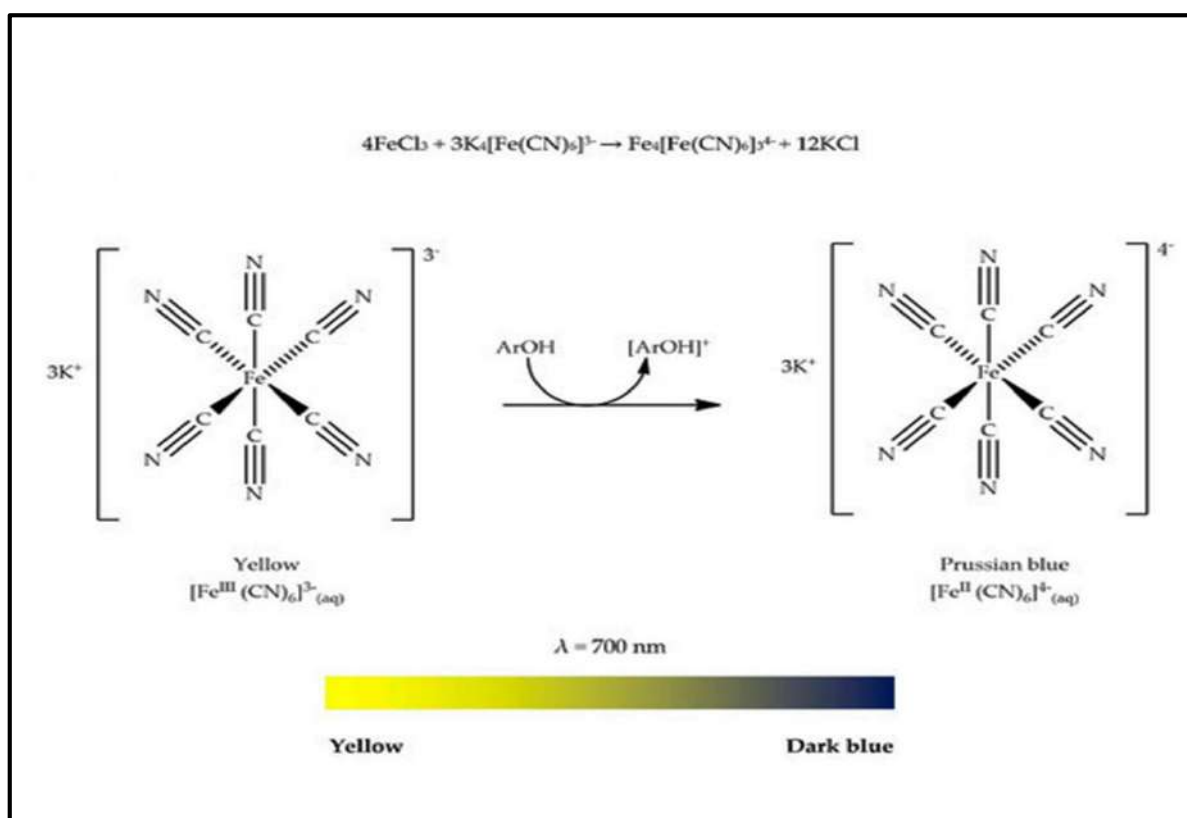
إختبار فيرسيانيد البوتاسيوم الذي تم إكتشافه من قبل (Ariyama and Shaffer) في عام 1928 و تنفيذه لدراسة معدل

أكسدة السكر حيث تم تطويره لاحقا لتحليل نسبة السكر في الدم (Shaffer, P;1935).

تعد هذه الطريقة نوع آخر من طريقة FRAP التي تقوم على أساس اختزال (Fe³⁺) إلى (Fe²⁺)، وعادة ما يتم اختصاره ك-PFRAP. يمكن استخدامه لقياس القدرة المخفضة لمضادات الاكسدة، بالإضافة إلى ذلك له العديد من الاستخدامات الأخرى مثل تحديد السكريات المختزلة في النباتات (Prado, F.et al;1998) وتحديد هيدروكلوريد الدوبامين في عينات المصل أو الأدوية (Guo, L.et al;2009) وتقدير الصوديوم برفاستاتين (Al-Badr, A.et al;2014).

من الجدير بالذكر أن هذا الإختبار يمكن أن يشكل معقدات ملونة مختلفة عند تفاعل العينة المعنية مع فيرسيانيد البوتاسيوم الثلاثي على سبيل المثال، عند تحديد عقار برفاستاتين الصوديوم، يتم تكوين مركب كروموجيني أخضر اللون، والذي يُظهر أقصى امتصاص عند 737nm (Al-Badr, A.et al;2014). ومع ذلك، عند تحديد هيدروكلوريد الدوبامين، يتم تكوين مركب أزرق قاتم، يظهر أقصى امتصاص عند 735nm (Guo, L.et al;2009). وبالتالي، يمكن القول أن لون الكروموجين المتكون في إختبار مضادات الأكسدة هذا يعتمد على نوع العينة المدروسة (Nabeelah Bibi Sadeer et al;2020).

المركب الكيميائي فيرسيانيد البوتاسيوم ذو الصيغة الكيميائية (3K⁺ [Fe (CN)₆]³⁻) هو عبارة عن ملح ذو لون أحمر فاتح الناتج من التحولات الإلكترونية الخاصة به كما هو موضح في الشكل التالي:

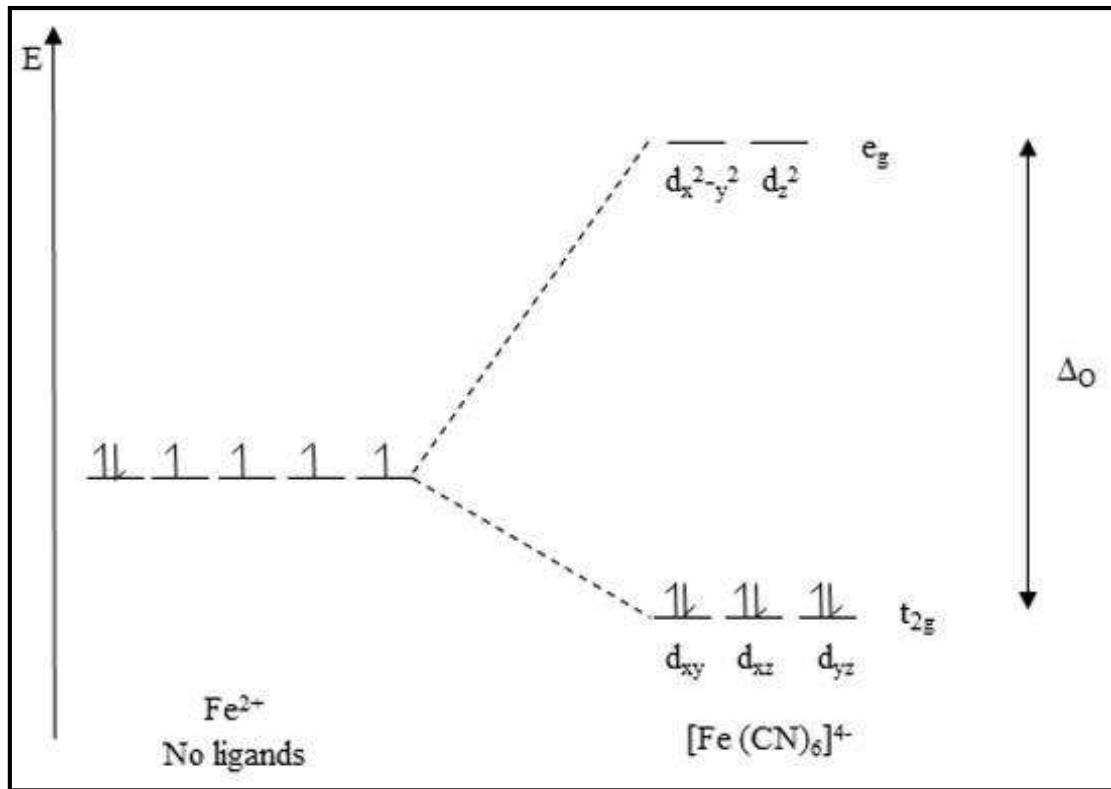


الشكل 19: آلية التفاعل لإختبار فيرسيانيد البوتاسيوم

حيث يعزى تسمية هذا النوع من المركبات بمركبات التناسقية وهي جزيئات تحتوي على روابط تساهمية بين أيون معدني انتقالي وواحد أو أكثر من الروابط، تتشكل هذه الروابط التساندية عندما يعمل أيون المعدن كحمض لويس (متقبل زوج الإلكترون) وتعمل الروابط كقواعد لويس (مانحة زوج إلكترون). تتشكل الرابطة التساندية عندما يتداخل المدار الجزيئي الذي يتكون من زوج وحيد من الإلكترونات الموجودة على الترابط مع مدارات d لأيون المعدني. هذه المدارات d هي المدارات الحدودية للمركبات المعدنية الانتقالية، حيث ترتبط العديد من الخصائص الفيزيائية لمركبات التنسيق (أو المجمعات)، مثل اللون والشكل والتفاعلية والاستقرار، يشغل الإلكترون لمدارات d لأيون الفلز. نظرية المجال البلوري (CFT) هي أبسط نموذج

لشرح بنية وخصائص المجمعات المعدنية الانتقالية. يركز CFT على تفاعل خمسة مدارات من أيون المعدن الانتقالي مع الروابط المحيطة به. وفقاً لـ CFT، حيث يتم تكوين مجمع ثماني السطوح بسبب التفاعل الكهروستاتيكي لأيون المعدن الانتقالي مع ستة روابط سالبة الشحنة. لفهم CFT بوضوح، يجب أن نعرف أنه في حالة عدم وجود روابط، فإن هذه المدارات الخمسة تكون في نفس مستوى الطاقة. ومع ذلك، عندما يكون أيون المعدن على مقربة من الروابط، فإن تلك المدارات d سوف تنقسم إلى مجموعتين من مستويات الطاقة المختلفة، بسبب التنافر الذي تسببه روابط هذه المدارات، حيث يكون لها مداريان ($d_{x^2-y^2}$ - d_{z^2}) عند مستوى طاقة أعلى من المدارات الثلاثة الأخرى (d_{xy} ، d_{xz} ، d_{yz}). يُشار إلى فرق الطاقة بين المدارات على سبيل المثال على أنها (ΔO) ، كما هو موضح في الشكل 20. ويعتمد فرق الطاقة على طبيعة الروابط المشكلة، في حالة فيري سيانيد البوتاسيوم، يعتبر السيانيد ($-CN$) المسبب لهذا الانقسام الكبيراً، إذ تزداد قيمة ΔO مع زيادة حالة أكسدة أيون المعدن، لكن في هذا الاختبار، يتم إرجاع (Fe^{+3}) إلى (Fe^{+2}) . وبالتالي، أي يتم إنخفاض في الطاقة (ΔO) و التي تكون مرتبطة بالطول الموجي بالمعادلة التالية: $E (\Delta O) = hc / \lambda$ ، حيث h هو ثابت بلانك و c هي سرعة الضوء (Nabeelah

. Bibi Sadeer et al;2020)



الشكل 20: اتحاد إلكترونات المدار للفلز Fe مع الروابط CN

يُقرأ الحديد الثنائي المخفض عند 700nm وهذا ما يبرهن الفرق في إختبار FRAP ذو الإمتصاص 593nm، يعني أنه يتم امتصاص فوتون بطول موجة 700 nm، مما يعزز إلكترونًا من إلى مدار مثل t_{2g} و يجعل (Fe^{+2}) . يدخل في حالة إثارة (غير مستقرة). عندما يعود الإلكترون إلى حالته (مستقرة)، فإن الطاقة المنبعثة تساوي الطاقة المقابلة للمنطقة الحمراء في قرص الألوان. وهذا ما يفسر سبب ظهور الشكل الإرجاعي لبوتاسيوم فيريسيانيد الحديد الثنائي باللون (الأزرق الداكن)

. (Prado, F. et al;1998)

يحتوي هذا الإختبار بعض الميزات التي أدت بالباحثين من إلى إستعماله بكثرة منها:

✓ طريقة رخيصة وبسيطة وموثوقة (Prado, F. et al;1998)

✓ نظرًا لقراءة الامتصاصية عند طول موجي مرتفع، يتم تقليل التداخل المحتمل من خليط التفاعل (Guo, L. et al;2009)

وكما إحتوى على بعض النقص منها:

✓ ذا كانت العينات نشطة للغاية، فيمكن ملاحظة عدم تجانس المزيج في الأنبوب. وبالتالي، ستكون هناك حاجة إلى الطرد المركزي.

✓ ذا كانت العينات تحتوي على نسبة عالية من البروتين، فقد يكون الترسيب بحمض الخليك ثلاثي الكلور صعباً

(Nabeelah Bibi Sadeer et al;2020).

1.2.1.1.2.5.II المنهجية العامة لإستعمال إختبار فيرسيانيد البوتاسيوم مخبرياً: (Zengin, G.et al;2015)

• المواد المستعملة المستعملة في الكشف:

Phosphate buffer ✓

Potassium ferricyanide($3K^+$, $[Fe (CN)_6]^{3-}$) ✓

Trichloroacetic acid(CCl_3COOH) ✓

Ferric chloride ($FeCl_3$) ✓

distilled water (H_2O) ✓

Plant extract ✓

• بروتوكول المتبع في التحضير:

✓ يتم مزج (0.5m) من العينة المذابة في الماء المقطر مع (0.5ml) من محلول الموقى (ذو تركيز (0.2mol/l) و (PH=6.6) مع إضافة (0.5ml) من $(3K^+ [Fe (CN)_6]^{3-})$.

✓ يحضن المزيج عند درجة حرارة $50^\circ C$ لمدة 20 دقيقة.

✓ بعد فترة الحضانة، يضاف (0.5ml) من Trichloroacetic acid و (2.5m) من (H_2O) مع (0.5ml) من ($FeCl_3$) إلى خليط التفاعل السابق.

• القراءة الطيفية والتحليل الرياضي:

تتم قراءة عينة الإمتصاص عند 700nm حيث يمكن التعبير عن إرجاع أيونات الحديد الثلاثي إلى أيونات الحديد الثنائي كمكافئات لمركب قياسي مثل Trolox والتعبير عن النتائج كنسبة مئوية للتثبيط.

$$I\% = [(A_{control} - A_{Extrait}/A_{control}]*100$$

3.1.1.2.5.II إختبار التقليل من أيونات النحاس CUPRAC: Cupric Reducing Antioxidant Capacity (CUPRAC)

Capacity (CUPRAC)

يشبه هذا الإختبار من الناحية المفاهيمية قدرة مضادات الأكسدة للحد من الحديدك FRAP الذي أكتشف في أوائل 2000 (Maria teresa.et al;2020) و الذي تم تطويره في قسم الكيمياء بجامعة إسطنبول بعد سبع سنوات من تطوير إختبار FRAP من طرف (Apak, R.et al;2004)، أين كان السبب الوحيد وراء تطوير هذا الإختبار هو تقديم طريقة يمكن من خلالها التعبير عن إجمالي مضادات الأكسدة كمؤشر غذائي لمصقات الطعام بسبب عدم وجود طريقة قياسية لتحديد الكميات، و بالفعل أثبتت هذه الطريقة فعاليتها في العديد من مركبات البوليفينول (كالأحماض الفينولية، أحماض الهيدروكسيناميك، الفلافونويدات،

الكاروتينات بالإضافة إلى الثيول و الأوكسجين الاصطناعي و الفيتامينات (E,C) (Nabeelah Bibi Sadeer et al;2020).

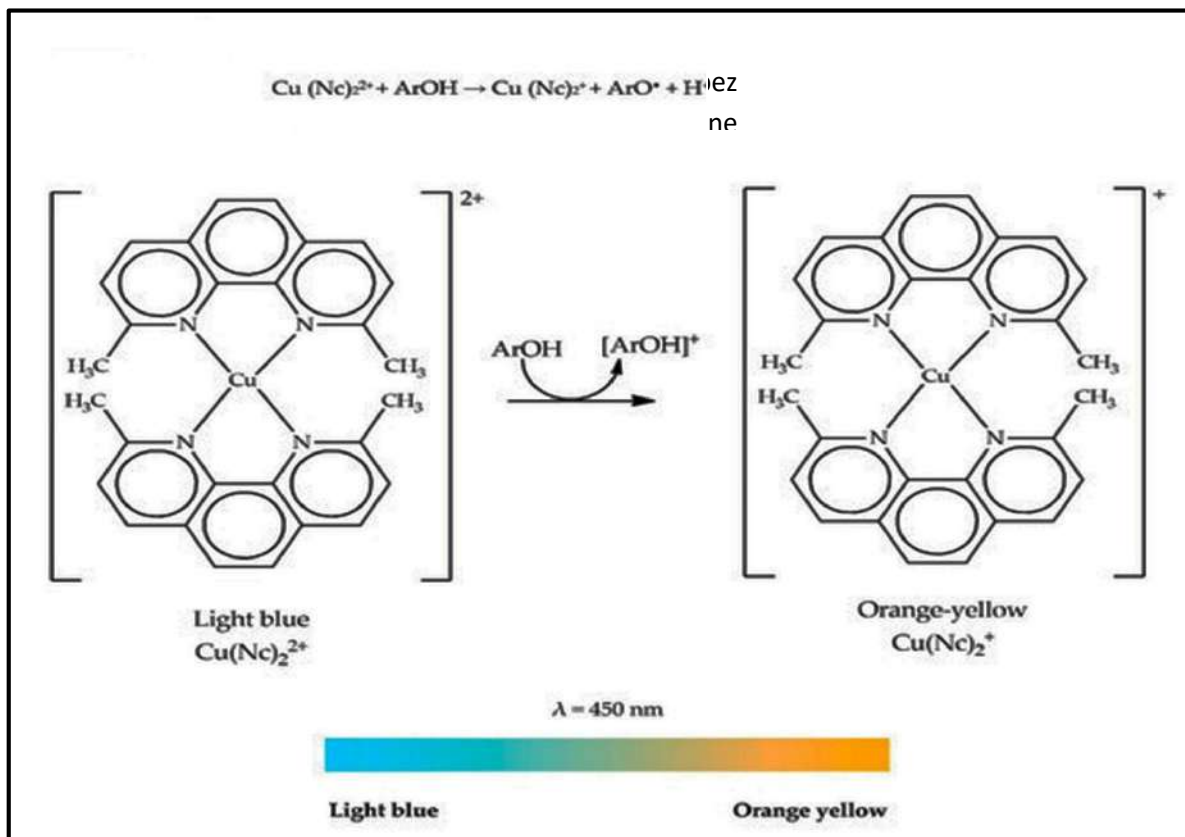
يكن استخدام هذه الطريقة لتحديد القدرة المضادة للأكسدة لمكونات الغذاء باستعمال عامل مؤكسد كروموجيني الكاتيوني (CU^{+2} -Cromogen) ذو اللون الأزرق الفاتح بواسطة عامل إختزال (antioxidant) إلى إنتاج المعقد (CU^{+} -Cromogen) ذو اللون الأصفر البرتقالي عند إقصي إمتصاص يقدر ب 450nm (Irina Georgiana Munteanu;2021).

وتجدر الإشارة إلى أن هناك العديد من مشتقات ال Phenanthroline الكروموجنية التي أثبتت فعاليتها بشكل إنتقائي في إختبار CUPRAC من بينها (BCS) (2,9-dimethyl-4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline disulfonic acid) (Campos,C. et al ;2009, 2-bicinconinic acid (BCA)(4-carboxyquinolin-2-il) chinolin-4-Neocuroine(NC;2,9-dimethyl-1,10- carboxylic acid) (Smith,P. et al;1985).، إلا أنه يتم إستخدام المركب (Irina Georgiana (BCA) و (BCS) استخدام (Munteanu;2021) منها:

✓ في دراسة قام بها (Zhou,F et al;2012) أظهروا أن إمكانية الإختزال للزوجين [Cu⁺-BCS/ Cu²⁺-BCS] لها قيمة تقدر ب E=0.84v, وهي أعلى قليلا من تلك الخاصة بكواشف القائمة على الإلتكرون الأحادي (ET) الأكثر شيوعا و التي يمكن أن تؤثر سلبا على إنتقائية المواد المضادة للأكسدة الحقيقية.

✓ من ناحية أخرى فبالرغم من أن مركب BCA له أقصى إمتصاص يقدر ب 558 nm مقارنة بNC، فقد لاحظوا أنه أثناء إجراء الإختبار أن المركب BCA لا يعمل على الحفاظ على تركيز الايونات النحاسية بشكل كبير (Marques,S.S. et al;2014).

يتم التفاعل لإختبار CUPRAC وفق المعادلة التالية:



الشكل 21: آلية التفاعل لإختبار تقليل أيونات النحاس

و تجدر الإشارة إلى أن احتمالية الأكسدة و الإرجاع للثنائيتين (Cu²⁺/Cu⁺) الحرين تبلغ (0.17V) (Apak, R. et al;2018) بينما تبلغ احتمالية الأكسدة و الإرجاع للثنائية الخاصة بالمعدن [Cu-(Nc)₂²⁺/Cu-(Nc)₂⁺] ب(0.60V) و هي أعلى بكثير من تلك التي خاصة باثنائيتين الحرين و قريبة من احتمالية الأكسدة و الإرجاع المحتواه في مضادات الأكسدة الرئيسية للمواد الغذائية و المركبات البيولوجية المقابلة لنطاق (0.60-0.20 V) (Irina Georgiana Munteanu;2021).

حضي هذا النوع من الإختبارات من بالإنتشار والإستعمال الواسع من قبل الباحثين لأنه ينطوي على العديد من المزايا منها:

✓ إجراء تفاعل الأكسدة والإختزال لإختبار CUPRAC عند الرقم الهيدروجيني PH=7.0 وهو الرقم الهيدروجيني الفيسيولوجي PH=7.4 مقارنة بقيمة الرقم الهيدروجيني الخاصة بإختبار FRAP عند PH=3.6، إذ أن الظروف

الأكثر حمضية في وسط التفاعل قد تعمل على كبت قدرة الإختزال و السبب في ذلك هو وجود البروتونات على المركبات المضادة للأكسدة، بينما الظروف الأكثر قاعدية كما في إختبار Folin-Ciocalteu ذو PH=10 تؤدي إلى تفكيك الحمض من الفينولات (من خلال إعطاء بروتون) إلى تحسين قدرة الإرجاع يشكل

كبير في العينة مما يؤدي إلى قياسات غير واقعية لTAC (Irina Georgiana Munteanu;2021)

✓ كاشف CUPRAC سريع بما يكفي لأكسدة مضادات الأكسدة من نوع thiol والجلوتاثيون مقارنة ب إختبارات القائمة على الإنتقال الإلكتروني مثل FRAP، والسبب في ذلك هو الهيكل الإلكتروني ل Cu^{+2} الذي يتيح الحركة السريعة بخلاف Fe^{+2} الذي يحتوي على مدار D غير مملوء (Irina Georgiana Munteanu;2021).

✓ غياب السلوك المؤكسد : نضرا لأن أيون Cu^{+} يظهر كمنتج لتفاعل الأكسدة و الإختزال في هذا الأختبار و الذي يكون في حالة معقد $[Cu-(Nc)_2]^{+}$ فإنه لا يمكن أن يكون بمثابة مادة مؤكسدة و التي قد تسبب ضررا تأكسديا للجزيئات الكبيرة في سوائل الجسم حيث لا يمكنه أن يتفاعل تجاه مضادات الأكسدة المختبرة في تفاعل Fonton في حالة وجود بيروكسيد الهيدروجين، لكن إحتمالية التفاعل العكسي واردة أي $[Cu-(Nc)_2]^{2+}$ مع بيروكسيد الهيدروجين (Irina Georgiana Munteanu;2021).

✓ إختبار CUPRAC لا يتأثر بالعوامل البيئية (الرطوبة، أشعة الشمس، الهواء) بخلاف بعض الكواشف الأخرى من نوع الجذور الحرة مثل DPPH (Irina Georgiana Munteanu;2021).

✓ الحساسية و الإستجابة الخطية لمنحنيات الإمتصاص مقابل التركيز لهذا الإختبار على المدى الواسع (طول المجال) على عكس بعض الطرق الأخرى التي تعطي منحنيات متعددة

✓ حدود الإمتصاصية المولية العالية بما يكفي لتحديد مضادات الأكسدة المهمة بيولوجيا بشكل حساس (Irina Georgiana Munteanu;2021).

كما إحتوى على بعض من النقاىص منها:

✓ عدم القدرة على قياس مضادات الأكسدة الانزيمية (Apak, R.et al;2004).

✓ قد يختلف أحيانا وقت الحضانة للوصول إلى الإكتمال بين 30 إلى 60 دقيقة، إعتامادا على مدة سرعة مضادات الأكسدة، فوفقا لدراسة أعدها (Özyürek et ;2011) أستنتج منها أنه من الضروري السماح بإستكمال التفاعل إذا طور اللون بوتيرة بطيئة، فقد تكون هناك حضانة عند 50 درجة مئوية في حمام مائي لمدة 20 دقيقة.

1.3.1.1.2.5.II المنهجية العامة لإستعمال إختبار CUPRAC مخبريا:

• الكواشف والمواد المستخدمة في الإختبار:

✓ Chlorid cuperic ($CuCl_2$)

✓ Neocuroine (NC)

✓ Acetat ammonium ($C_2H_7NO_2$)

• تحضير كاشف CUPRAC: (Zengin,G.et al;2015)

✓ يتم تحضير وسط تفاعلي بتحضير مزيج يحتوي على من $CuCl_2$ (10mM,1ml) و Neocuroine (7.5mM,1ml) مع $C_2H_7NO_2$ الموقى (1M,1ml) ذو PH=7.

✓ يتم تحضير محلول من (Neocuroine) ومن ($C_2H_7NO_2$) ذو بدون إضافة ($CuCl_2$).

• تحضير العينة المدروسة والقراءة الطيفية:

يتم أخذ (0.5ml) من محلول العينة بإضافته إلى (3ml) خليط التفاعل المحضر مسبقا.

يتم تحضير عينة مماثلة بإضافة (0.5 ml) من العينة إلى (3ml) الخليط الخالي من ($CuCl_2$).

تحضن العينات في درجة حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة.

يتم قراءة الإمتصاصية بجهاز (UV-VIS) عند 450nm ويتم التعبير عن قدرة CUPRAC إما على شكل تثبيط أو مكافئ لمركب قياسي ، مثل ترولوكس أو حمض الغاليك أو حمض الأسكوربيك أو كيرسيتين أو α -tocophero.

4.1.1.2.5.II إختبار فولين سيوكالتيو (Folin-Ciocalteu Assay(F-C) :

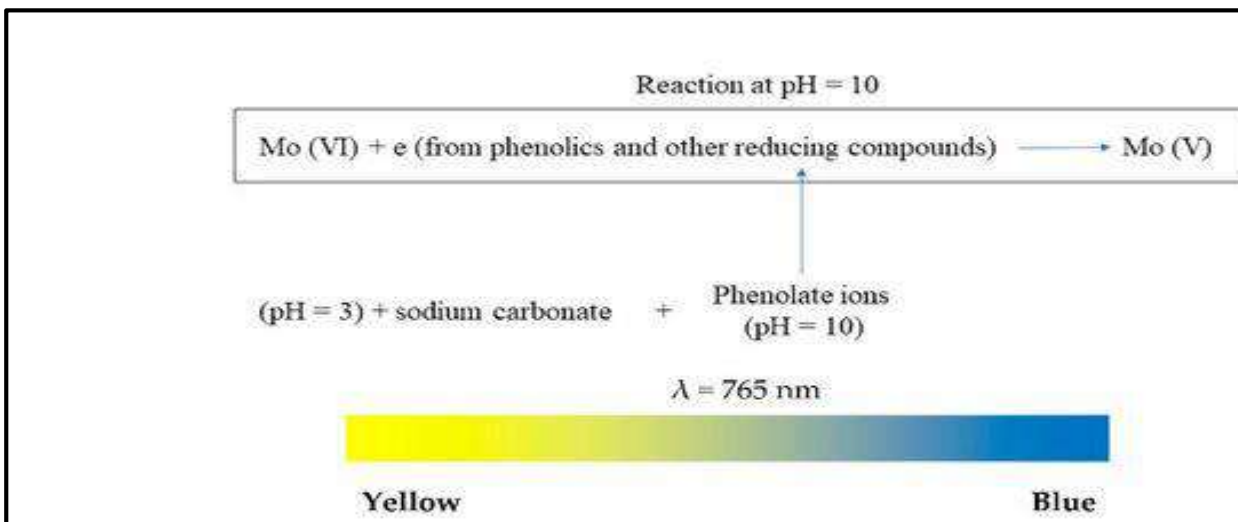
طريقة معروفة تهدف إلى تحديد المستوى الفينولي الكلي (TPC) و التي تم تطويرها لتحسين إختبار (Folin-Denis) أين إنتهج تصميمها في البداية لتحديد تركيز البروتين الكلي عن طريق قياس مقدار الترتوفان و التيروزين بإعتبارها الأكثر حساسية و قابلة للتكاثر مقارنة بإختبار (F-D) (Ainsworth, E.A.et al;2007)، و إستخدامها على نطاق واسع تجاريا في العديد من مخابر مراقبة الجودة الهامة أين تبنته أوروبا كإجراء رسمي لقياس محتويات الفينول في النبيذ (Irina Georgiana Munteanu.et al;2021) و في الدراسات السريرية و الغذائية لقياس إجمالي محتوى البوليفينول في الأغذية المشتقة من النباتات و العينات البيولوجية مختلفة المركبات الفينولية و ذات القيم الوقائية و العلاجية الكيميائية في العديد من الامراض المزمنة منذ عام 1990، حيث يعتمد هذا النوع من الإختبارات القائمة على نقل الإلكترون الأحادي الذي يتميز بالبساطة و قابلية التكرار (Sánchez-Rangel,et al;2013) بالقدرة المختزلة لمضادات الأكسدة الفينولية بإرتباطها مع الكاشف (F-C) (Karadag, A.et al;2009) على نقل الإلكترونات من المركبات الفينولية إلى (F-C) في وسط قاعدي (PH=10) (Singleton and Rossi 1999).

على الرغم من إستعماله الواسع من قبل الدارسين إلا أنه تضمن بعض القيود منها:

✓ له حساسية لدرجة الحموضة ودرجة الحرارة وقت التفاعل، لهذا السبب من الضروري تحديد حالة التفاعل بدقة للحصول على نتائج موثوقة.

✓ يعتبر المبالغة في تقدير TPC مصدر قلق كبير لإختبار Folin-Ciocalteu، نظرًا لمساهمة عوامل الإختزال غير الفينولية الموجودة في النظام عند إرجاع كاشف Folin-Ciocalteu (Blasco, A.J.et al;2005)، تشمل هذه الأمثلة على السكريات المختزلة وبعض الأحماض الأمينية وبالتالي، قد يتم المبالغة في تقدير نتائج المحصل عليها TPC بحجم واحد للمقارنة مع تلك التي تم الحصول عليها بواسطة طرق HPLC بالإضافة إلى ذلك، يتم إجراء الإختبار في أوساط مائية، ويكون تطبيقه على الفينولات المحبة للدهون محدودًا باستثناء الحالة التي يتم فيها تطبيق بعض تعديلات على نظام المذيبات (Irina Georgiana Munteanu;2021).

وعلى الرغم من ذلك إلا أن الطبيعة الكيميائية الدقيقة للكاشف (F-C) ليست محددة لحد الآن، و التي يعتقد أنها تحتوي على الفوسفوموليبيديك و معقدات حمض الفوسفوتونجستيك ذي اللون الأصفرالتي يتم إرجاها للحصول على اللون الأزرق مع أقصى إمتصاص عند 765nm (Shahidi and Zhong; 2014) وفق معادلة التفاعل التالية:



الشكل 22: آلية التفاعل لإختبار فولين سيوكالتيو

1.4.1.1.2.5.II المنهجية العامة لإستعمالFolin-Ciocalteuمخبريا:

- الكواشف والمواد المستعملة في الإختبار:
 - sodium tungstate (Na_2WO_4) ✓
 - sodium molybdate (Na_2MoO_4) ✓
 - Hydrochloric acid concentré (HCl) ✓
 - Acidphosphoric (H_3PO_4) ✓
 - distilled water (H_2O) ✓
 - $\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ✓
 - Na_2CO_3 ✓

• تحضير كاشف (F-C):

يتم تحضير الكاشف بإذابة (100g) من (Na_2WO_4) و (25g) من (Na_2MoO_4) في (700ml) من الماء المقطر (H_2O)، بعدها يضاف حوالي (50ml) من (HCl) و (50ml) من (H_3PO_4). بعدها يترك الخليط المحضر يغلي لمدة 10 ساعات ثم يترك ليبرد قبل إضافة (150g) من ($\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) و الحصول على كاشف ذي لون الأصفر الشديد.

(Ainsworth, E.A.; Gillespie, K.M;2007).

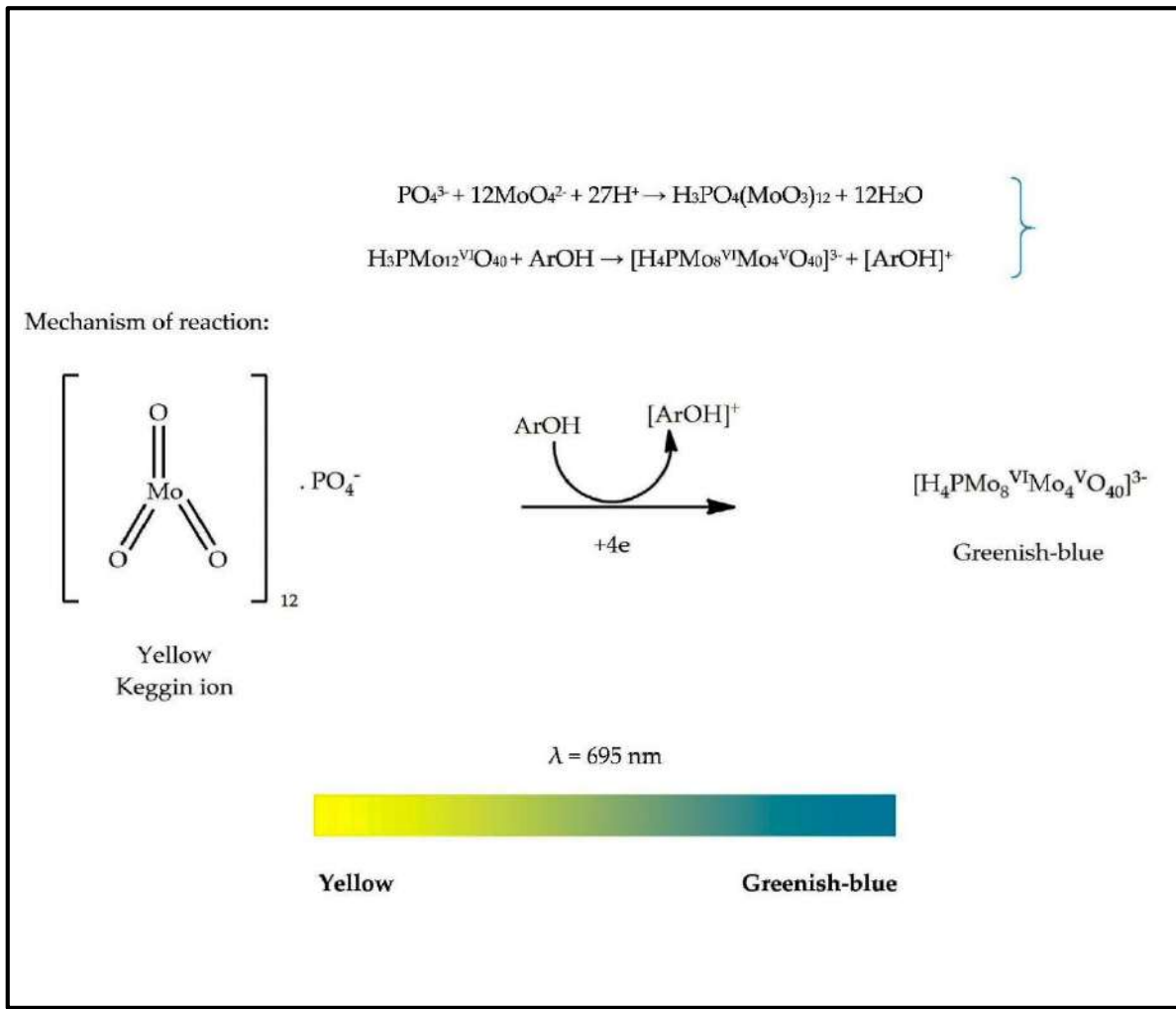
• تحضير العينة المدروسة والقراءة الطيفية:

يتم تحديد المحتوى الفينولي في العينة بإضافة (2mg/ml) من محلول العينة إلى (1ml) من كاشف (F-C) و (2ml) من Na_2CO_3 لغرض الحصول على وسط قاعدي، بعدها ترج بعناية، ثم تضاف إلى (7ml) ماء منزوع الأيونات و تحضن لمدة ساعتين عند درجة حرارة الغرفة، بعدها تتم قراءة الامتصاصية بواسطة UV-VIS عند أقصى امتصاص يقدر ب765nm يستخدم حمض الجاليك عادة كمييار مرجعي (Aktumsek, A.et al;2011).

5.1.1.2.5.II إختبار الفوسفوموليبدنيوم (PM) : Phosphomolybdenum Assay

إختبار الفوسفوموليبدنيوم الذي تم إستخدامه في الأصل لتحديد كمية فيتامين E في البذور، و الذي تم تطويره و إمتد تطبيقه ليشمل المستخلصات النباتية (Prieto, P.et al ;1999)، يستعمل على نطاق واسع من قبل العديد من الدارسين لتتبع طريقة الفسفوموليبدنيوم إما آلية القائمة على نقل الإلكترون الحادي أو القائمة على التبرع بذرة الهيدروجين، مما يتسبب في إرجاع الموليبدنيوم (VI) إلى الموليبدنيوم (V) (Thangaraj, P;2018).

تعد نقطة نهاية التفاعل التي تبلغ 90 دقيقة كافية للتكوين الكامل للمركب فوسفوموليبدنيوم ذي اللون الأزرق المخضر الذي ينتج إنطلاقاً من موليبدات الأمونيوم في ظل الظروف الحمضية إلى أكسيد يعرف باسم (Keggin ion) $[\text{H}_3\text{PO}_4(\text{MoO}_3)_4]^{3-}$ و الذي يتم إرجاع هذا الأخير في وجود مضادات الأكسدة إلى $[\text{H}_4\text{PMo}_8^{\text{VI}}\text{Mo}_4^{\text{V}}\text{O}_{40}]^{3-}$ (Miller, C.et al;1914 Nagul, E.A.et al;2015) وفق آلية التفاعل التالية:



الشكل 23: آلية التفاعل لإختبار الفوسفوموليبدنيوم

و من المثير للإهتمام أن العلاقة بين إختبار (PM) و الإختبارات الأخرى المضادة للأكسدة لا تزال محل نقاش حول وجود علاقة بينها و بين بعض الإختبارات، إذ أفادت بعض الدراسات وجود علاقة بين إختبار (PM) و نشاط كسح الجذور الحرة (ABTS ,DPPH) (Thangaraj, P;2018) فيما أنكرت بعض الدراسات الأخرى مثل هذا الارتباط (Grigore, A.et al;2010) , أين برهن Prieto و زملائه في دراسة قاموا بها عام 1999 أوضحوا أن كلا من الإختبارين و يمكنهما إكتشاف مثل فلافونيدات و الفينولات بينما يمكن (PM) إكتشاف بشكل عام (مثل حمض الأسكوربيك, بعض الفينولات, α-tocopherol) و هذا ما قد يفسر لماذا لا يعكس المحتوى العالي من البوليفينول مهم في إختبار (PM) . يحتوى إختبار (PM) على العديد من المزايا و العيوب مثله مثل باقي إختبارات مضادات الأكسدة منها:

✓ يكون تكوين مركب الفسفوموليبدنيوم بعيداً عن المذيبات العضوية المختلفة (الهكسان، والميثانول، والإيثانول، وثنائي ميثيل سلفوكسيد) المستخدمة في تحضير مضادات الأكسدة أو تحضير المستخلصات للتحليل (Prieto, 5 P.et ai;1999) .

✓ يتم استخدام كواشف بسيطة وحساسة ورخيصة (Prieto, P.et ai;1999).

✓ يمكنه فحص مجموعة واسعة من العينات، بما في ذلك المستخلصات النباتية المحبة للدهون والزيوت النباتية والأمصال والعينات الصيدلانية ومستحضرات التجميل (Prieto, P.et ai;1999)

وقد تضمن بعض العيوب منها:

✓ لوحظ وجود علاقة سيئة مع المركبات النشطة بيولوجياً (الفينولات، الفلافونويد) (Choirunnisa, A;2016).

✓ استهلاك الوقت نظرًا لأن درجة الحرارة المرتفعة (95 درجة مئوية) مطلوبة، مما قد يمثل مشكلة أثناء فحص عدد

كبير من العينات (Nabeelah Bibi Sadeer et al;2020).

✓ الارتباط السيئ بالمركبات النشطة بيولوجيًا في عينات الزيوت الأساسية بسبب تركيبها الكيميائي المعقد (كالتربينات مثلاً) (Nabeelah Bibi Sadeer et al;2020).

1.5.1.1.2.5.II المنهجية العامة لاستعمال إختبار phosphomolybdenum مخبرياً:

• الكواشف والمواد المستعملة في الإختبار:

✓ sulfuric acid (H₂SO₄)

✓ sodium phosphate (Na₃PO₄)

✓ ammonium molybdate (NH₄)Mo₇O₂₄

• تحضير كاشف Phosphomolybdenum :

يتم تحضير الكاشف بمزج (0.6mmol) من sulfuric acid مع (28mmol) من sodium phosphate و(4mmol) من ammonium molybdate .

• تحضير العينة والقراءة الطيفية:

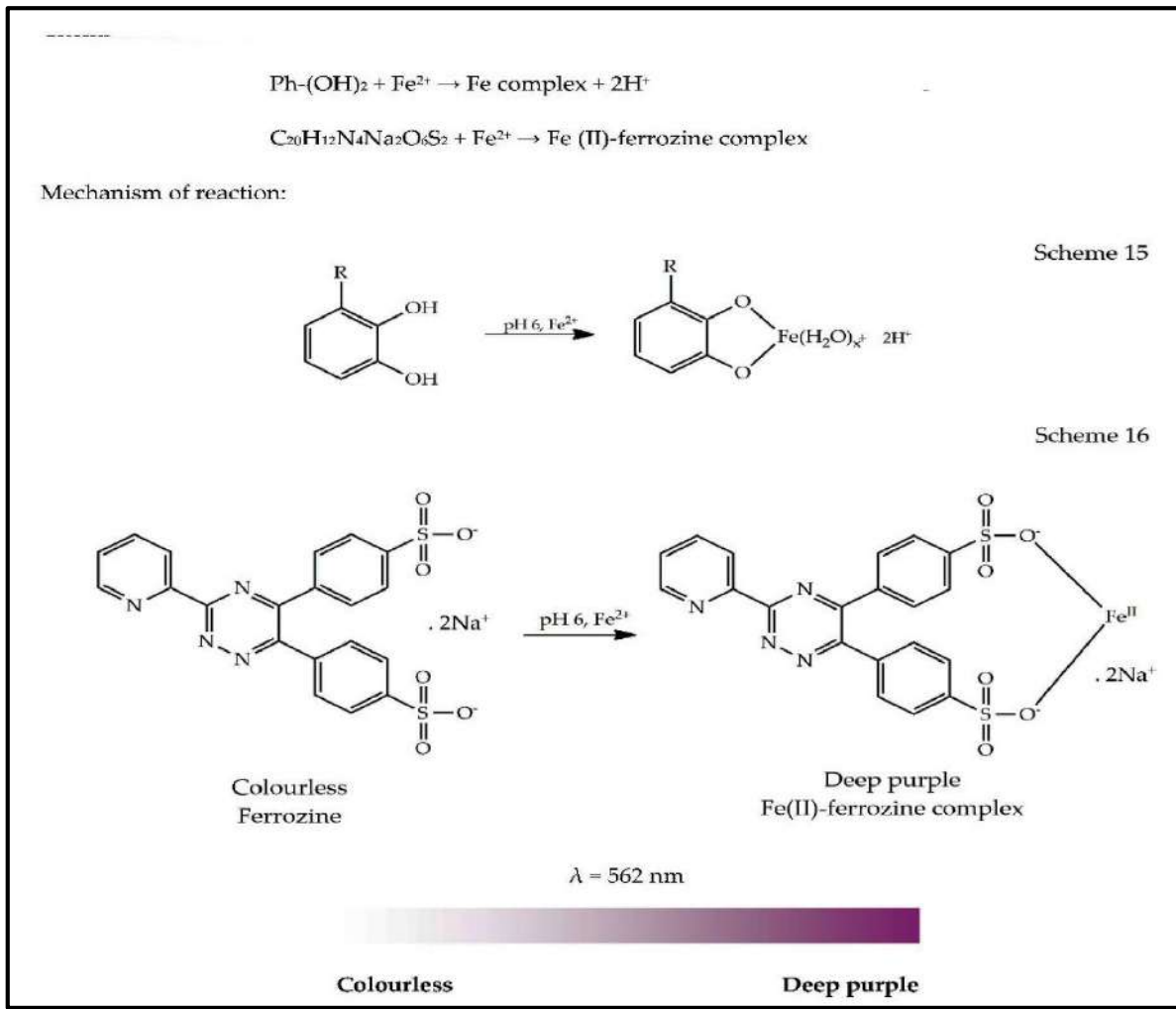
يتم إضافة (0.3ml) من محلول العينة إلى كاشف فوسفوموليبدنيوم المحضر مسبقاً، حيث يتم حضنه عند 95 درجة مئوية لمدة 90 دقيقة، بعدها تتم قراءة العينة بالإمتصاص بجهاز UV-VIS عند إمتصاص 695nm و التعبير عن النتائج كنسبة مئوية للتثبيط أو مكافئ لمركب معياري مثل حمض الأسكوربيك (Zengin, G.et al;2015,Prieto, P.et ai;1999) .

$$I\% = [(A_0 - A_r)/A_0]*100$$

6.1.1.2.5.II إختبار تمخبل المعادن (تمخبل الحديدوز): Metal Chelating (Ferrous Ion Chelating) assay

من المعروف أن أيونات المعادن الانتقالية (كالححاس و الرصاص و الحديد و الزرنيخ) تحفز أكسدة الدهون طريق تفاعل Fenton وأيضاً عن طريق تحلل هيدروبيروكسيد الدهون إلى جذور بيروكسيل وألكوكسيل متحولة إلى جذور أكثر تفاعلية و أكثر سمية مؤدية بدورها إلى العديد من الامراض المستعصية إذ يتم تقييم الخاصية المضادة للأكسدة لتمخبل مثل هذه المعادن عند إرتباطه بأحد مضادات الأكسدة كالفلافونيدات مثلاً (مركبات مخلبة قوية للمعادن) بطريقة لا يمكن أن يعمل فيها بعد ذلك (Nabeelah Bibi Sadeer et al;2020) .

بشكل عام يتم إجراء إختبار تمخبل الأيونات الحديدية وفقاً للطريقة التي عرضها (Dinis, T.C.P.et al;1994) والذي يستعمل لتحديد نشاط تمخبل المعادن في المستخلصات النباتية و ذلك عن طريق قياس تأثير التمخبل لمضادات الأكسدة على الأيونات الحديد الثاني في ضل الظروف الحمضية (PH=6) حيث يمكن أن ترتبط المركبات الفينولية مع جزء صغير فقط من أيونات الحديد الثاني، بينما يمكن أن تتفاعل الأيونات المتبقية مع بعض المركبات مثل(EDTA) وهو معيار مخلب للمعادن كما أنه يستخدم في العديد من المواد الغذائية و الصيدلانية أو مركب (ferrozine) الشائع إستخدامه بكثرة لتكوين مركب أيون حديد - فيروزين مستقر و قابل للذوبان في الماء ذو لون أحمر أرجواني غامق وفق التفاعل المثل في شكل 24



الشكل 24 : آلية التفاعل لإختبار تمخبل المعادن (تمخبل الحديدوز)

إذ أن وجود الخالب (ferrozine) / المستخلص (الحاوي على أيونات الحديدوز) / مضادات الأكسدة يؤدي إلى فقدان ظهور اللون الأرجواني، حيث يتم تقدير هذا النقص في اللون عن طريق القياس الطيفي الذي يعطى لقدرة الارتباط عند أقصى إمتصاص 562nm للمعقد (ferrozine-Fe²⁺) أي أن كلما زادت قيمة الإمتصاصية عند 562nm، زاد تركيز المعقد وإنخفضت قدرة الارتباط المخلب و المستخلص مع مضادات الأكسدة (Santos, J.S.et al;2017,Aparadh, V.et al;2012) لهذا النوع من الإختبارات بعض المزايا منها:

- ✓ كواشف متاحة بسهولة مع إستخدام أجهزة بسيطة (Santos, J.S.et al;2017).
- ✓ قابلية التكرار (Santos, J.S.et al;2017).

كما تضمن بعض العيوب تكمن في:

- ✓ غير محدد، لأن هذا الإختبار لا يتفاعل فقط مع المركبات الفينولية ولكن أيضاً مع البيبتيدات والكبريتات الموجودة في الوسط (Nabeelah Bibi Sadeer et al;2020).
- ✓ بعيد جدا عن إختبارات نشاط الكسح الجذري (DPPH,ABTS) و تقليل من أيونات المعدنية (FRAP,CURAC) لذلك لا يمكن مقارنة نتائجه (Nabeelah Bibi Sadeer et al;2020).

1.6.1.1.2.5.II المنهجية العاملة لإستعمال إختبار مخبريا:

- الكواشف و المواد المستعملة في الإختبار: (Dinis et al; 1994)
 - ✓ Ferrozine
 - ✓ ferrous chloride (FeCl₂)
 - ✓ deionized water
 - ✓ EDTA

• تحضير العينة والقراءة الطيفية:

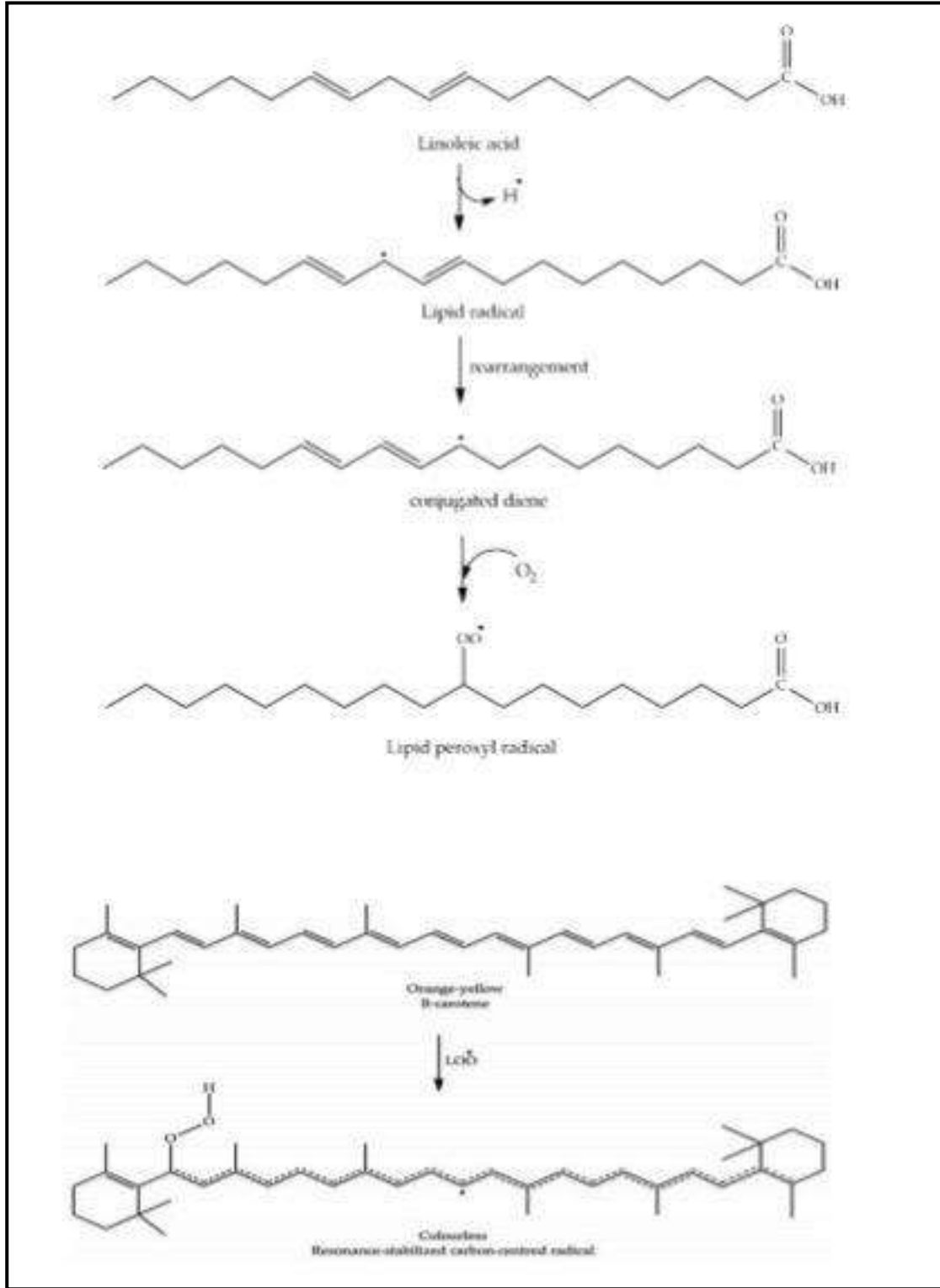
- ✓ يتم تحضير العينة و ذلك بإضافة (FeCl₂) (0.05ml, 2mmol) إلى (2ml) من مستخلص العينة, بعدها يبدأ التفاعل بإضافة Ferrozine (0.2ml, 5,mmol) من ذو تركيز.
- ✓ قبل ذلك يتم تحضير عينة الشاهد (أي بإضافة نفس الحجم السابق من العينة مع نفس حجم وتركيز السابق من FeCl₂) بدون Ferrozine مع إضافة (0.2ml) من الماء.
- ✓ يحضن خليط التفاعل عند درجة حرارة الغرفة لمدة 10 دقائق.
- ✓ بعدها تتم قراءة الإمتصاصية للعينة الشاهد عند (562nm) و للعينة المدروسة .
- تتم الحصول على الإمتصاص الحقيقي بطرح الإمتصاصية للعينة الخالية من Ferrozine من الإمتصاصية للعينة المدروسة .

$$I\% = [(A_0 - A_r)/A_0]*100$$

7.1.1.2.5.II إختبار بيتا-كاروتين:(β-caroténe) : β-Carotene Bleaching Assay

يعد إختبار β-caroténe من أقدم الإختبارات الشائعة السريعة و البسيطة لفحص مضادات الأكسدة (Alam **etal.2013;Apak et al.2016**، الذي يعتبر مختلفا تماما مقارنة باختبارات مضادات الأكسدة الأخرى من الناحية المفاهيمية فمن المعروف أن الكاروتينات من بين المركبات المسؤولة عن صبغة الألوان في النباتات الطبيعية و التي قد تخضع لعملية التبييض (أي تفقد لونها عند تعرضها للجذور الحرة أو الأنواع المؤكسدة) منتجا عن هذه العملية قطع الرابطة المزدوجة المترافقة إلى زيادة إضافة رابطة مزدوجة للمركب أو عن طريق الإنقسام مؤديا إلى تكوين إما كربونيل أو إيبوكسيدات (**Krinsky, N.I.; Johnson, E.J;2005**).

حيث يقيس هذا الإختبار معدل التثبيط التأكسدي للبيتا-كاروتين (ركيزة مؤكسدة محبة للدهون C₄₀H₅₆) (أي إزالة اللون البرتقالي أو الأصفر الداكن أو الأصفر) بواسطة الجذور الحرة المتولدة عن طريق الأكسدة اللحضية للأحماض الدهنية الموجودة في مستحلب مائي لحمض اللينوليك (و هو عبارة عن حمض دهني غير مشبع ذو صيغة كيميائية C₁₈H₃₂O₂)، و كتفسير آخر تؤدي أكسدة حمض اللينوليك بواسطة الماء المقطر المؤكسد إلى تكوين الدهون أو دهون جذور البيروكسيل, هذه الأخيرة بمجرد تكوينها تؤدي إلى مهاجمة بيتا كاروتين مما يتسبب في إزالة اللون و الذي يرجع إلى كسر الرابطة عن طريق تفاعل الجذور الناتجة مع الرابطة C = C كما هو موضح في شكل التالي:



الشكل 25: آلية التفاعل بيتا-كاروتين:(β -carotène)

بالمقابل يؤدي حضور مضادات الأكسدة إلى إبطاء عملية (إزالة اللون) والتي تعمل كدور المنافسة في إخماد الجذور الحرة وبالتالي إبطاء إزالة اللون ل بيتا كاروتين كما هو موضح في شكل.

حيث يعتمد التقدير الكمي لمضادات الأكسدة على المعدلات المختلفة التي يتحلل فيها بيتا كاروتين و الذي يتم فيها قياس معدل إستهلاك مضادات الاكسدة عن طريق قياس الإمتصاصية ما بين 470-490nm (Prieto, M.A.et al;2012, Lage,

M.Á.P.et al;2013, Ueno, H.et al;2014).

على الرغم من الإستعمال الواسع لهذا الإختبار في فحص العينات المحبة للدهون والماء إلا أنه تعرض للعديد من الإنتقادات على نطاق واسع بسبب إشكالية التقدير الكمي لها وتعقيد تحضير الكاشف نوعا ما مع تداخل بعض العوامل المختلفة من بينها:

- ✓ حساسيته للأكسجين ودرجة الحموضة.
- ✓ ظروف غير ثابتة للتحريض على الحرارة على أكسدة اللينولييك مما أدى إلى إقتراح بديل مثل AAPH كمبادر للتوليد

✓ تأثير قطبية المذيبات (المستعملة) على مضادات الأكسدة، وفقا لدراسة قام بها William. L. Porter عام 1980 و التي إستنتج منها نظرية المسماة (نظرية المفارقة القطبية) و التي كان مفادها أن مضادات الأكسدة القطبية (المحبة للماء) أكثر فعالية في المذيبات الأقل قطبية، بينما تكون مضادات الأكسدة الغير قطبية (محبة للدهون) أكثر فعالية في الوسائط الأكثر قطبية فقط إستنادا إلى الوسائط المختلفة القطبية التي توجد فيها مضادات الأكسدة (Porter, W.L.et al;1989).

✓ كما أنه لا يكمن مقارنة نتائجه مع إختبارات أخرى لأنه بعيد كل البعد عن إختبارات نشاط الكسح الجذري DPPH، ABTS و التقليل من قدرة مضادات الأكسدة FRAP,CUPAR.

1.7.1.1.2.5.II المنهجية العامة لأستعمال إختبار β -carotène:

• الكواشف والمواد المستعملة في الإختبار:

✓ β -Carotène (C₄₀H₅₆)

✓ Acide linolic(C₁₈H₃₂O₂)

✓ Chloroform (CHCl₃)

✓ Tween.40

✓ oxygenated distilled wate (ماء مقطر المؤكسد)

✓ (Methanol) CH₃OH

• تحضير الكاشف:

✓ يتم تحضير النضام (β -carotene-Acid linoleic) و ذلك بإذابة (0.5mg) من (C₄₀H₅₆) في (1ml) من (CHCl₃) متبوعا بإضافة 25ml من (C₁₈H₃₂O₂) و 200ml من Tween.40.

✓ يتم بعد ذلك يوضع الخليط الناتج في جهاز مخبر الدوار لتبخير الكلوروفورم تماما عند 40 درجة مئوية.

✓ بعدها يضاف إلى المحلول الناتج (100ml) من (oxygenated distilled wate) ويتم تحريك المحلول جيد للحصول على مستحلب مسقر.

✓ يتم تحضير عينة أخرى فارغة بنفس التحضير المسبق تأخذ كعينة مرجعية.

✓ يتم تحضير المحلول القياسي (Acide ascorbic) بإذابته في الميثانول .

• تحضير العينة:

✓ يتم تحضير أربعة أنابيب إختبار من العينة المدروسة بتحضير (200ml منها مذابة في الميثانول بتراكيز مختلفة (200,100,50,25µg/ml).

✓ يضاف (1.5ml) من خليط التفاعل المحضر مسبقا إلى عينات أنابيب الإختبار بعدها يحضن النضام عند 50°C لمدة ساعتين .

✓ ثم تتم قراءة قيم الامتصاصية للعينة والشاهد عند 490nm. يستمر قياس الامتصاصية حتى يختفي لون بيتا كاروتين .

(Zengin, G.et al;2015,Prieto, M.A.et al;2012)

✓ يتم حساب معدل التبييض (R) ل-car-carotene باستخدام المعادلة التالية:

$$\ln(a/b)R=t$$

حيث ln : اللوغاريتم الطبيعي

a:الإمتصاصية في الوقت t=0

b:الإمتصاصية في الوقت (t=(30,60,90,120 minu)

من خلال ذلك يتم حساب نشاط مضادات الأكسدة (AA) عن طريق حساب النسبة المئوية للتنشيط من خلال المعادلة:

$$AA=(R_{control}-R_{sample}/R_{contro})*100$$

حيث أن:

AA : النسبة المئوية للتنشيط

$R_{control}$: الإمتصاصية المرجعية لحمض اللينوليك

R_{sample} : إمتصاصية العينة المحصل عليها (Nabeelah Bibi Sadeer et al;2020) .

3.5.II إختبارات الوضع المختلط (HAT/SET) Mixed Mode

تعتمد إختبارات الوضع المختلط بشكل عام على إزالة الكروموفور حيث تلعب آليات نقل الإلكترون المقترن بالبروتون أدواراً مختلفة بنسب مختلفة اعتماداً على ظروف التفاعل المختلفة (مثل الأس الهيدروجيني و المذيب) (Siddeeg, A.et al;2021) و الآلية السائدة والتي تحدث بالتوازي و لكن بتحديد الآلية المهيمنة على أساس التركيب و الخصائص المضادة للأكسدة الذي يمكن أن يتفاعل بالتتابع إما عن طريق نقل الإلكترون متبوعاً بنقل الهيدروجين حيث تسمى الآلية الغالبة (SET-PT) تتم وفق المعادلات التالية:



أو عن طريق آلية تشير إلى خسارة الهيدروجين متبوعاً بالتبرع بالإلكترون يسمى الآلية المهيمنة (SET-ET) وتتم وفق للمعادلات التالية:



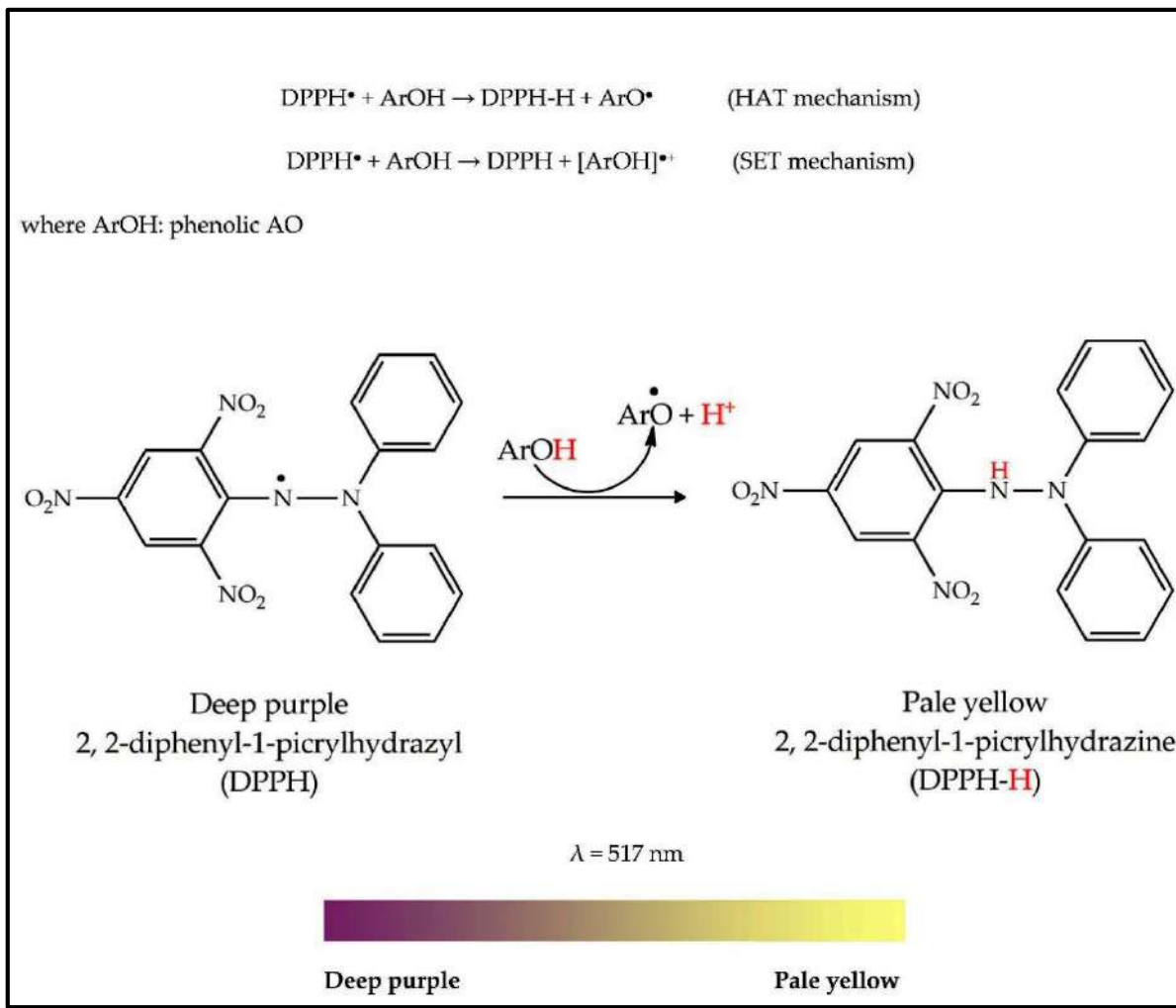
سنناقش في هذا النوع نوعين من الإختبارات الأكثر شيوعاً و إستخداماً.

1.3.5.II إختبار كسح الجذور الحرة DPPH: Radical Scavenging Capacity (DPPH)

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

يعد المركب الجذري الذي يتم تصنيعه تجارياً تحت ظروف مخبرية العادية في حالته الصلبة من أكسدة ثنائي فينيل بيكريل هيدرازين (diphenylpicrylhydrazine) مع ثنائي أكسيد الرصاص (Hogg et al. 1961) (lead dioxide) واحد

من القلائل المركبات المستقرة جذور النيتروجين (Ilhami Gulcin;2020) التي تحضى بالإستقرار الجيد بسبب عدم تموضع الجذر على الحلقات العطرية المشكلة له (إحتوائه على إلكترون فردي على مستوى ذرة النيتروجين) . إختبار DPPH الذي يعود إكتشافه منذ عشرينيات القرن الماضي من طرف Golschmidt and ren عام 1922 و قد تم تطويره لأول مرة عام من طرف Blois عام 1958 (Foti, M.C;2015)، هي أقدم طريقة غير مباشرة لتحديد نشاط مضادات الأكسدة و التي استخدمت في البداية لتحديد القدرة المضادة للأكسدة للمركبات الفينولية لإكتشاف قدرة مضادات الأكسدة على إعطاء بالهيدروجين في المواد الطبيعية فيما بعد تم قياس الاختبار لتحديد إمكاناته على مضادات الأكسدة لكل من الفينولات الفردية و الأغذية وكذلك العينات ذات الصلة بيولوجياً (Roginsky and Lissi;2005) ، حيث يمتاز باللون البنفسجي القاتم و الذي يتم تحييده إما عن طريق قبول إلكترون أو ذرة هيدروجين من أحد أنواع مضادات الأكسدة (عوامل الإختزال) حيث يتم خلالها تحويله إلى الشكل المختزل (DPPH) حسب الآلية SET أو DPPH-H حسب الآلية HAT ذي اللون الاصفر الباهت (Nabeelah Bibi Sadeer et al;2020). وفق معادلة التفاعل التالية:



الشكل 26: آلية التفاعل كسح الجذور الحرة DPPH

على الرغم من بساطة هذا الإختبار التي لايتطلب تحليلها معالجة خاصة للعينة فقد تتأثر حساسيتها بعدة عوامل (كنوعية و كمية المذيب المستخدم، نقاوة الكاشف، وجود و تركيز شوارد الهيدروجين) (Shahidi and Zhong;2015) وتحليلها وفق مطيافية أشعة فوق بنفسجية (UV-VIS) أو بالرنين الإلكتروني المغناطيسي (EPR) (Benzie, I.F.F.; Strain, J.J;1999) إضافة إلى ذلك فقد تعددت جهات الباحثين فيما يخص تقييمها و دراستها فمنهم من إنتهج تطبيقه المباشر بإعتباره بسيطاً و سريعاً و كافياً لتقييم المقارن للمركبات أو المستخلصات، و منهم من إهتموا بالجوانب الحركية له (Irina Georgiana Munteanu. et al;2021). (مثل فترة التفاعل أو الدراسة الحركية أو درجة الحرارة الغرفة و غيرها فيما يخص تعدد البروتوكولات بخصوص نوعية المذيب).

نضراً لإنتشاره الواسع في التطبيقات فهو لا يخلو من أي تحليل للنشاط المضاد للأكسدة لسبب:

- ✓ بسيط ورخيص وسريع، لأن الجذر مستقر ولا يحتاج إلى توليد مقارنة بـ ABTS (Kedare, S.B.et al;2011)
- ✓ وقت الكسح الجذري هو 30 دقيقة، مما يسمح لـ DPPH بالتفاعل بكفاءة، حتى مع مضادات الأكسدة الضعيفة (Kedare, S.B.et al;2011)

- ✓ النتائج قابلة للتكرار وقابلة للمقارنة مع بعض طرق الكسح الجذري الأخرى (Gil,M.I.et al;2000)
- ✓ يسمح تطبيق هذا الاختبار بفهم مختلف الظواهر الكيميائية وله مزايا واضحة، مثل التكلفة المنخفضة، وسهولة إجراء التجارب، والتطبيق في درجة حرارة الغرفة، وهو يشرح سبب استمرار المجتمع العلمي في تطبيق اختبار DPPH (Irina Georgiana Munteanu.et al;2021).

- ✓ مجال الواسع للمذيب المستعمل حيث أنها تتوافق مع المذيبات العضوية المائية القطبية والغير قطبية (Denys.Charls;2013).
- ✓ تسمح بتقييم المركبات المضادة للأكسدة المحبة للماء والدهون في نفس الظروف التجريبية وبدون استخدام عوامل التثبيت (Denys J.Charls;2013).

- ✓ قادرة فقط على القياس المباشر مع جذور DPPH والتي تعتمد على هيكل مركب المضاد للأكسدة بالإضافة إلى أنها لا تتطلب العديد من الكواشف باهضة الثمن (Denys.Charls;2013).
- كما تضمن كذلك بعض العيوب منها:

- ✓ نظرًا لأن مركز النيتروجين يعوقه بشدة ثلاث مجموعات فينيل، فإن DPPH يمثل نموذجًا ضعيفًا للكسح الجذري في الجسم الحي وفي عينات الغذاء (Schaich, K.et al;2015)
- ✓ عند التعرض للضوء، يميل امتصاص DPPH إلى الانخفاض، الأمر الذي يتطلب تحليلًا في الظلام (Min,D.B.;Boff,J.M;2002)

- ✓ وجود بعض مضادات الأكسدة مثل الكاروتينات لها أطياف تتداخل مع DPPH (مجال إمتصاصها) (Denys.Charls;2013).
- ✓ لا يمكن إذابة جذور DPPH إلا في المذيبات العضوية (Denys.Charls;2013).
- ✓ غير محكوم بشروط تجريبية دقيقة (درجة الحرارة و درجة الحموضة و تركيز العينة) مما يؤثر على دقة الفحص (Denys.Charls;2013).

1.1.3.5.II المنهجية العامة لإستعمال إختبار DPPH مخبريا:

- الكواشف والمواد المستعملة في إختبار DPPH :
 - ✓ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)
 - ✓ Methanol(CH₃OH) or ethanol(C₂H₅OH)
 - ✓ distilled water (H₂O)
- تحضير الكاشف DPPH والمحلل القياسي:
 - ✓ يتم تحضير حجم معين من محلول DPPH وذلك بإذابة كتلة g من DPPH الصلب في (250ml) في (CH₃-OH) إذا كانت العينة المدروسة مائية أو (C₂H₅OH) في حال المستخلصات زيتية أو زيوت طيارة.
- تحضير محلول المرجعي: يتم تحضير حجم معين من حمض الأسكوربيك مثلا وذلك بإذابة حجم من (CH₃OH) أو (C₂H₅OH) ذو تركيز معين، وإطلاقا منه يتم تحضير محاليل ممددة حيث يتم التمديد بمحلول موقفي وذلك قصد المقارنة بين فعالية المستخلصات المدروسة بالمركبات المضادة للجذور الحرة وللأكسدة (PH=7.4)
- ✓ بعدها يتم أخذ حجم معين من كل محلول ممدد لحمض الأسكوربيك ونضيف له نفس الحجم من محلول DPPH ثم نقوم بالرج إلى أن يتجانس المحلول، يتم وضع أنابيب الإختبار في الضلام لمدة 30 دقيقة عند درجة حرارة الغرفة.

✓ يتم بعدها أخذ الأنابيب في جهاز (UV-VIS) وقراءة الإمتصاصية عند الطول الموجي الأعظمي (517nm)

• تحضير العينة التشخيص الطيفي:

بنفس الطريقة التي عومل بها حمض الأسكوربيك في التحضير نعامل بها المستخلصات العضوية .

• التحليل الرياضي البياني:

يتم رسم المنحنى البياني للمستخلصات العضوية (نسبة التثبيط % I بدلالة التركيز C)، حيث يتم حساب النسبة المئوية للتثبيط من

خلال العلاقة التالية:

$$I\% = [(A_0 - A_r)/A_0] * 100$$

حيث أن:

A_0 : الإمتصاصية الضوئية للجذر DPPH في غياب المستخلصات.

A_r : الإمتصاصية الضوئية للخليط (جذر+مستخلصات) بعد مرور 30 دقيقة

بعد رسم المنحنى البياني للمستخلصات العضوية و هو عبارة عن معادلة مستقيم من الدرجة الأولى يمر بالمبدأ و حمض الأسكوربيك المأخوذ كمرجع قياسي يتم خلالها تحديد التركيز المناسب للمستخلص العضوي و حمض الأسكوربيك على تثبيط %50 من الجذور الحرة و التي يعبر عنها بوحدة IC_{50} هي معرفة بتركيز المحلول بوحدة (g/l) بالنسبة للمستخلصات الخام أو ب (mM) بالنسبة للمركبات النقية معلومة الكتلة المولية لتثبيط من حيث كلما كانت قيمة IC_{50} صغيرة كانت فعالية مضادات الأكسدة كبيرة (Arouma, O.I; 1998, Baublis, A.J., et al; 2000).

2.3.5.II إختبار الجذر الكاتيوني ABTS المعبر عنه بالترولولوكس المكافئ (TEAC) :

Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay or (ABTS⁺):

(L'acide 2,2'azino(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic) ABTS

تم إقتراح هذا الإختبار لأول مرة من طرف (Miller et al; 1993)، حيث إستند إختباره الأصلي على التنشيط الأنزيمي بتوليد

جذور الهيدروكسيل HO[•] لإنتاج الجذر ABTS عن طريق تفاعل الميتوغلوبيين (Met-Myb) مع بيروكسيد الهيدروجين (Nabeelah

Bibi Sadeer et al; 2020). من خلال تفاعل الموضح في شكل في وجود أو غياب مضادات الاكسدة الذي تم تطويره لاحقا من قبل (Re,

R.et al; 1999) على إعتبار أن التقنية المستخدمة أدت إلى إشكالية توصل من خلالها أنه يمكن لمضادات الأكسدة التقليل من جذور

الهيدروكسيل HO[•] الموجودة في النظام (ABTS + Met-Myb) مما يؤدي إلى المبالغة في تقدير قيم مضادات الأكسدة الناتجة

(Nabeelah Bibi Sadeer et al; 2020)، و قد تضمن تطويره في كيفية إنشاء الجذر الكاتيوني (ABTS⁺) عن طريق تفاعل

كيميائي واحد في مكون من مرحلتين (Schaich, K.et al; 2015; Miller, N.et al; 1997) يعتمد هذا الإختبار على قدرة مضادات

الأكسدة على إستقرار الجذور الحرة الموجبة (ABTS⁺) ذو لون أزرق مخضر، حيث يتم تكوين هذا الجذر الكاتيوني بعد أكسدة

(ABTS) عديمة اللون في البداية. فوفق لدراسات سابقة مذكورة يمكن للمركب (ABTS) أن يتأكسد بعدة مؤكسدات للحصول على

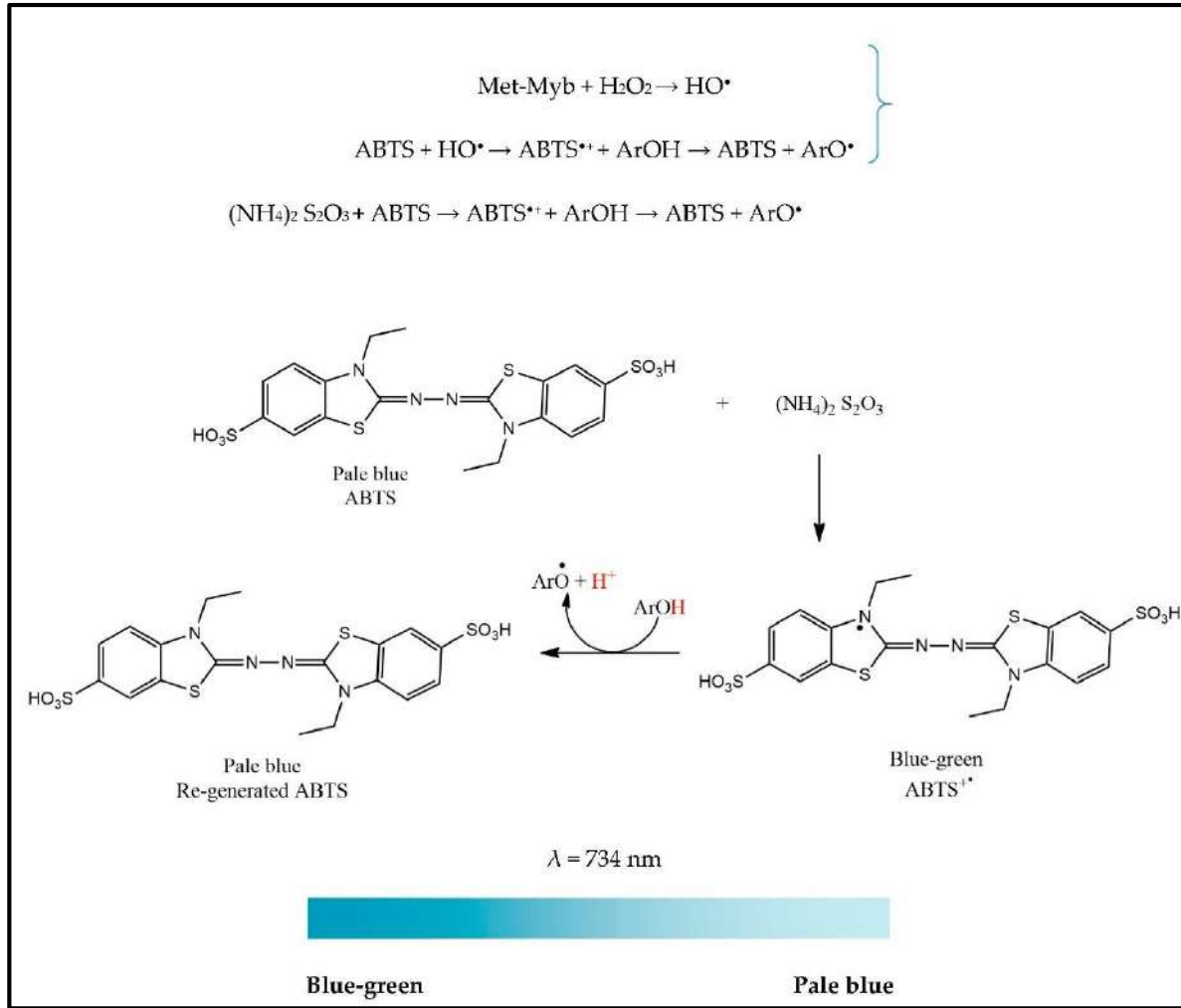
(ABTS⁺) مثل (K₂S₂O₈) (Re, R.et al; 1999)، (MnO₂)، (KH₂PO₄)

وتتم هذه الآلية وفق مرحلتين:

✓ المرحلة الأولي يتم تكوين ABTS⁺ ذو لون أزرق عن طريق تجريد ABTS بتمزيق إلكترون من ذره النيتروجين من

ABTS باستخدام كواشف (مؤكسدات) مختلفة.

✓ تحدث في المرحلة الثانية تفاعل $ABTS^{+}$ الناتج مع معظم مضادات الأكسدة لاسيما الفينولات و الثيولات مانحة H^{+} مما يؤدي إلى تشكل $ABTS - H^{+}$ و تغير لون لمحلول حيث يفقد لونه الأزرق و يستعيد حالته المحايدة عديمة اللون مع إنخفاض في الإمتصاصية (Amina Boudjada;2018).



الشكل 27: آلية التفاعل الجذر الكاتيوني ABTS

و من المثير للإهتمام أن المركب $ABTS^{+}$ قد يمتص بأطوال موجية مختلفة وهي 415 و 645 و 743 و 815 نانومتر، و مع ذلك فقد اعتمد معظم الباحثين الطول الموجي البالغ 743 nm لأنه يتم التخلص من التداخلات المحتملة و تقليل العكارة عن هذا الطول الموجي (Opitz,S et al;2014)، كما يتيح هذا

المركب قابلية ذوبانه في الماء و المذيبات العضوية و على مجال واسع من الأس الهيدروجيني مما يؤدي إلى تحديد قدرة مضادات الأكسدة لكل من المركبات المحبة للماء و الدهون (Irina Georgiana Munteanu.et al;2021) . وكغيره من مجمل الإختبارات لتقدير النشاط المضاد للأكسدة فقد إنطوى على العديد من الميزات منها:

✓ إستقرار الجذر الكاتيوني ل ABTS لاكثر من يومين عند تخزينه في الضلام و في درجة حرارة الغرفة و في درجة حرارة الباردة يزداد الحفاض عليه لأكثر من شهر على عكس الذي يتمتع بعمر قصير إلى حد ما (Re, R.et al;1999) . تسمح اختبارات TEAC بتحديد مجموعة كبيرة و متنوعة من المواد المضادة للأكسدة، لأن $ABTS^{+}$ جذري يتفاعل بسرعة مع كل من المواد المضادة للأكسدة الاصطناعية و الطبيعية (مثل الفينولات و الأحماض الأمينية و الببتيدات و فيتامين E و فيتامين C) في مكونات الغذاء (Walker, R.B.et al; 2009).

✓ الجذور الكاتيونية ABTS قابلة للذوبان في كل من الوسائط العضوية و المائية على عكس جذر DPPH، الذي يذوب فقط في الوسط العضوي. وبالتالي، يمكن استخدام مقايسة ABTS لفحص كل من العينات المحبة للدهون و الماء (Kim, D.-O.et al2002).

كما تضمن بعض النقايس هي:

✓ غالبًا ما يتم انتقاد اختبار ABTS لأن $ABTS^{+•}$ جذري غير موجود بشكل طبيعي (غير موجود في أي نظام بيولوجي) ويجب إنتاجه كيميائيًا وهكذا، جادلت بعض الدراسات بأن $ABTS^{+•}$ جذري لا يمكن أن يمثل في نظام بيولوجي (Magalhães, L.M. et al;2008).

✓ رد فعل بطيء لتوليد $ABTS^{+•}$ جذري، والذي يستغرق حوالي 12-16 ساعة مقارنة بـ DPPH، وهو متاح بسهولة تجاريًا (Nabeelah Bibi Sadeer et al;2020).

✓ مثل DPPH، يُظهر $ABTS^{+•}$ جذري عائقًا فاصلاً عاليًا حول ذرته التي تركز على النيتروجين، وبالتالي لا يمثل نموذجًا جيدًا للجذور شديدة التفاعل، وهي $OH•$ ، $NO•$ ، $O_2•-$ أو LOO، والتي موجودة في العديد من العينات البيولوجية (Schaich, K. et al;2015).

1.2.3.5.II المنهجية العامة لإستعمال إختبار ABTS مخبريا: وفقا للبروتوكول المقترح من طرف (Re et al;1999)

• الكواشف والمواد المستعملة في الدراسة:

✓ 2,2-Azinobis(3-ethylbenzothiozoline-6-sulphonic acid) disoddiu salt (ABTS)

✓ potassium persulfate (K_2SO_4)

✓ Methanol(CH_3OH) or ethanol(C_2H_5OH)

✓ distilled water (H_2O)

• تحضير كاشف $ABTS^{+•}$:

يتم إذابة ABTS بتركيز (7mM) في الماء المقطر، بعد ذلك يتم تكوين المركب $ABTS^{+•}$ عن طريق تفاعل (7mM) من ABTS مع 2.45mM من (K_2SO_4) بنسبة (1:0.5) يحضن الخليط في درجة حرارة الغرفة وفي الضلام لمدة تتراوح بين 12 إلى 16 ساعة.

• تحضير العينة والقراءة الطيفية:

قبل البدء في الاختبار يتم تخفيف المحلول المحضر مسبقا بالميثانول أو الإثانول حتى يتم الحصول على قيمة إمتصاص تقدر ب (743nm).

يتم أخذ (1ml) من المستخلص المراد إختباره ويضاف له (2ml) من محلول $ABTS^{+•}$ المحضر، يخلط ويحضن المزيج في الضلام عند درجة حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة.

يتم قياس الإنخفاض في الإمتصاصية بجهاز (UI-VIS) و التعبير عن النتائج كمكافئ لمركب قياسي(ترولوكس، حمض الأسكوربيك، حمض الغاليك، BHA، أو BHT) للمقارنة عن طريق حساب النسبة المئوية للتثبيط وفق معادلة التالية:

$$I\% = [(A_{control} - A_{Extrait}) / A_{control}] * 100$$

4.5.II إختبارات أوأليات نشاط مضادات الأكسدة في الجسم:

وهي الاختبارات التي تدرس مكانية مضادات الأكسدة عند دخولها العضوية و بالتحديد داخل الخلية من إمتصاص و إستقلاب و كيفية تفاعلاتها.

1.4.5.II إختبار حمض ثيوبارباريك (TBA): Thiobarbituric Acid Reactive Species (TBARS) Assay

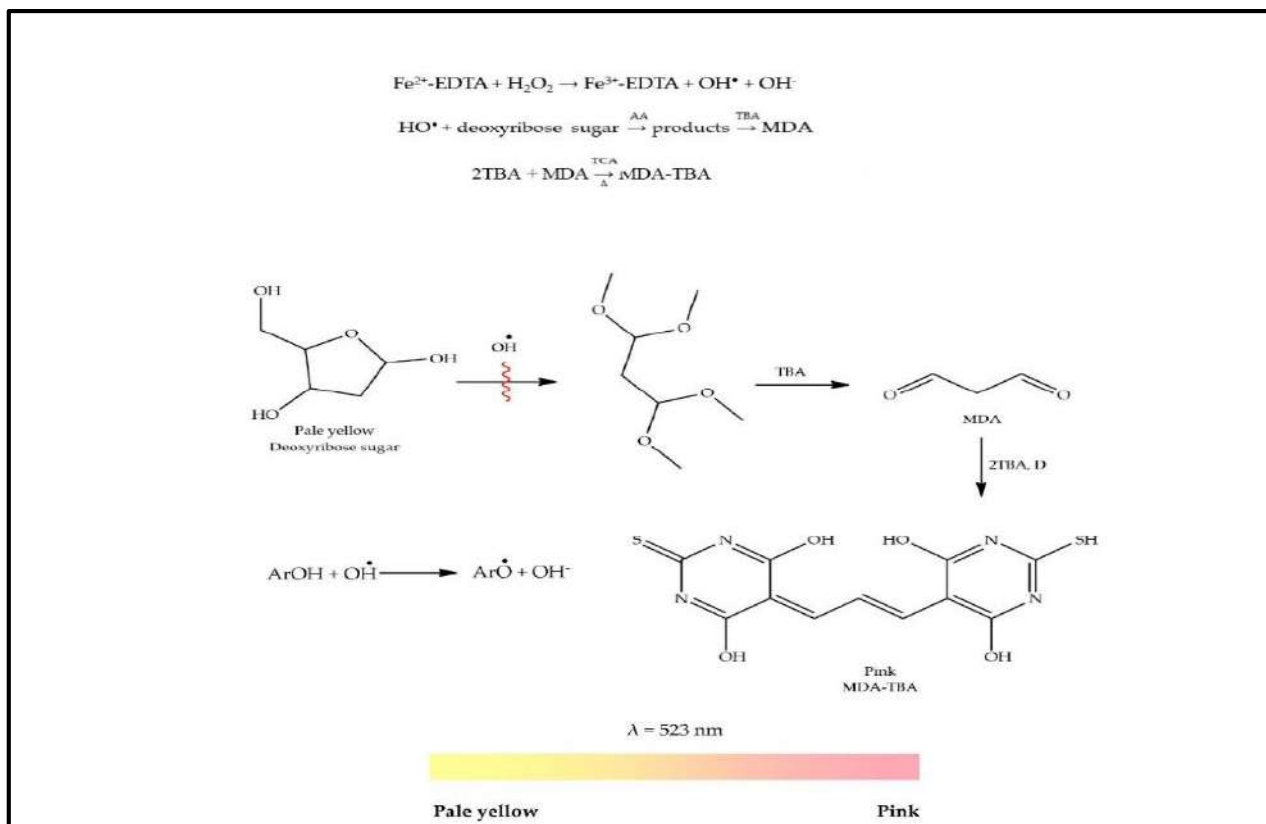
تعد جذور الهيدروكسيل من بين أكثر الأنواع الأكسجين التفاعلية (ROS) والتي يمكنها أن تؤدي إلى إتلاف أغشية الخلايا و تدمير مجموعات السكر و تسلسل قواعد الحمض النووي في أنضمتنا البيولوجية بتفاعلها مع شقوق الأحماض الدهنية المتعددة غير المشبعة التي يمكن أن تتلف غشاء الخلية (Alam, M.N. et al; 2013).

إختبار الأنواع التفاعلية لحمض الثيوباربيتوريك (TBARS)، التي أكتشف من قبل (Kohn and Liversedge; 1944)، أين تم استخدامه في البداية لتحديد معدل التفاعل بين جذور الهيدروكسيل و المركبات ذات الأهمية العلاجية. بعدها أتى (Ptton and Kurtz; 1955) وهو أول من استخدم هذا التفاعل لإكتشاف الأكسدة التلقائية في الأغذية و بالتحديد في دهون الحليب، إذ تحقق هؤلاء أن الإمتصاص الذي تم الحصول عليه من تفاعل دهن الحليب المؤكسد مع TBA كان مشابه لذلك الذي تم الحصول عليه من تفاعل MDA و الكاشف TBA.

عرف هذا الإختبار والذي كان يشار إليه سابقا أنه مقياس ل (MDA) إهتماما واسع النطاق بتوفير معلومات قيمة عن الضرر الناجم أثناء الأكسدة التلقائية للجذور الحرة و كذلك بيروكسيد الأحماض الدهنية للأطعمة الناتج من المصادر الحيوانية و النباتية، بعدها أصبح TBA يتفاعل مع عدد من المواد المتفاعلة منها (Alkanal, Alkadial...) حيث أصبح يرمز له ب (TBARS) (Benjamin M. Dorsey, Marjonie A. Jones; 2017).

يعد المركب MDA العلامة البيولوجية و المركب العضوي الذي يشير إلى الإجهاد التأكسدي فيما يتعلق بتقدير بيروكسيد الدهون في سوائل الجسم و الخلايا وهو عبارة عن منتج ثانوي الناتج من أكسدة الأحماض الدهنية الغير مشبعة (D. Mark. Hodges. et al; 1999) وهو أدهيد و واحد من الأنواع التفاعلية التي تسبب الإجهاد السام في الخلايا وتشكل روابط مع البروتين و التي يشار إليها المنتجات بالنهاية للأكسدة و الذي يتم استخدامه كمؤشر حيوي لقياس مستوي الإجهاد التأكسدي في الجسم (Farmer and Davoine; 2007).

يتمثل هذا الإختبار والتي يشار إليه باختبار المواد التفاعلية (TBARS) بتفاعله العام لتشكيل قاعدة شيف بإتحاد جزئيين من TBA مع MDA بعد تشكلها مسبقا لتكوين مركب مكثف أحمر عند إمتصاص 535nm وفق التفاعل التالي:



الشكل 28: آلية التفاعل لإختبار حمض ثيوبارباريك (TBA)

على الرغم من أن هذه التقنية حضت بالإهتمام الواسع و الفائدة لقياس الاكسدة التلقائية في الكشف عن التغيرات المؤكسدة و التي تحدث في النضم البيولوجية و الغذائية بواسطة عوامل مؤثرة مثل (الأوكسجين و الحرارة و الضوء أو وجود محفزات متسلسلة مثل آثار العناصر المعدنية)، إلا أن آلية هذا التفاعل لم يتم توضيحها بالكامل إلى جانب ذلك فإن هذا التفاعل قليل الخصوصية لأن الأليدهات الأخرى الموجودة في الطعام بإمكانها التفاعل مع الكاشف مما يعطي مركب ملونا و الذي قد يعسر من التقييم الكلي لأكسدة كما أنه قليل الحساسية و الإنتقائية ، لأن TBA تتفاعل مع مركبات مختلفة ، وهي السكريات و الأحماض الأمينية و البيبيريوبين و الألبومين، إضافة إلى ذلك فإن MDA غير مستقر لفترة طويلة من الزمن، لأنه يتأكسد إلى كحول و أحماض (Grotto, D.et al;2009) .

1.1.4.5.II المنهجية العامة لإستعمال إختبار TBA :

• الكواشف و المواد المستعملة في الإختبار:

- ascorbic acid (C₆H₈O₆) ✓
- Deoxyribose(C₅H₁₀O₄) ✓
- phosphate buffer ✓
- ferric chloride(FeCl₃) ✓
- hydrogen peroxide (H₂O₂) ✓
- ethylenediamine tetraacetic acid (C₁₀H₁₆N₂O₈) (EDTA) ✓
- trichloroacetic acid (C₂Cl₃OOH) (TCA) ✓
- thiobarbituric acid (C₄H₄N₂SO₂) (TBA) ✓

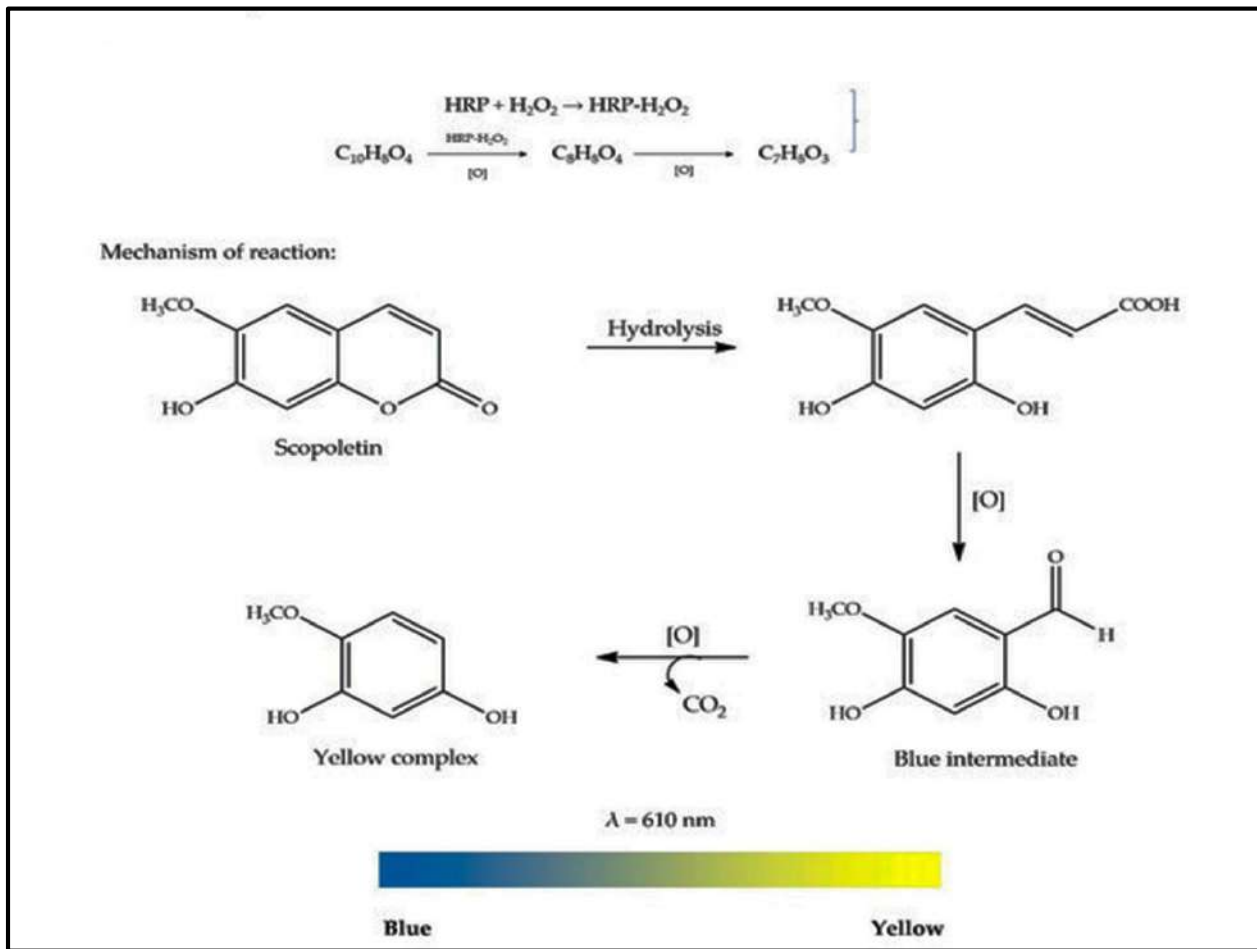
• تحضير الكواشف:

- ✓ يبدأ الإختبار عن طريق تفاعل EDTA مع Fe⁺² والذي يتفاعل بعد ذلك مع H₂O₂ لتوليد جذر HO[•] عن طريق تفاعل Fenton والذي يتطلب درجة حرارة حضانة 12°C لمدة 12 ساعة كما هو موضح في معادلة التفاعل التالية.
- ✓ يهاجم بعد ذلك الهيدروكسيل المتولد سكر C₅H₁₀O₄ في وجود (C₆H₈O₆) لغرض زيادة معدل التحلل لتشكيل مزيج من المنتجات كما هو موضح في معادلة 2
- ✓ يتم بعد ذلك تسخين المزيج الناتج مع thiobarbituric acid عند درجة حموضة منخفضة للحصول على المركب (malondialdehyde (MDA) كما هو موضح في معادلة التفاعل.
- ✓ بعد ذلك يتفاعل MDA مع جزيئين من TBA لتشكيل المركب الكروموجيني الوردى (2TBA- MDA) (Halliwell,B.et al;1987,Nimse, S.B.et al;2015)، حيث يتم خلاله تفاعل من C₅ الجزيئ الأول ل TBA مع C₁ من MDA و نفس الآلية تحدث بالنسبة للجزيئ الثاني ل TBA بارتباطه مع (TBA-MDA) وفق معادلة التفاعل الموضحة في المعادلة أعلاه .
- ✓ يتم قياس الأمتصاصية المركب المتشكل عند 523nm.

2.4.5.II إختبار بيروكسيد الهيدروجين: Hydrogen Peroxide Scavenging Assay

بعد اكتشاف O₂ بواسطة Lavoisier و Scheele و Priestley في القرن الثامن عشر، كان ثينارد أول من أبلغ عن تصنيع H₂O₂ في عام 1818 (Sies, H;2017) يعتبر بيروكسيد الهيدروجين مستقبلاً رئيسياً للأوكسجين الذي يتم إنشاؤه في الجسم الحي بواسطة الخلايا البلعمية المنشطة و إنزيمات الأوكسيديز، وهو عامل مضاد للميكروبات جيد للعديد من السلالات البكتيرية و الفطرية (Sánchez-Moreno, C;2002) .

يتم تقييم نشاط كسح H_2O_2 بناءً على إنزيم بيروكسيداز الذي يشتمل على بيروكسيداز الفجل (HRP)، وهو الإنزيم الأكثر استخدامًا في هذا الاختبار، حيث يستخدم هذا الاختبار عمومًا أكسدة السكوبوليتين بواسطة مركب $HRP-H_2O_2$ المتكون عند إضافة H_2O_2 حيث أن HRP السكوبوليتين هو (7-Hydroxy-6-methoxycoumarin) تستخدم لتقدير H_2O_2 . لها تآلق أزرق قوي تحت ضوء الأشعة فوق البنفسجية (Gnonlonfin, B.et al;2012) تتناسب شدة التآلق طرديًا مع تركيز السكوبوليتين أو تتناسب عكسًا مع تركيز السكوبوليتين المؤكسد (أي تركيز H_2O_2) (Corbett, J.T;1989) لذلك، يمكن قياس تركيز H_2O_2 إما عن طريق مراقبة الانخفاض في تآلق السكوبوليتين أو بملاحظة الزيادة في التآلق الناجم عن تكوين سكوبوليتين المؤكسد عندما يتم خلط H_2O_2 مع HRP، يتأكسد السكوبوليتين ($C_{10}H_8O_4$) بسرعة بواسطة ($HRP-H_2O_2$) لتشكيل وسيط ناتج أزرق ذو صيغة كيميائية ($C_8H_8O_4$)، والتي تمتص الضوء عند 560nm. ينتج تكوين هذا الوسيط عن فقدان التآلق الأزرق، حيث يتم استهلاك السكوبوليتين في التفاعل، يتأكسد الوسيط الأزرق ببطء إلى مركب أصفر غير قابل للذوبان ($C_7H_8O_3$)، والذي يمكن قراءته إما عند 402-417nm أو عند 385nm وفق التفاعل الموضح في شكل: (Gnonlonfin, B;2012, Marquez, L.A;1995, Miller, R.W.et al;1975)



الشكل 29: آلية التفاعل بيروكسيد الهيدروجين

ومع ذلك فإن إضافة مضادات الأكسدة محتملة ستمنع حدوث عملية الأكسدة، وبالتالي، تعيق تكوين المركب الأصفر (Halliwell, B;1990).

على الرغم من سهولة هذا الإختبار في الحصول على الكواشف وحساسيته وإنتقائيته خاصة فيما يحض بتحديد H_2O_2 في الخلايا إلا أنه ساه بعض النقائص منها:

✓ الركائز حساسة لدرجة الحموضة (Grisham, M.B;2013).

✓ يمكن أن تتنافس العديد من المواد المختزلة / أو مضادات الأكسدة مثل الثيول والأسكورات مع السكوبوليتين مما يؤدي إلى التقليل من تكوين H₂O₂ (Grisham, M.B;2013).

1.2.4.5.II المنهجية العامة لإستخدام إختبار بيروكسيد الهيدروجين مخبرياً:

• الكواشف والمواد المستعملة في الإختبار:

hydrogen peroxide(H₂O₂) ✓

phosphat buffer ✓

sodium chloride(NaCl) ✓

phenol red ✓

HRP ✓

sodium hydroxide(NaOH) ✓

• البروتوكول المتبع في إختبار بيروكسيد الهيدروجين:

✓ يتم تحضير العينة بإضافة (100µl) من العينة إلى(100µl) من hydrogen peroxide بعد ذلك يضاف 0.8 مل من sodium chloride من (100ml) و PH=7.4

✓ يحضن المزيج التفاعلي عند درجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة 10 دقائق.

✓ بعد فترة الحضانة يتم إضافة من الفينول الأحمر (1ml) إلى خليط التفاعل السابق مع (0.1 mg/mL)

$$I\% = [(A_0 - A_r) / A_0] * 100$$

(Ruch et al. 1989)

3.4.5.II إختبار تقدير الكسح الجذري لأكسيد النتريك: Nitric Oxide Radical Scavenging Assay

يتم إنتاج أكسيد النتريك من الأحماض الأمينية L-arginine الموجودة في الخلايا البطانية الوعائية، والخلايا العصبية المحددة، والخلايا البلعمية بواسطة الإنزيمات (Boora, F.et al;2014 Thomas, D.D;2015) عند التراكيز المنخفضة ، يلعب NO دورًا فعالاً في الأنشطة البيولوجية ، مثل النشاط المضاد للميكروبات ، والتأثير المضاد للأورام ، وتوسع الأوعية . ومع ذلك، يمكن أن تسبب المستويات العالية من أكسيد النتروجين العديد من المضاعفات الصحية، بما في ذلك المضاعفات الالتهابية مثل التهاب المفاصل والتهاب القولون التقرحي. يمكن أن تزداد سمية NO بشكل ملحوظ عند تفاعلها مع جذر الأكسيد الفائق (O₂⁻) لتشكل أنيون (peroxynitrit anion) شديد التفاعل (ONOO[•])، وقد أظهرت العديد من الدراسات أن مركبات الفلافونويد يمكنها التخلص بسرعة من جذور أكسيد النتروجين (Bhaskar, H.et al;2009, Lakhanpal, P.et al;2007).

لقياس نشاط الكسح الجذري لأكسيد النتروجين، تم تطوير تفاعل غريس لأول مرة في عام 1864 بواسطة كيميائي ألماني

يُدعى يوهان بيتر جريس (Griess, J.P., XVIII;1864)

تضمنت التجربة المعدلة تفاعل النتريت (R-NO₂) مع حمض السلفانيليك (SA)(C₆H₇NO₃S) في وسط حمضي، مما أدى إلى تكوين أيون الديازونيوم الذي يقترن لاحقاً بـ [N-(1-naphthyl) ethylenediamine] (NED) (C₁₂H₁₄N₂) لتشكيل صبغة أزرق قابلة للذوبان في الماء وذات لون أحمر (HO₃SC₆H₄-NN-C₁₀H₆NH₂) يمكن قياسها بطول موجة يبلغ

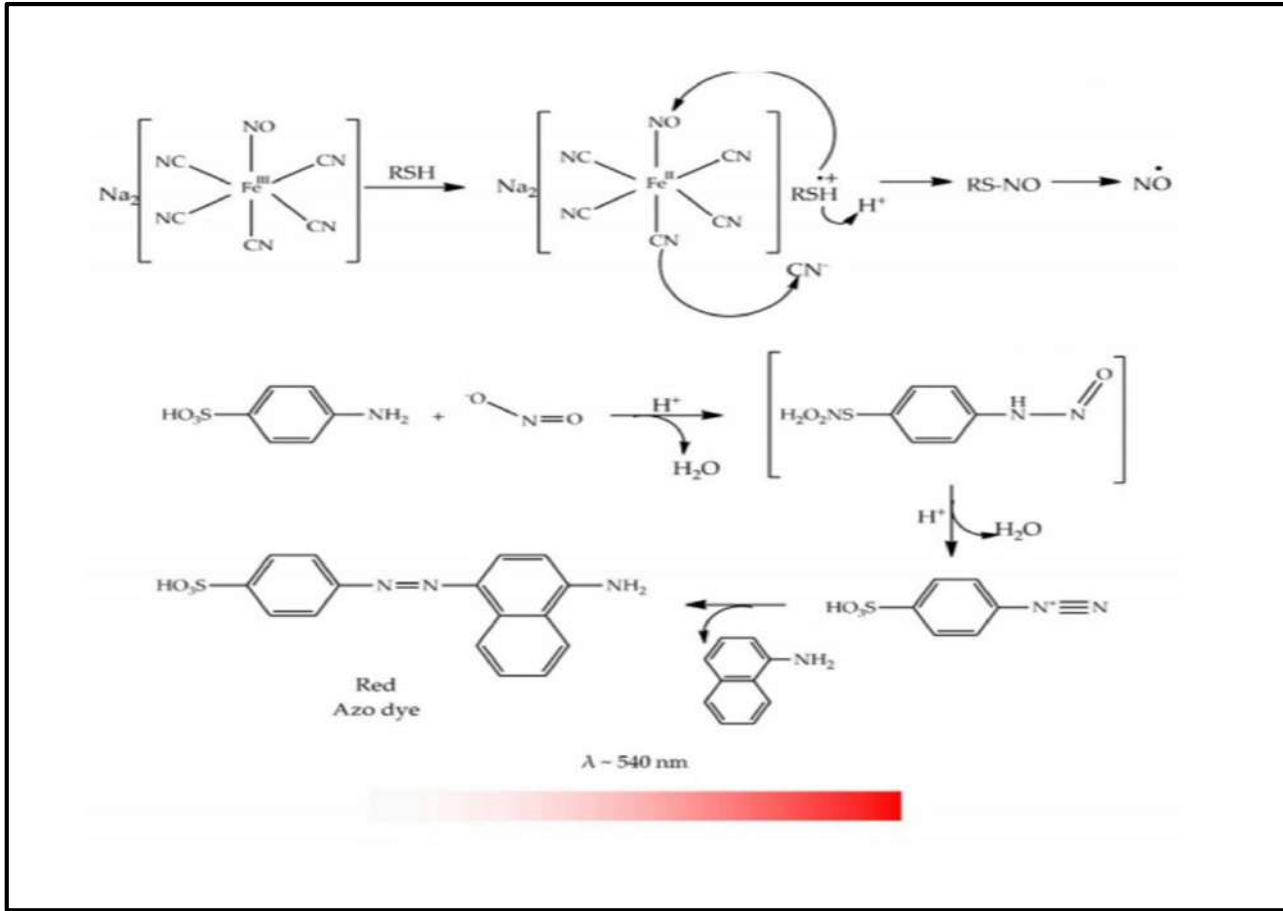
540 نانومتر (Tsikas, D;2007, Hetrick, E.et al;2009).

تتطلب الطريقة الأصلية تحسناً لزيادة قابلية التكرار والحساسية ووقت التحليل. يظهر الفحص المعدل نتائج جيدة في عدة

دراسات. و الذي يتم استخدامه الآن على نطاق واسع لفحص العينات لتحديد أنشطة إزالة الجذور الحرة (Tsikas, D;2007)

حيث يبدأ الإختبار بتوليد الجذري ل(NO[•]) باستخدام نيتروبروسيد الصوديوم ((SNP) Na₂[Fe⁺³](CN)₅(NO)) (Grossi,

(L.et al;2005) المعروف أنه يخضع لتدهور تلقائي في محلول مائي عند درجة الحموضة الفسيولوجية PH=7.2 لإنتاج (NO[•]) ، يمكن أن يتفاعل (NO[•]) مع O₂ لإنتاج النترات (NO₃⁻) و النتريت (NO₂⁻) كمنتجات مستقرة يمكن قياسها باستخدام كاشف Griess كما هو موضح في شكل التالي:



الشكل 30: آلية التفاعل كسح الجذري لأكسيد النتريك

1.3.4.5.II المنهجية العامة لإستعمال إختبار كسح جذور النيتروجين مخبرياً: (Zengin, G.et al;2014)

• المواد و الكواشف المستعملة في الإختبار:

✓ محلول موقى للفوسفات. (0.2 M, pH=7.4)

✓ Sodium nitroprusside (SNP): (Na₂[Fe⁺³](CN)₅(NO))

✓ ([N- (1-naphthyl) ethylenediamine])(NED): (C₁₂H₁₄N₂)

✓ Sulfanic Acid(SA): (C₆H₇NO₃S)

✓ Acetic Acid (CH₃COOH)

• بروتوكول التجريبي:

✓ تحضير كاشف Griess:

• يتم أولاً تحضير (2ml) الكاشف بمزج 1% من (SNP) مع 20% من (CH₃COOH)، ثم يحضن المزيج لمدة خمس دقائق في درجة حرارة الغرفة.

• بعد ذلك يضاف إلى المزيج السابق (1ml) من (NED) الغرض من إضافة NED هو زيادة قابلية الذوبان لمركب azo في الحمض وتعزيز الارتباط بين المركبات (Tsikas, D;2007) .

✓ توليد الجذري ل NO:

• يمكن أن تولد أكسيد النيتريك عن طريق إذابة SNP في محلول مائي عند درجة الحموضة الفيزيولوجية 7.2 الذي يمكن قياسه عن طريق تفاعل Griess

تحضير العينة الشاهدة: يتم تحضير نفس المحلول السابق بدون عينة (SNP+ كاشف Griess) و تحضن لمدة 30 دقيقة.

يتم قياس قيم الامتصاصية للشاهد والعينات عند 548 نانومتر. ثم يتم طرح امتصاص الشاهد من العينة. يتم التعبير عن النتائج إما كنسبة مئوية من تثبيط أو مكافئ للمركب القياسي (على سبيل المثال، ترولوكس).

✓ تحضير العينة والقراءة الطيفية:

- يضاف (3ml) من SNP إلى (10mM) من المستخلصات الموجودة في أنابيب الاختبار مع (0.2mM) من محلول موقى للفوسفاتتتحضن جميع أنابيب الاختبار في درجة حرارة الغرفة لمدة 150 دقيقة.
- يضاف إلى أنابيب الإختبار المحضرة (3ml) من كاشف Griess المحضر مسبقا.

$$I\% = [(A_0 - A_r) / A_0] * 100$$

6.II الطرق الكهروكيميائية لتقدير النشاط المضاد للأكسدة:

فكرة التحليل الكهروكيميائي لمضادات الأكسدة أقرحت بعد إعادة النظر جذريا في الطرق الطيفية المعتمدة في تقدير النشاط المضاد للأكسدة على المستويات الكمية أو الفاعلية للمواضيع المدروسة، حيث أن هذا الطرح الجديد وضعت له أسس و نظريات 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 (Tur'yan, Y. I. et al;2004)

1.6.II العوامل التي ساهمت في ظهور التقنية الكهروكيميائية:

أدت العديد من العوامل التي ساهمت بظهور الطرق الكهروكيميائية كبديل لتقدير الفعالية المضادة للأكسدة، منها ما يتعلق بالسليبيات و النقايس التي واجهت على استخدام الطرق الطيفية، منها ما يتعلق بالمزايا التي تتمتع بيها هذه الأخيرة للتحليل (ربيعي عبد الكريم؛2016)

2.6.II سليبيات و نقايس الطرق الطيفية:

على الرغم من تنوع الطرق الطيفية لتقدير الفعالية المضادة للأكسدة فقد بقي هناك الكثير من المشاكل والتحديات المطروحة بقوة للمختصين في هذا المجال نذكر منها: (Korotkova, E. I et al;2002) .

✓ أغلب الإختبارات الطيفية تعتمد على جذور صناعية مثل (DPPH) (ABTS) (AAPH) و هي جذور لا تشبة و لا تمثل

الجذور الناتجة في الأجسام الحية (Thaipong, K. et al;2006)

- ✓ 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 الفاعلية المضادة للأكسدة.
- ✓ عدم وجود معيار موحد للتقييم سواء من الناحية الكمية أو قيمة الفعالية.
- ✓ عدم وجود قواعد موحدة تحدد نسبة و المحتوى لمضادات الأكسدة (التركيز و التقدير الأفضل) .
- ✓ معرفة محدودة بمدى تأثير مضادات الأكسدة التي تكون في العادة عبارة عن مزيج من المركبات و مدى التوافق بين تركيباتها .
- ✓ أبحاث غير كافية عن تأثير درجة الحموضة، والمعالجة الحرارية أو الميكانيكية على النشاط المضاد للأكسدة للمركبات المدروسة.

✓ عدم وجود عينات مرجعية قياسية لتقييم الفاعلية المضادة للأكسدة.

✓ عدم وجود مصطلحات، و سلم قياس و تفاعلات نموذجية موحدة لتحديد النشاط المضاد للأكسدة

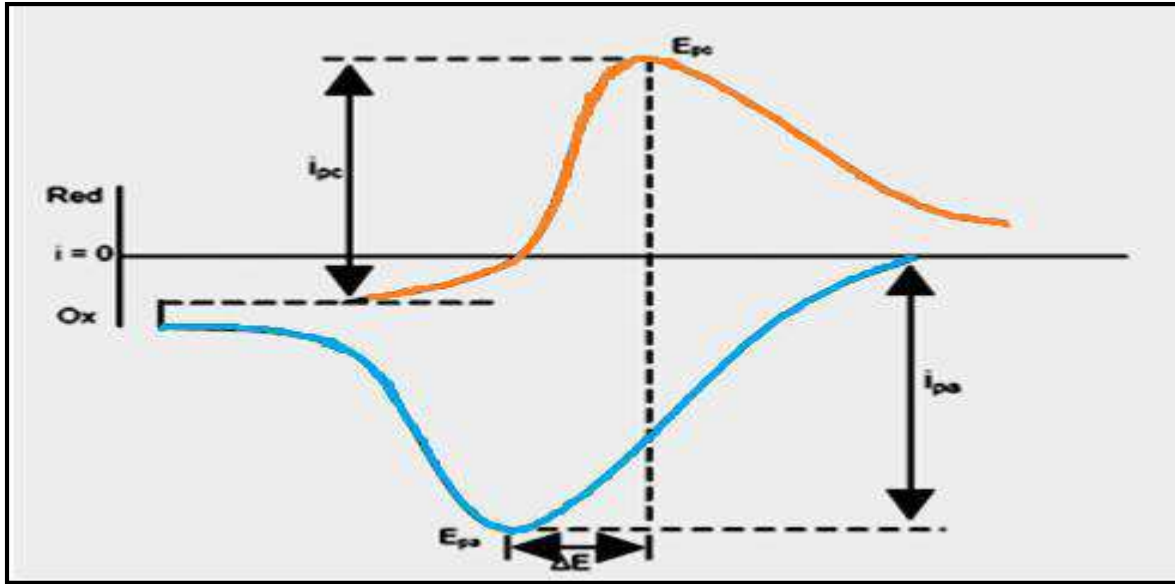
✓ إشكالية تقدير الفاعلية المضادة للأكسدة في بلازما الدم والأنسجة الحية، حيث العكارة تعيق عملية التقدير في الطرق الطيفية.

3.6.II مزايا الطرق الكهروكيميائية التحليلية:

- تتميز الطلاق الكهروكيميائية بالعديد من المزايا و الجوانب الإيجابية جعلتها تنصدر طرق التحليل الكيميائي سواء الكيفي او الكمي و تكون طريقة مقترحة كبديل للطرق الطيفية لتقدير مضادات الأكسدة، حيث نعدد منها ما يلي: (Galato, D.et al;2001)
- ✓ طرق يمكنها تحليل أي مادة و همها كانت طبيعتها و في أي وسط مختار (مائي، عضوي)،(حمضي، قاعدي).
 - ✓ تعتبر من أدق طرق التحليل.
 - ✓ تسمح لنا بدراسة تأثير العديد من العوامل على نشاط مضادات الأكسدة: كدرجة الحموضة، طبيعة الإلكتروليت، المذيبات و غيرها.
 - ✓ معظم العمليات الكيميائية و الحيوية، بما في ذلك عملية الإرجاع، تتم وفق آليات كهروكيميائية .
 - ✓ لا تتطلب إلا كمية محدودة من المادة المدروسة.
 - ✓ لا تتطلب كواشف أو مواد كيميائية ماعدا الإلكتروليت المساعد.
 - ✓ يمكن بهذه الطريقة تقييم النشاط المضاد للأكسدة في وسط ذو قيم PH مختلفة.
 - ✓ تتميز بحساسية عالية وإنخفاض تكاليفها.
 - ✓ تتيح إمكانات كبيرة للبحث في مجالات لا حصر لها مثل كيمياء و البيولوجيا و الطب (ربيعي عبد الكريم؛2016) .
- الحلول المبتكرة التي أقرحت في هذا المجال تحقق منها على المستويين النظري و النظري والعلمي، و هو تقدم لا يمكن إنكاره في التحليل الكهروكيميائي لمضادات الأكسدة، تم هذا لوضع أسس مستقبلية لإبتكار جهاز يمكنه تحديد كمية و فاعلية المواد المضادة للأكسدة سواء كانت مركبات معزولة أو معقد (ربيعي عبد الكريم؛2016)
- الطرق الكيميائية التي أقرحت وتم تجربتها تجريبها و أعطت نتاج مذهلة أهمها تلك التي طورت في روسيا في العقد الأخير أي في بداية من عام 2000 و التي تمثلت في: (ربيعي عبد الكريم؛2016)
- ✓ الطريقة الأمبيرومترية و التي أقرحت من طرف الباحث (Yashin, A. Y.et al;2006) .
 - ✓ الطريقة البوتونسيومترية أقرحت من طرف الباحثة (H.Z. Braynina) وتمكنت من تطويرها و الحصول على براءة إختراع (Kh. Z. Brainina.et al;2002) (Brainina, K. Z.et al;2007).
 - ✓ الطريقة الكالومترية من طرف الباحث (G.K. Budnikov) (Ziyatdinova, G. K.et al;2005, G Ziyatdinova al;2006) ، و الذي تمكن هو الآخر من تطويرها و الحصول على براءة إختراع (V.I. Pogorel'tzev.et al)
 - ✓ الطريقة الفولطامترية من طرف الباحث (Korotkova) (1 Korotkova, E. I.et al;2003)
- الطرق الكيميائية معضمها تعتمد على الطريقة المدروسة على خصائص المادة المدروسة و سلوكها على الأقطاب الصلبة , إذ يعتبر قطب الكربون الزجاجي من أكثر الأقطاب شيوعا في تطبيقات دراسة النشاط المضاد للأكسدة , و ذلك نظرا لخصائصه الفيزيائية و حساسيته للمركبات المضادة للأكسدة (Blasco, A. J.et al;2004) , و مع ذلك فالكثير من الباحثين درسوا أنواع كثيرة من الأقطاب المعدلة و إستعملوها في الكشف و تقدير مضادات الأكسدة منها: أقطاب الكربون المطبوعة (Bordonaba, J. G.et al;2012) أقطاب الكربون المعجونة بالبارافين (Wang, J.et al;2006) أو السلكون المطعمة بمواد عضوية أو غير عضوية. (Souza, L. P.et al;2001)
- ## 4.6.II الفولطامتريةالحلقي:
- تعد طريقة الفولطامترية الحلقي من طرق التحليل الكهروكيميائي ، و فيها تقاس منحنيات التيار-الجهد و التي تتم على قطب صلب ساكن، حيث تسمح هذه الطريقة بتحديد الشروط التي ينجز فيها تفاعل الأكسدة و الإرجاع و كذا تقدير درجة عكسية الجملة(أكسدة-إرجاع), كما تسمح أحيانا بتحديد آلية التفاعل عند الإلكترود خاصة خاصة عندما تشترك بتفاعلات كيميائية في نقل الإلكترونات فلألية إما أن تكون الكهروكيميائي-الكهروكيميائي EE، الكهروكيميائي-الكيميائي-الكهروكيميائي ECE ، الكهروكيميائي-كيميائي-EC و يظهر المخطط الفولطامترية على هيئة قمم مصعدية ومهبطية متعكسة تقريبا والتي تمثل عمليتي الأكسدة والإرجاع . (لقميري سهيلة؛2008)

وتعتبر الطريقة الفولطامترية واحدة من أكثر الوسائل الإنتقائية الحديثة المستخدمة لقياس نشاط مضادات الأكسدة للعينات البيولوجية أو الأنسجة أو المستخلصات النباتية (بن علي مصطفى؛ 2018) .

والشكل العام لمنحنيات الفولطامتري الحلقي موضحة في الشكل (بن ساسي حمزة؛ 2013)



الشكل 31: المنحني الجهدي التياراتي للفولطامتري الحلقي

حيث I_{Pa} ، I_{Pc} : تيارات النتوءات المصعدية والمهبطية

E_{Pc} ، E_{Pa} : كموناتا لنتوءات المصعدية والمهبطية

ΔE_P : التغير في الكمون اتبين I_{Pa} و I_{Pc}

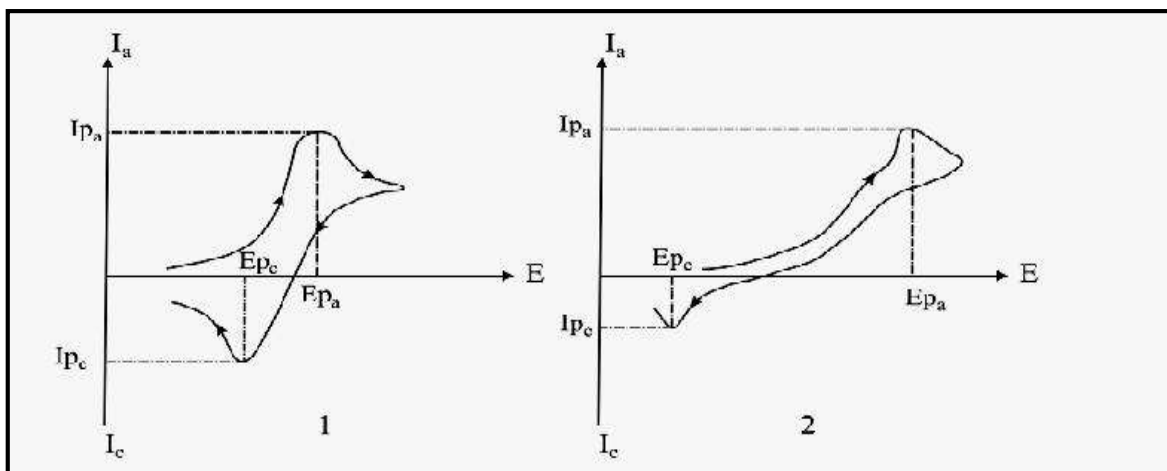
كما تسمح هذه الطريقة بدراسة عكوسية الانتقال الالكتروني فنحصل على نوعين من أنظمة جمل التحويل
✓ الجملة السريعة:

يكون فيها الفرق بين كمونات قمم النتوءات مستقل عن سرعة المسح.

$$\Delta E_P = E_{Pa} - E_{Pc} = 0.06/n$$

✓ الجملة البطيئة:

تكون فيها قيمة ΔE_P كبيرة وتتغير بتغير سرعة المسح



الشكل 32: منحنيات الجملة السريعة و البطيئة للفولطامتري الحلقي

1.4.6.II الأجهزة المستعملة في الفولطامتري الحلقي:

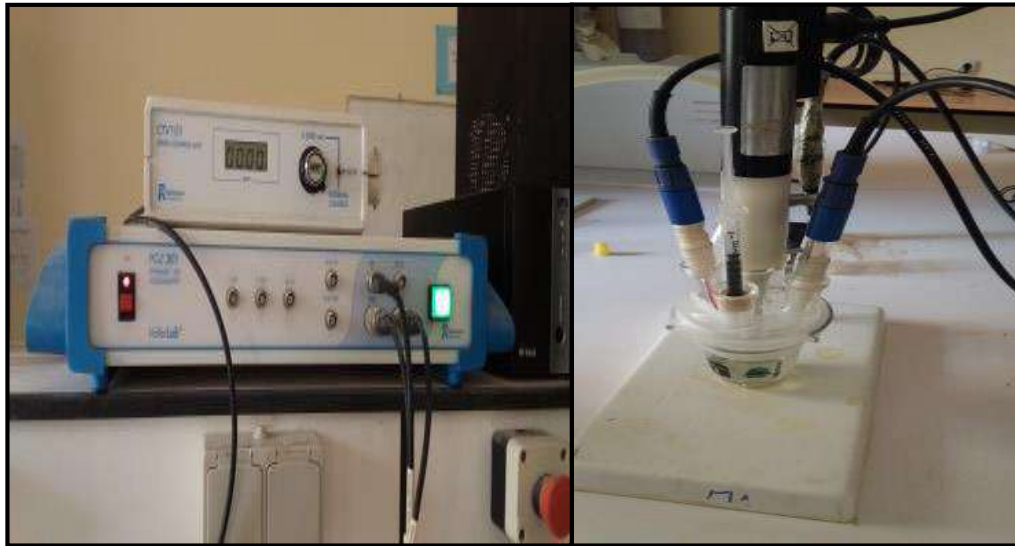
تتم دراسة السلوك الكهروكيميائي داخل خلية زجاجية مزدوجة الجدار غطاؤها يحتوي على خمس ثقوب. ثلاثة منها تسمح بدخول (الكتروود العمل، الكتروود المرجع، الكتروود المساعد)، أما الثقبان الآخران فأحدهما يسمح بتزويد الوسط بالأزوت الذي يعمل على نزع الأكسجين ويمكن أن يكون نشط كهربائياً، والثقب الآخر لإضافة المواد (لقميري سهيلة؛ 2008) كما هو موضح في شكل 33.

الكتروود العمل: هو عبارة عن أسطوانة من كربون زجاجي أو أسطوانة من البلاتين، حيث يتم تنظيف هذا الأخير بعد كل باستعمال ورق خاص يحتوي على مادة كاشطة بعدها ينظف بالماء المقطر ثم بالأسيتون، وهو الذي تتم فيه عمليات الأكسدة والإرجاع.

الكتروود المرجع: هو عبارة عن الكتروود من الكالومال المشبع بكلوريد البوتاسيوم (KCl).

الكتروود المساعد: هو عبارة عن كتروود مصنوع من البلاتين ذو قطر 0.5Cn يضمن مرور التيار الكهربائي.

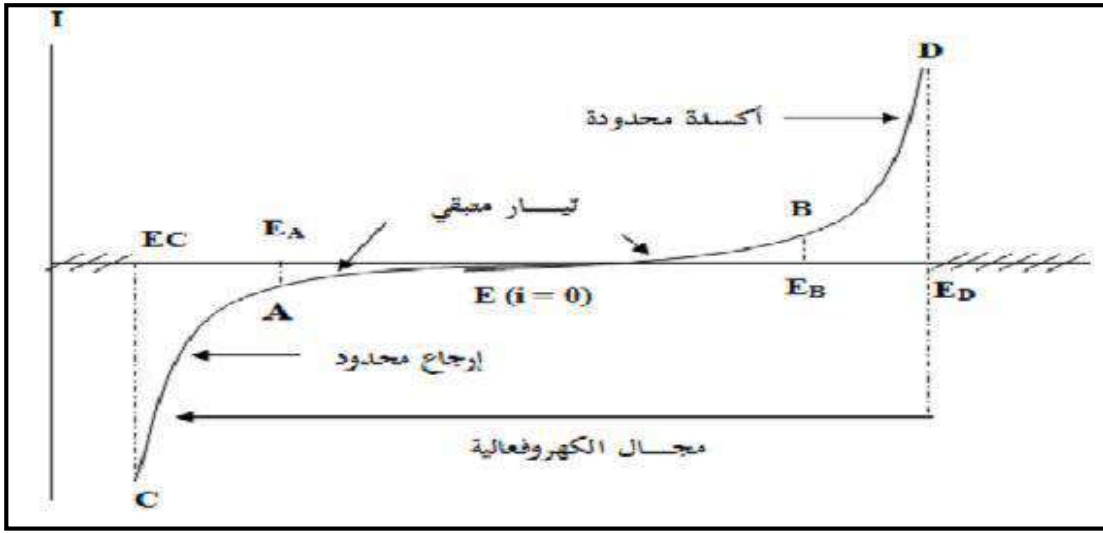
لتسجيل منحنيات التيار بدلالة الجهد المطبق يتم ذلك بواسطة جهاز Potentiostat موصول بجهاز الكمبيوتر كما هو موضح في الأشكال



الشكل 33: الأجهزة المستعملة في الفولطامتري الحلقي

2.4.6.II مجال الكهروفاعلية:

إن مجال الكهروفاعلية يتعلق بالمنحنى الفولطامتري الحلقي فقط الذي نتحصل عليه باستعمال الكتروود المرجع ومحلول الالكترووليت المساعد، منحناه العام يكون ممثل في الشكل التالي:



الشكل 34: مجال الكهروفعالية الفولطامتري الحلقي

الجزء AB: المحصور بين فرقًا لـ E_A و E_B يوافق التيار المتبقي والذي نقول بأنه تيار ضعيف جدًا، وبين القيمتين E_A و E_B لفرق الكمون توجد قيمة تكون التيار فيها معدوماً ($i=0$) تعرف بفرق الكمون التحليلي أو الإهمال.

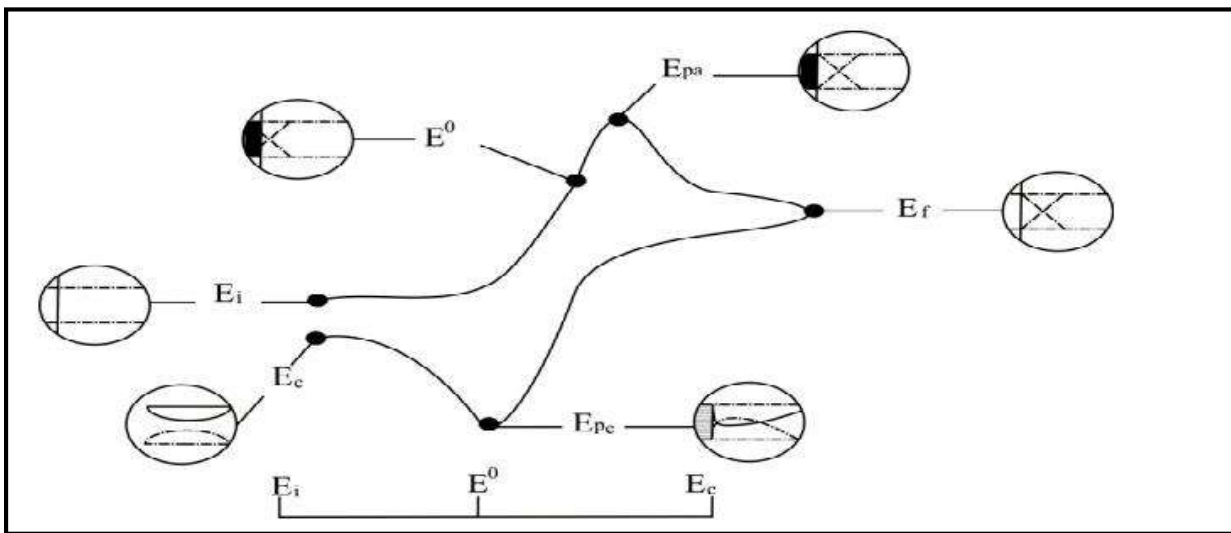
ينقسم منحنى الفولطامتري (الحلقة شبه مفتوحة (إلى قسمين : مصعد ومهبطي).

عند القيمتين للجزء AB تظهر تغيرات كبيرة للتيار توافق تفاعل إرجاع عندما تكون $E_A < E$ أو تفاعل أكسدة $E_B > E$. هذان التغيران لكبيران يقوم انبثاش كل واحد إذاً كمية التيار الحدي عند المصعد توافق فرق

الكمون EC لا يمكن تجاوزه، بينما توافق الكمية الكهربائية الحدية المصعدية فرق كمون حدي ED يستحيل الاستمرار بعده، و يعرف مجال فرق الكمون المحصور بين EC و ED بأنه مجال الكهروفعالية للمواد المضافة إلى محلول الكهروليت المساعد. (الصيدق

قمولي، 2010)

II.3.4.6 تفسير منحنى الفولطامتري الحلقي:



الشكل 35 : نقاط الرئيسية لمنحنى الفولطامتري الحلقي

إن تركيز المواد المتفاعلة والمواد الناتجة P المشار إليها في الشكل السابق عند فرق كمونات مختلفة تمثل Epa و Epc الكمون المهبطي والمصعدي على التوالي حيث:

- عند الكمون: E_i يكون تركيز المادة لفعالة R إلى C₀ في المحلول وكذلك عند الالكتروودات، أما تركيز ناتج التفاعل P من البيديهي أن يساوي الصفر.
- عند الكمون Epa: تنهى تركيز المادة لمتفاعلة R عند الصفر بجوار الالكتروود، في حين أن تركيز المادة الناتجة P تؤول إلى C₀ ما نفسره بظاهرة استهلاك المادة الكهروفاعلية بجوار الالكتروود بسبب سرعة المسح العالي.
- عند الكمون E_f: نتشر في المحلول ويتناقص مقدار التركيز حتى الثبات، P يزداد سمك طبقة الانتشار لأن المادة الناتجة ثم يعكس اتجاه المسح لفرق الكمونات.
- عند الكمون Epc: المادة الناتجة P الكهروفاعلية هي التيكون موجودة عندا لالكتروود وهي التي تخضع للاستهلاك فيتناقص تركيزها عند الالكتروود إلى أن يصل إلى الصفر، في حين تركيز المادة المتفاعلة يقترب مرة أخرى إلى C₀ ونعود إلى فرق الكمون الابتدائي من جديد (بن ساس يحمزة؛ 2013)

4.4.6.II المنهجية العامة لإستعمال الفولطامتري الحلقي في تقييم النشاط المضاد للأكسدة:

- المذيب المستعمل في الدراسة الكهروكيميائية:

يتكون الوسط من مذاب ومذيب حيث أن هذا الأخير يجب أن تتوفر فيه بعض الخصائص منها: (بن علي مصطفى؛ 2018)

✓ غير نشط كهربائياً في المجال المدروس

✓ يذيب المواد النشطة كهربائياً

✓ الناقلية الجيدة في المجال المدروس

✓ له درجة حرارة ثابتة

- الكهروليت المساعد في الدراسة:

من أجل الحصول على وسط ناقل، يجب إضافة أملاح في دور كهروليت المساعد مثل Bu₄NPF₆، على أن يحتوي على

مجموعة من الخصائص التالية: (بن علي مصطفى؛ 2018)

✓ الذوبانية الكبيرة في المذيبات المدروسة

✓ يجب أن يكون محايد كيميائياً عند درجة حرارة ثابتة

✓ مجال الكهروفاعلية له يجب أن يكون واسع قدر الإمكان

- البروتوكول المتبع في الدراسة:

✓ توليد النظام الجذري O₂ / O₂⁻:

يتم أخذ (0.1 mol) من محلول الإلكتروليت المساعد (Bu₄NPF₆) بمزجه في حجم معين من محلول عضوي لتزويد الوسط

بالأكسجين لمدة 10 دقائق .

تبدأ التجربة في هذه الحالة حيث الشروط المضبوطة من سرعة المسح ومجال الكمون المستعمل وتسجيل منحنيات الفولطامتري

لأرجاع الأكسجين مقارنة بالمسرى المرجعي (مسرى الكالومال المشبع).

✓ تحضير المحلول المرجعي (القياسي) :

يتم تحضير تركيز معين من المحلول القياسي و ذلك بإذابته في حجم معين من المحلول العضوي، و باستخدام حقنة بحجم 1 مل تتم إضافة المحلول القياسي تدريجيا و بحجوم مختلفة على خلية العمل بحيث يتغير التركيز عند كل إضافة و نرسم المنحنيات الفولطامترية الخاصة بكل إضافة عند نفس الشروط (سرعة المسح، الكمون المطبق، درجة الحرارة) .

✓ تحضير العينات المدروسة:

بنفس التقنية و تحت نفس الشروط التي عوم لبها المحلول المرجعي نعامل بها العينات المدروسة معلومة التركيز.

✓ تقدير الفعالية المضادة للأكسدة بيانيا:

عند رسم المنحنيات الفولطامترية للحجوم المضافة للمركب القياسي والمستخلصات نقوم بتحديد كثافة التيار المصعدية لكل فولطاغرام لرسم منحنى قياسي للمحلول المرجعي بدلالة التركيز.

$$i_{pa}=f(c)$$

حيث:

C: تركيز الكرسيتين او المستخلص

I_{pa}: كثافة التيار المصعدية ($\mu A/cm^2$)

من معادلة المنحنى الخطي نحدد قيمة الميل لكل من المركب القياسي والمستخلصات، نحدد الفعالية حيث تكون المركبات الأقل ميلا هي الاكثر فعالية.

✓ تحديد إجمالي الفعالية المضادة للأكسدة:

يتم تحديد إجمالي الفعالية المضادة للأكسدة للعينات المدروسة وذلك من خلال قدرة القدرة على كبح الجذر الحر $O_2^{\cdot-}$ والذي يحسب من خلال تحديد قيم كثافة التيار من القمة المصعدية للفولطاغرام الحلقي المتغيرة بدلالة تركيز العينات المحدد حيث تحسب نسبة التثبيط وفق العلاقة التالية:

I%: نسبة تثبيط عامل المضاد للأكسدة لجذر

I_{pa}: تيار الأكسدة للجذر الحر في وجود العينة

: تيار الأكسدة للجذر الحر في غياب العينة (الصدیق قمولي؛2010)

الفصل الثالث

دراسات سابقة حول تقدير الفعالية المضادة للاكسدة

III. توطئة:

يعد أخذ و دراسة إشكاليات مثل هذا النوع لتقدير النشاط المضاد للأكسدة أمرا في غاية الأهمية، بعض النضر عما كانت الدراسات متعلقة بالغذاء أو النبات أو دورها في منظور صيدلاني إذ لوحظ أنه لحد الآن لا توجد مراجعة تفصيلية بشكل منهجي تتعلق بكل اختبار أو سبب اختياره و تطبيقه على عينات البحث، فخلال السنوات القليلة الماضية ازدادت طرق استخدام هذه الاختبارات بشكل ملحوظ بالرغم من كثافة هذه الدراسات العلمية إلا أنه أحدث جدلا كبيرا بخصوص إيجاد رأي موحد بين العلماء أو الباحثين في هذا المجال إذ تكمن صعوبة دراسة مثل هذا النوع من الأبحاث في عدم القدرة على المقارنة بين النتائج التي يتم جمعها على اعتبار و إن تمت المقارنة على سبيل المثال لا الحصر لفحص واحد أو عينة واحدة فقط يوجد احتمال ليس ببعيد عن ظروف إجراء التفاعل موحدة (كنوعية المذيب ظروف التجريبية أو المركب القياسي الذي أستند إليه في الدراسة)، و قد جاءت دراستنا لتسد الفجوة من خلال تحليل و نقد و حوصلة لبعض المراجع المنشورة التي تم من خلالها تطبيق و استعمال هذه الاختبارات دون الغوص مسبقا في ماهية السبب وراء استعمال اختبار معين دون غيره ، و تعتبر هذه الدراسة الأولى من نوعها مما يكسبها أهمية علمية و يجعلها استنادا للأبحاث القادمة .

1.III الدراسات المتعلقة بالبحث ذات صلة:

تم استعمال محرك البحث (SPINGER) من الأرضية الرقمية لنظام العالمي للتوثيف الوطني عن بعد(SNDL) : Systeme (National de Documentation en ligne)، أين تم اختيار 120 مقالة علمية بشكل عشوائي و تصنيفها حسب العام الذي نشرت فيه في حدود السنوات من 2015 إلى 2020 تناولت الفعالية المضادة للأكسدة بشكل تطبيقي.

✓ الكلمات المفتاحية:

- Antioxidants
- Activity Antioxidants
- Méthodes d'estimation de l'efficacité Antioxidants

من خلال ذلك يتم حساب النسبة المئوية لكل اختبار في كل سنة محددة بدلالة العدد الإجمالي وفق العلاقة:

$$\text{test\%} \left\{ \begin{array}{l} 100\% \longrightarrow Y \\ X \longrightarrow Z \end{array} \right.$$

حيث أن:

Y: العدد الإجمالي للاختبارات التي اختيرت بشكل عشوائي لعام محدد من 120 مقال.

Z: عدد الاختبار الواحد المطبق خلال عام معين.

X: النسبة المئوية للاختبار.

ملاحظة: قيم Y و Z معلومة.

تم بعد ذلك التطبيق على حوالي 19 اختبار يتم استعمالهم بشكل واضح خلال تقدير فاعلية المضادة للأكسدة، حيث تترجم النتائج للنسب المئوية المحصل عليها في جدول برنامج Excel ثم تحويلها إلى رسم بياني حيث :

- يتم تمثيل منحنيات بيانية للنسب المئوية لكل السنوات المحددة بدلالة كل اختبار.
- يتم تمثيل أعمدة بيانية للنسب المئوية كل اختبار لكل عام.

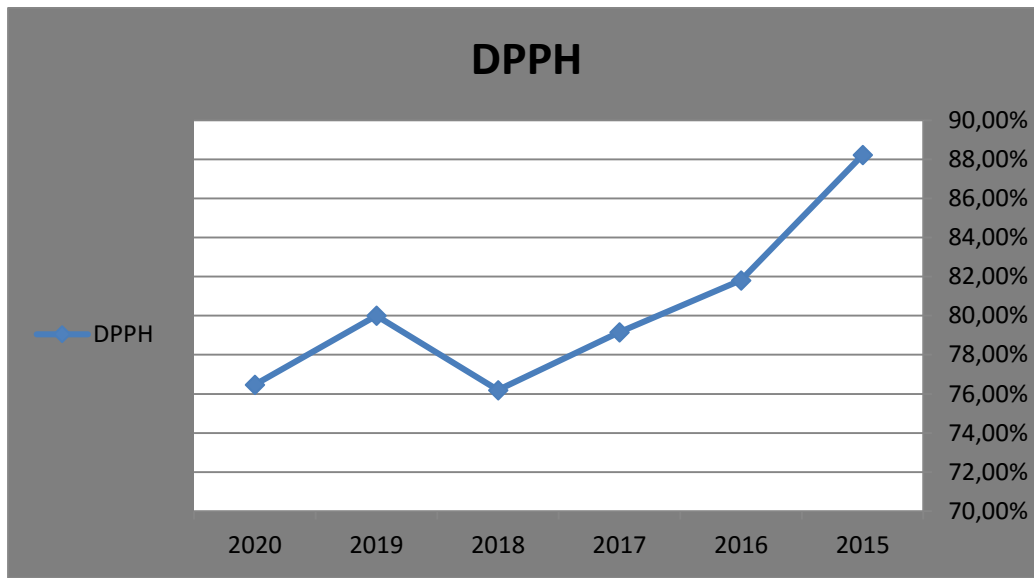
الجدول II: النسب المئوية إختبارات المدروسة خلال السنوات 2015-2020

2020	2019	2018	2017	2016	2015	
76.47%	80%	76.19%	79.16%	81.81%	88.23%	DPPH
76.47%	40%	57.14%	33.33%	27.27%	41.17%	ABTS
41.17%	32%	47.61%	37.50%	36.36%	35.29%	FRAP
5.88%	12%	0%	8.33%	9.09%	0%	CUPRAC
35.29%	20%	14.28%	16.66%	18.18%	11.76%	RP
11.76%	12%	9.52%	12.50%	9.09%	17.64%	PM
47.05%	24%	42.85%	41.66%	54.54%	35.29%	TPC
11.76%	12%	9.52%	16.66%	18.18%	11.76%	FR
11.76%	16%	0%	8.33%	9.09%	11.76%	ORAC
5.88%	4%	0%	0%	0.00%	0%	TRAP
5.88%	8%	0%	0%	9.09%	23.52%	BC
5.88%	8%	9.52%	12.50%	36.36%	29.41%	TBA
11.76%	4%	9.52%	25%	18.18%	17.64%	NO
29.41%	32%	33.33%	16.66%	0.00%	35.29%	HO
29.41%	4%	14.28%	12.50%	9.09%	23.52%	SR
11.76%	4%	0%	41.66%	0%	11.76%	HP
5.88%	0%	0%	0%	0%	5.88%	SO
0%	4%	9.52%	8.33%	18.18%	5.88%	CAA
5.88%	0%	0%	41.66%	0%	0%	M.Elctro

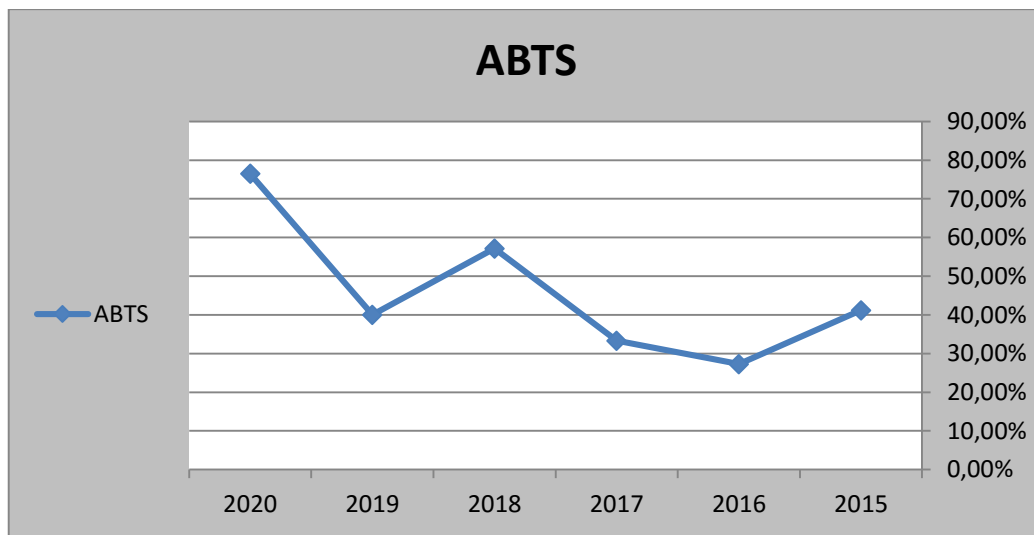
1.1.III التحليل:

1.1.1.III تحليل المنحنيات التي تمثل نسبة كل إختبار إلى السنوات المحددة حيث تم تقسيها إلى قسمين:

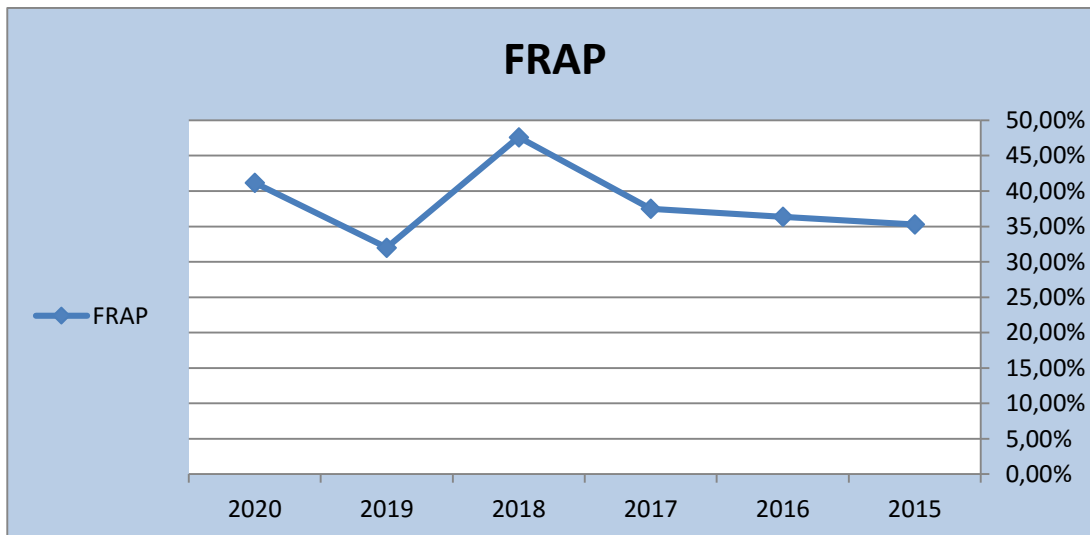
1.1.1.1.III القسم الأول: العلاقة الطردية للاستشهادات بدلالة سنوات الدراسة



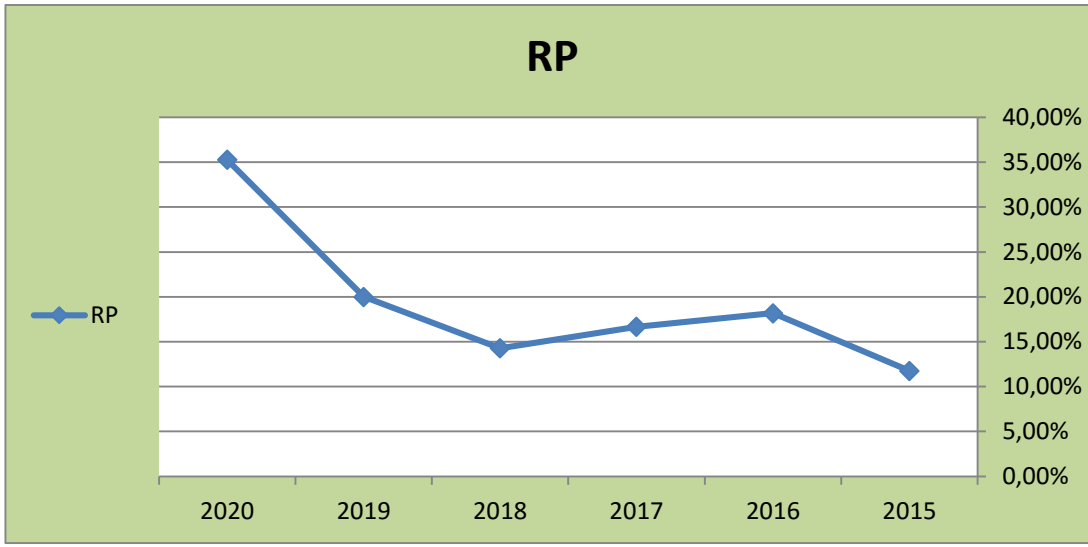
الشكل 36: منحنى بياني يمثل نسب اختبار DPPH بدلالة السنوات المدروسة



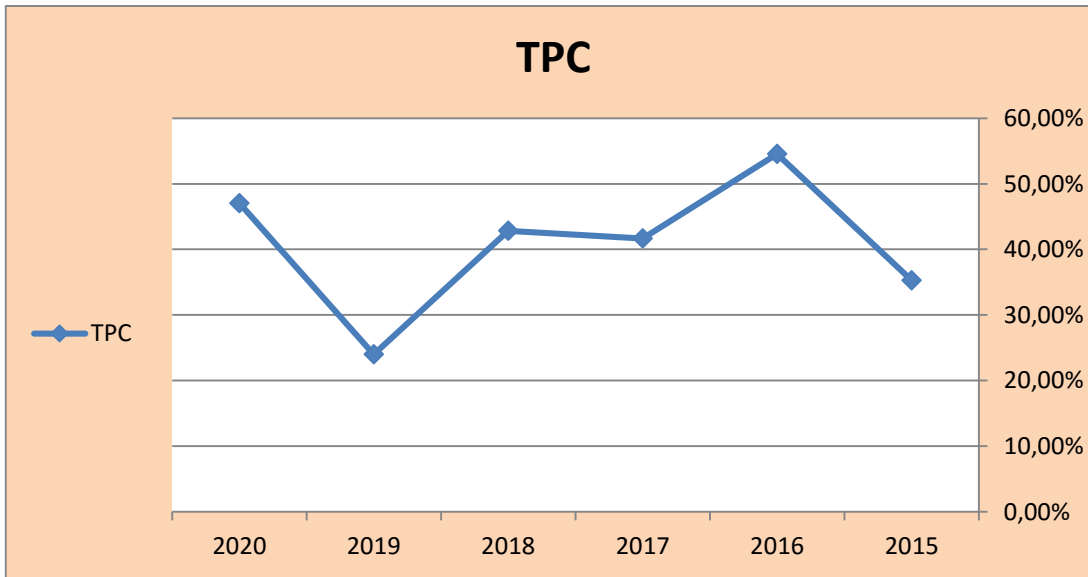
الشكل 37: منحنى بياني يمثل نسب اختبار ABTS بدلالة السنوات المدروسة



الشكل 38: منحنى بياني يمثل نسب اختبار FRAP بدلالة السنوات المدروسة



الشكل 39: منحنى بياني يمثل نسب اختبار RP بدلالة السنوات المدروسة



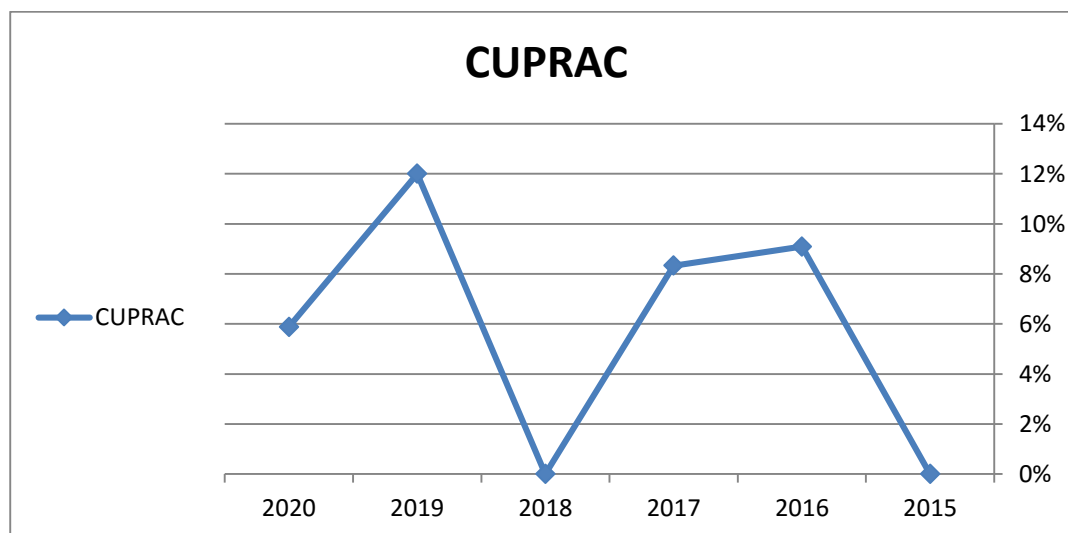
الشكل 40: منحنى بياني يمثل نسب اختبار TPC بدلالة السنوات المدروسة

يلاحظ في خلال السنوات أنه هناك زيادة في استعمالها وهذا ما يدل على اهتمام الباحثين بتطبيقها والتي قد تفسر هذه الزيادة لعدة أسباب منها:

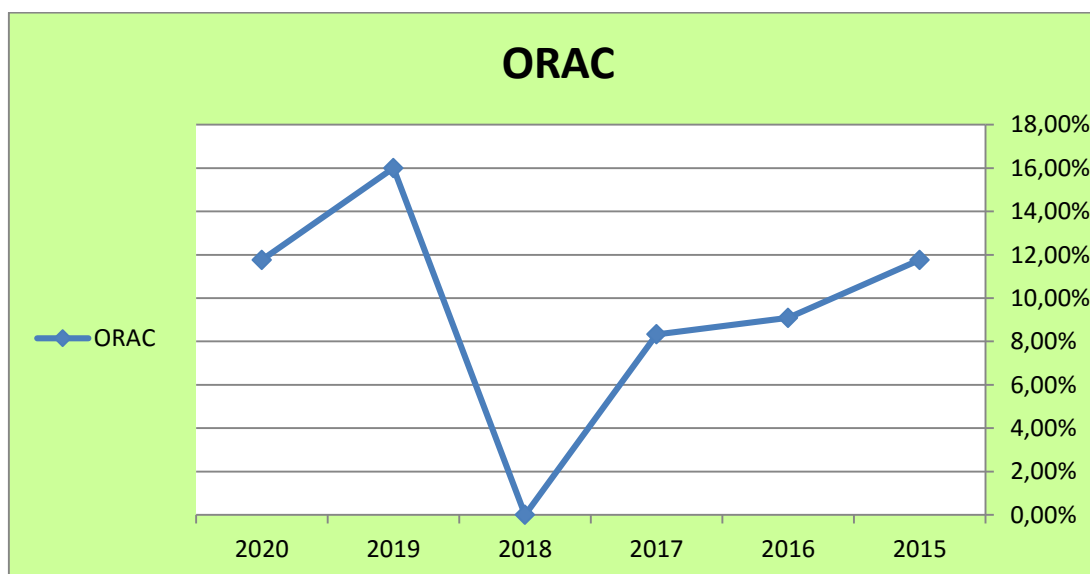
- سهولة التطبيق والتي تعود إلى العديد من العوامل كإجراء التفاعل في ظروف متاحة والإبتعاد عن الظروف القاسية إبتداء من توفر المذيبات (بما فيها التوفر التجاري والتمن المعقول)، توفر الكواشف وقلة سميتها وإستقرارها، توفر الأجهزة التحليل ووقت التحليل المناسب للدراسة الكافية مع قابلية التكرار.
- قد يفسر كذلك بتوسع استعمالها في الأبحاث مما يؤدي بالباحثين إلى زيادة الاطلاع عنها وتوسع الاستشها بها والتي بدورها تؤثر على مصداقية الاختبار في حد ذاته.
- امكانيته الاختبارات على تقدير وتحديد مجموعة كبيرة من مضادات الاكسدة كما في حالة (ABTS) الذي يسمح مركبه الجذري بالتفاعل بسرعة مع العديد من المواد المضادة للاكسدة الطبيعية والصناعية مثل (الفينولات، الأحماض الأمينية والفيتامينات C وE).

في حين نلاحظ كذلك سبب الإرتفاع الكبير في نسب اختبار الكسح الجذري DPPH أي في حدود (88% → 76%)، و الذي يفسر على أنه يصلح لجميع المستخلصات سواء كانت القطبية أو غير قطبية بسبب ذوبانيته العالية في المذيبات المختارة (Methanol,Ethanol) ، كما نفسر هذا الإرتفاع كذلك بسهولة إستعماله و المزايا التي حظي بها ما جعل به إلى استحداث بروتوكولات جديدة تدخل عليه (تعديلات) إلى وصل استعماله و دخوله نحو الطرق الكهروكيميائية. كما قد يعتبر اختبار الكسح الجذري المنطلق الأول الذي يعتمد عليه الباحث في دراسته مرورا إلى التخصيص بإختبارات أخرى أكثر إنتقائية.

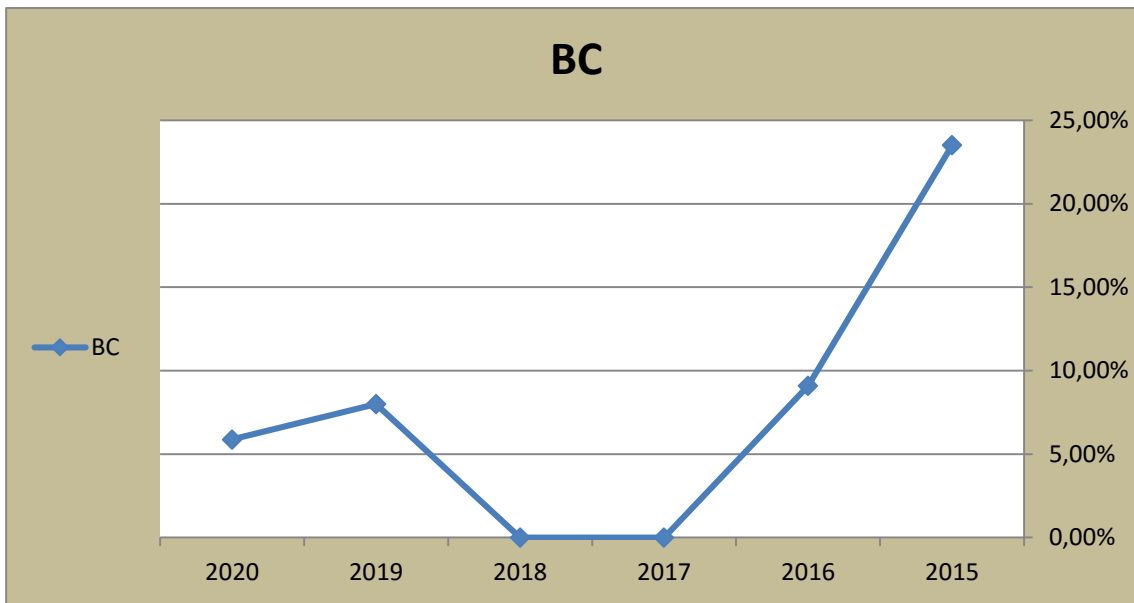
2.1.1.1.III القسم الثاني: العلاقة العكسية للاستشهادات بدلالة سنوات الدراسة



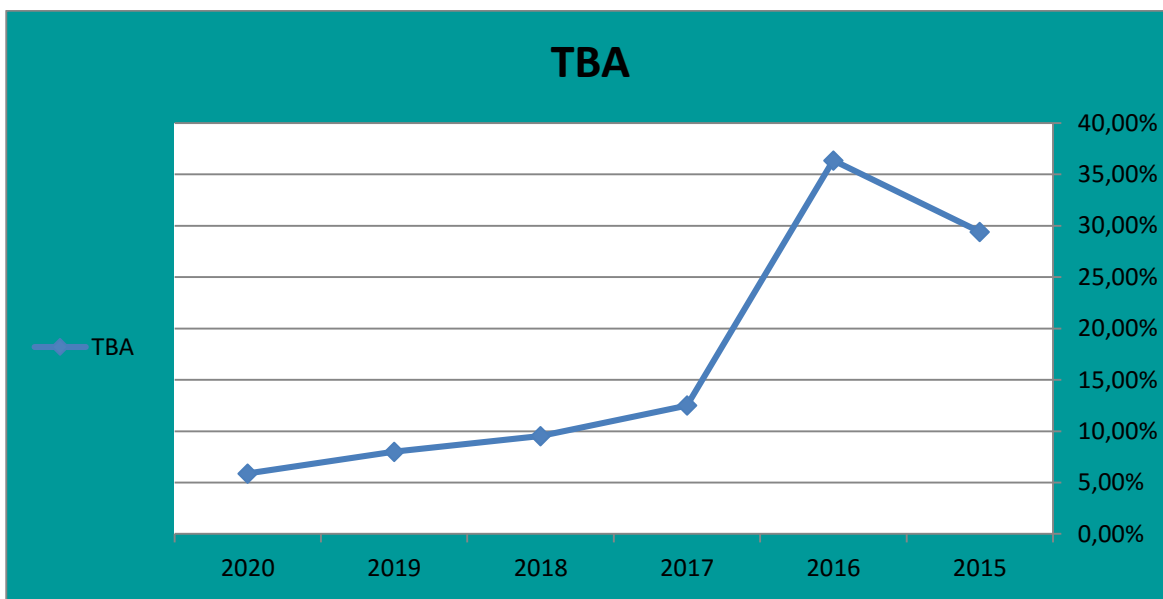
الشكل 41 منحنى بياني يمثل نسب اختبار CUPRAC بدلالة السنوات المدروسة



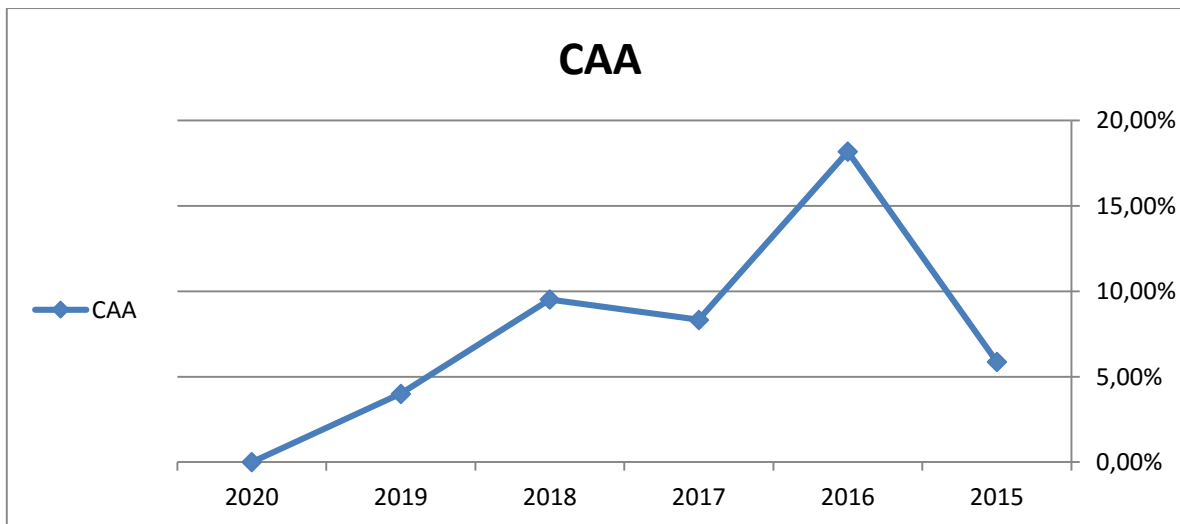
الشكل 42 منحنى بياني يمثل نسب اختبار ORAC بدلالة السنوات المدروسة



الشكل 44 منحنى بياني يمثل نسب اختبار B-C بدلالة السنوات المدروسة



الشكل 43 منحنى بياني يمثل نسب اختبار TBA بدلالة السنوات المدروسة



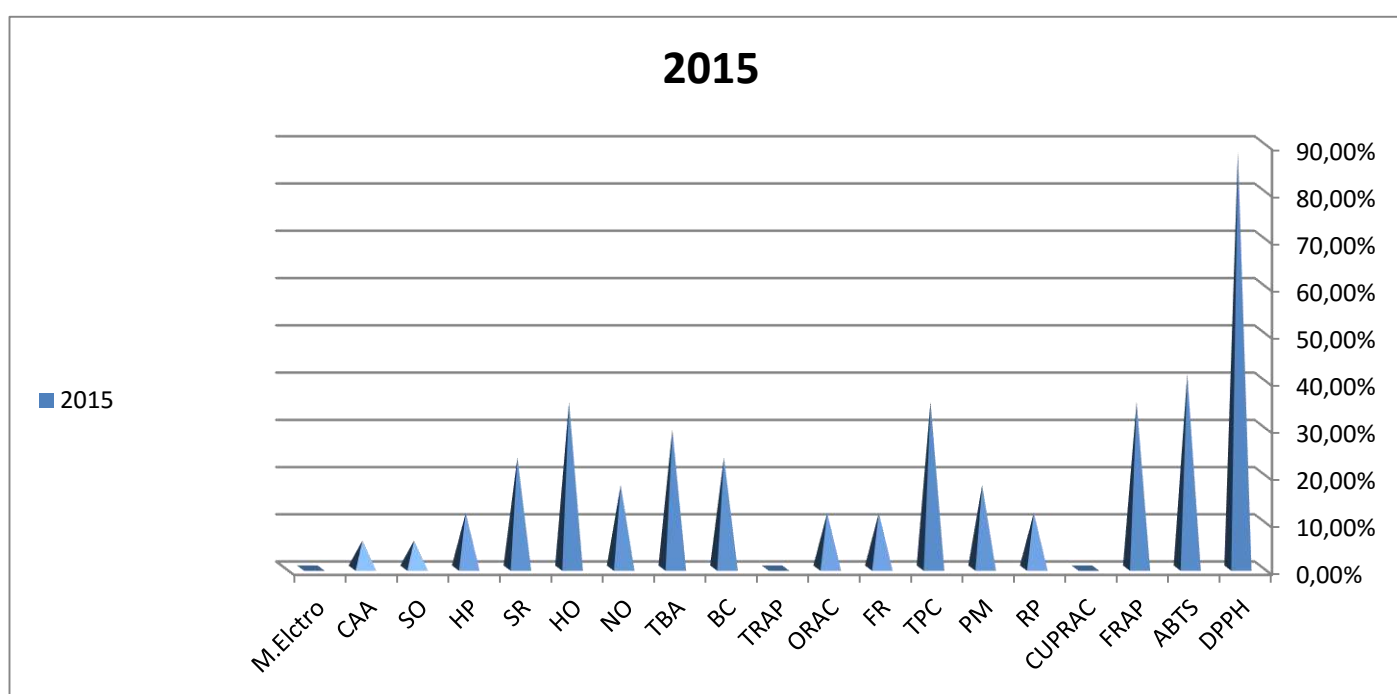
الشكل 45 منحنى بياني يمثل نسب اختبار CAA بدلالة السنوات المدروسة

كما يلاحظ أن معظم الاختبارات التي تحدد تقدير الفعالية المضادة للأكسدة كانت في تناقص خلال السنوات (2015-2020) حيث نعتقد أن أكثر ما يفسر هذا التناقص بعض الأسباب منها:

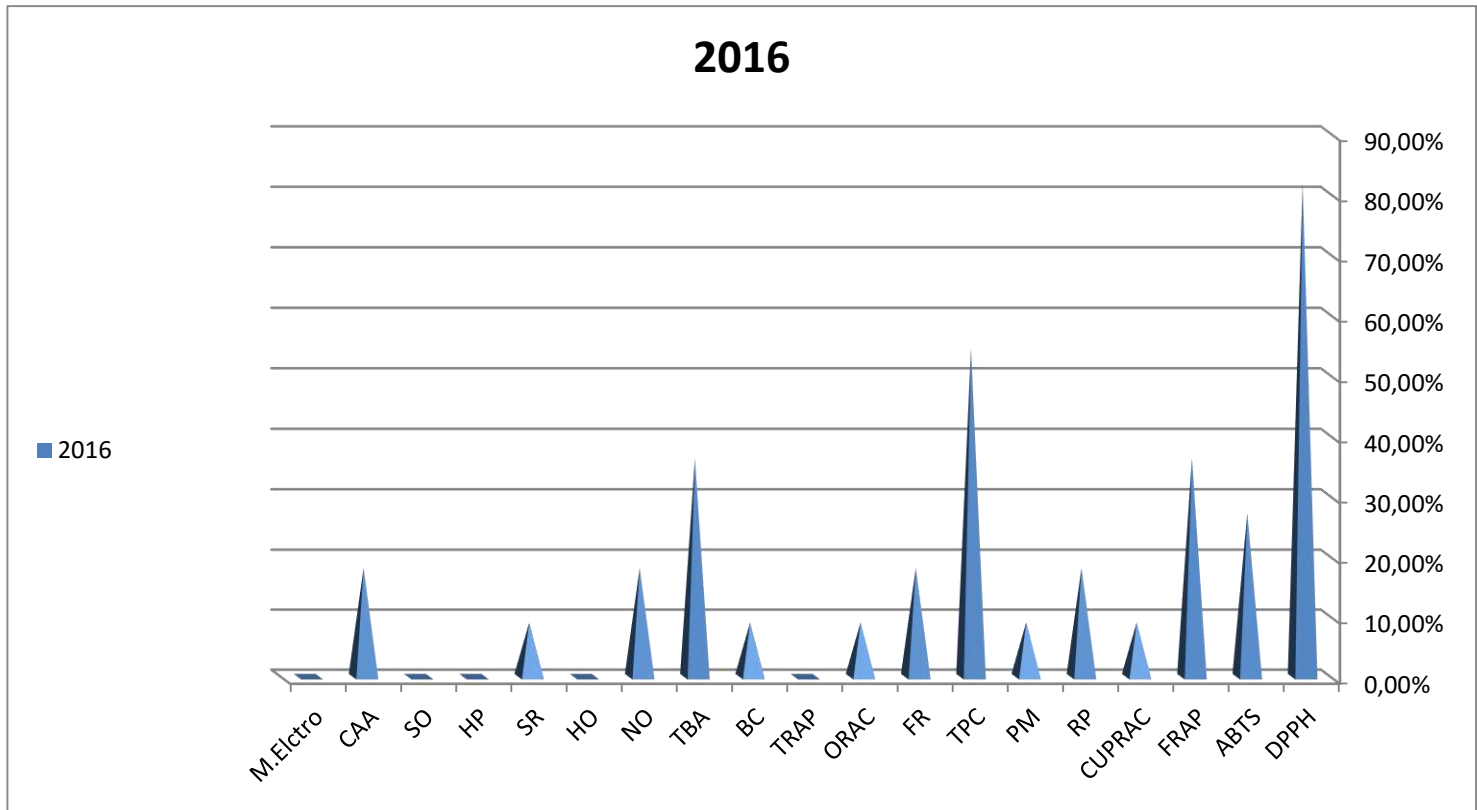
- ظروف إجراء الاختبار في حد ذاتها كعدم ثباته و استقرارية المتفاعلات، بعض ظروف التجريبية كدرجة الحرارة على سبيل المثال اختبار PM إذ نلاحظ أثناء تسخين المزيج عند 95 اختلاف في الأحجام المحتواة في أنابيب الاختبار بعد التبريد و هذا ما قد يؤثر بشكل مباشر على تركيز العينات مما يؤدي على نتائج خاطئة في التحليل .
- بعض الاختبارات تفقر وتقتصر فقط على أوساط معينة إذ أنه من البديهي أن الاختبارات الأكثر انتشارا هي التي تستعمل جميع الأوساط يليها الاختبارات التي تستعمل في الأوساط القطبية (على اعتبار أن المركبات الفينولية هي الأكثر بحثا في السنوات الأخيرة) بعد ذلك الاختبارات في الأوساط الغير قطبية مثل اختبار وأخيرا الاختبارات المقتصرة على الأوساط المائية (كالخلايا الحية) وهذا ما قد يفسر قلة الاستشهاد بها دون غيرها.
- النتائج المحصل عليها في تقدير الفعالية بواسطة اختبار ما مقارنة باختبارات أخرى من نفس الآلية مما يجعل الباحثين يتخوفون من قيم هذا الاختبار الذي لم يثمن فعالية المستخلصات المدروسة.
- كما قد يعود كذلك إلى حداثة اكتشاف الاختبار الى قلة استعماله.

2.1.1.III التحليل

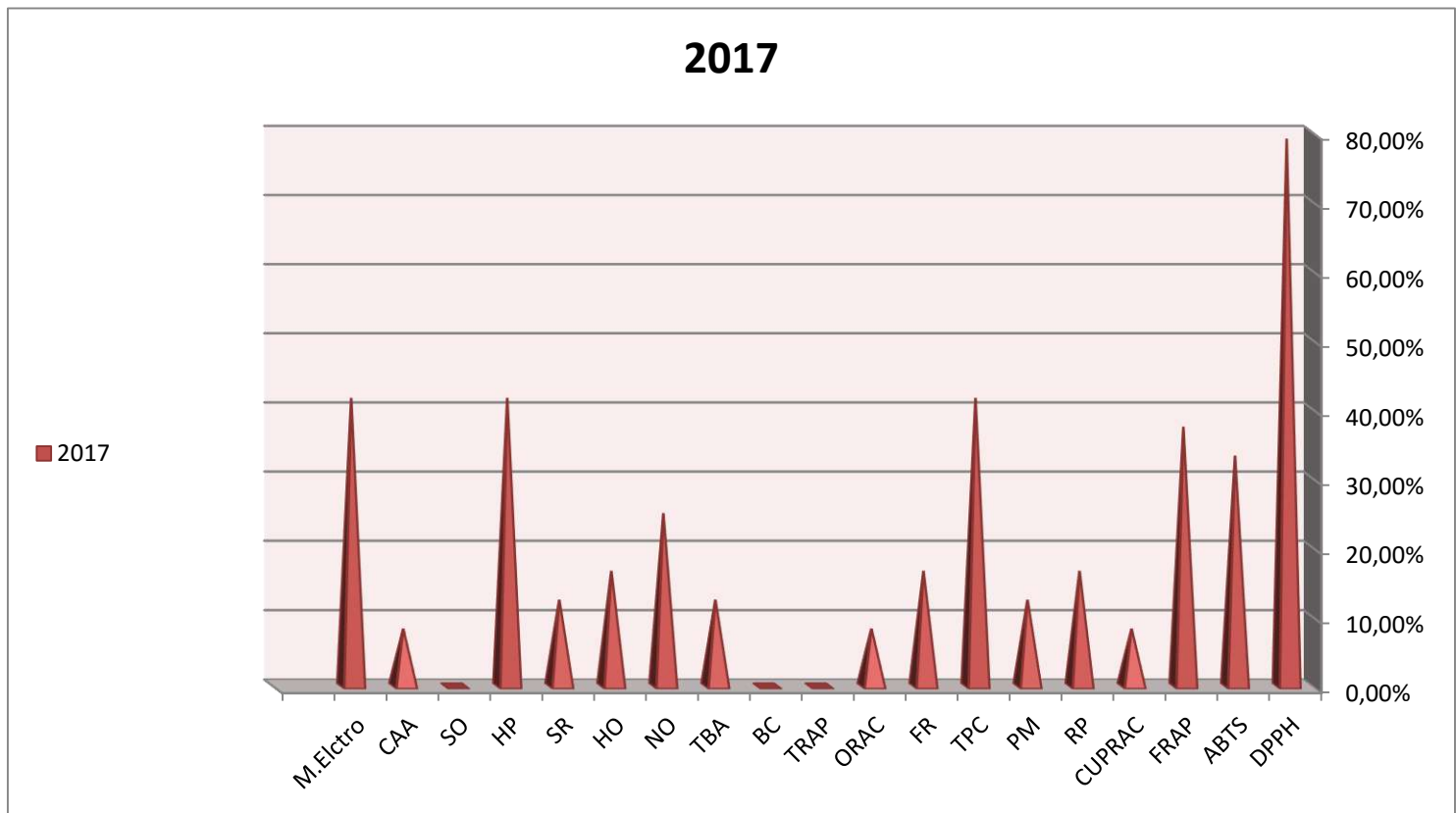
1.2.1.1.II من خلال القيم النسبية للاختبارات المدروسة لكل سنة والمتمثلة Hestogramme في الأشكال 1- 6 يتم حصر القيم النسبية إلى ثلاث مجالات كما هو موضح في الجدول التالي:



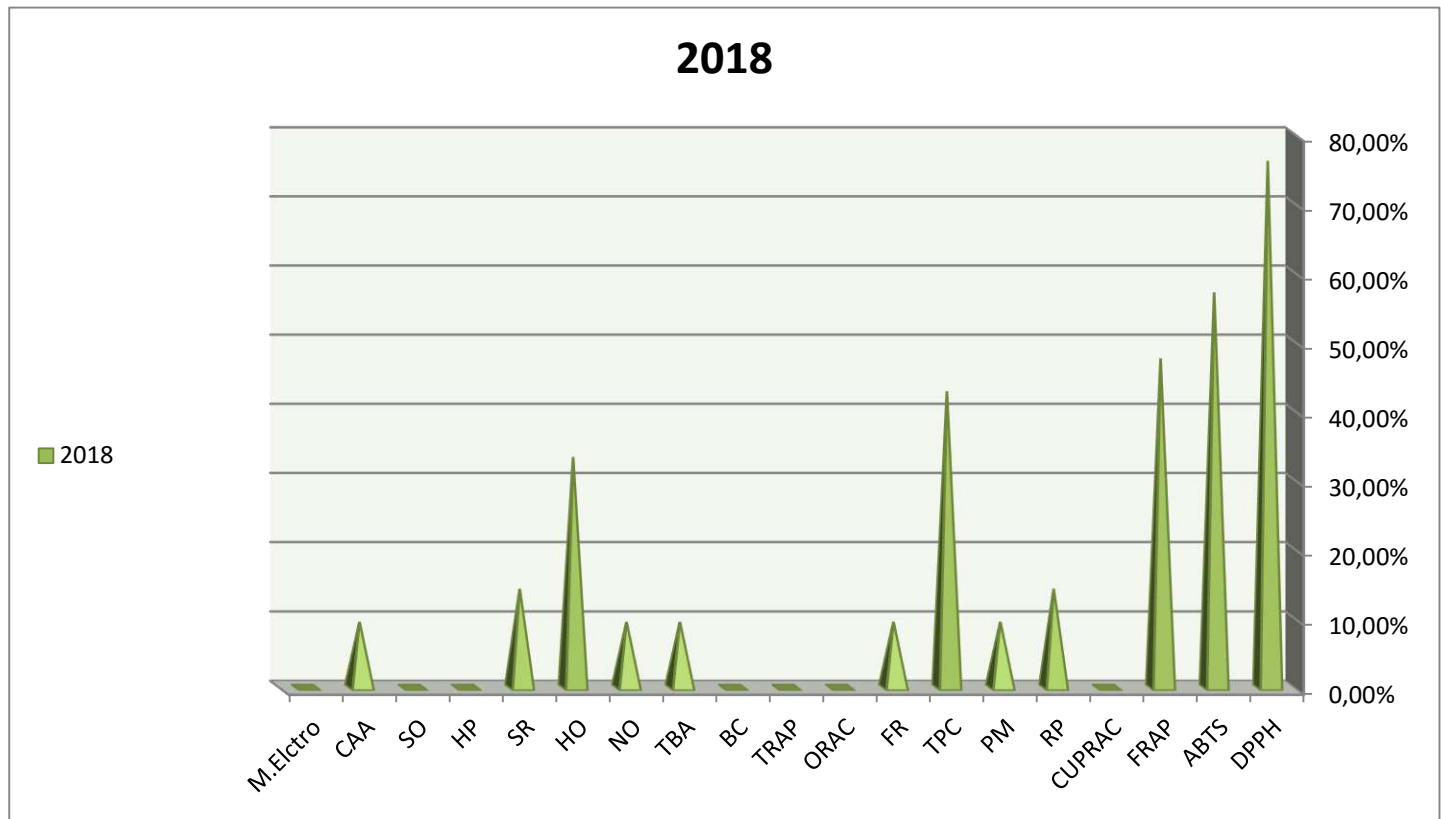
الشكل 46: يمثل توزيع نسب الاختبارات المدروسة لعام 2015



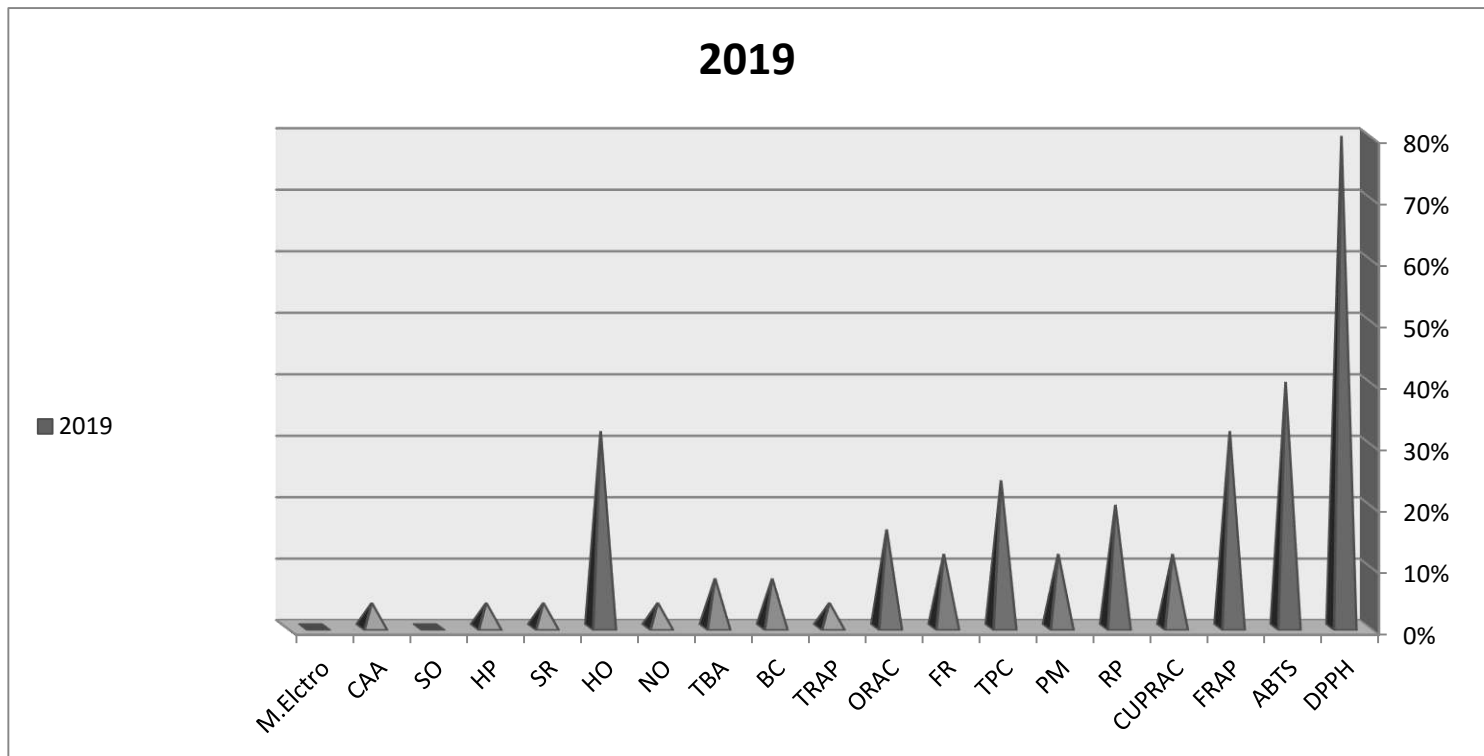
الشكل 47: يمثل نوزع نسب الاختبارات المدروسة لعام 2016



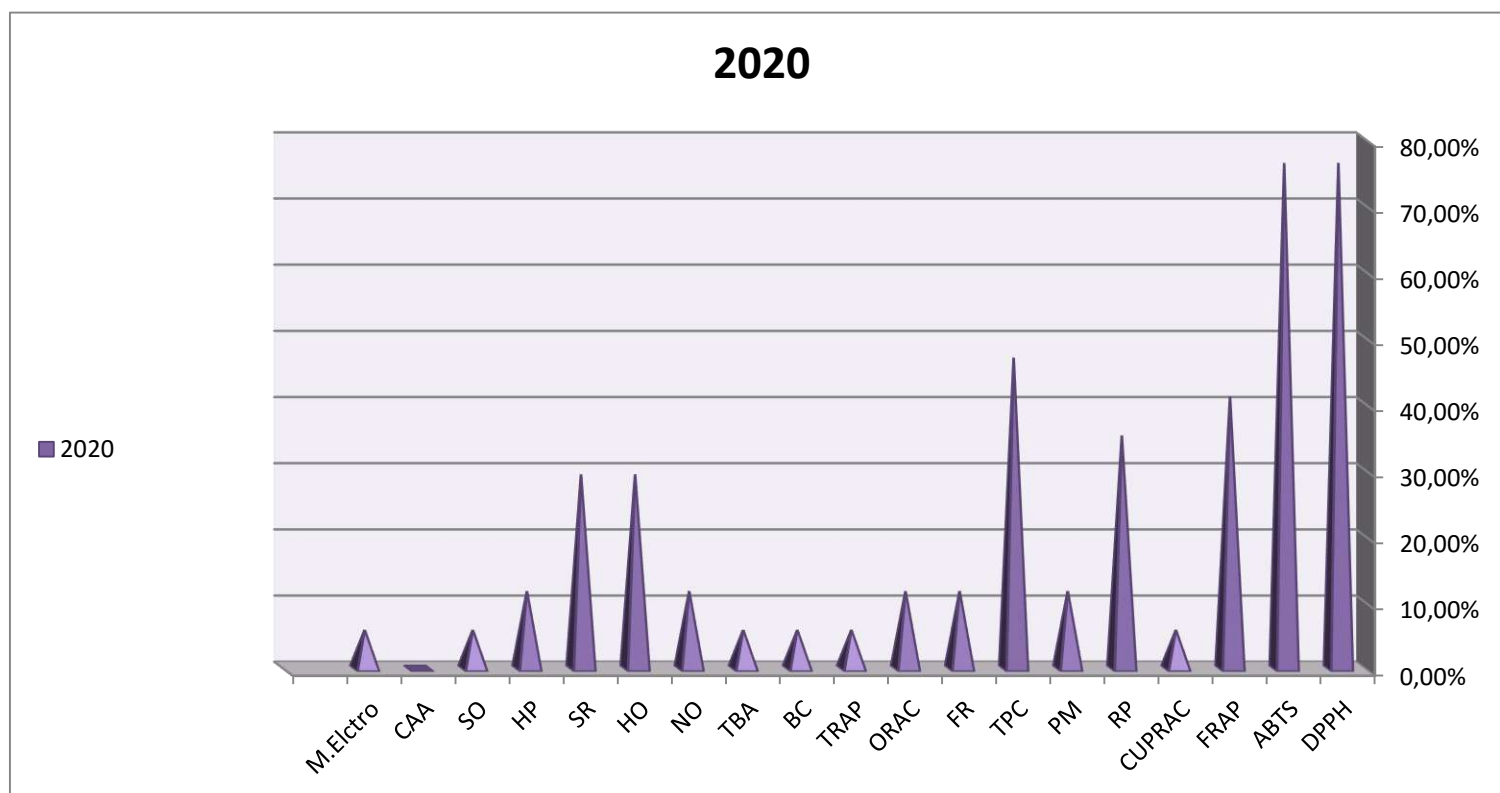
الشكل 48: يمثل نوزع نسب الاختبارات المدروسة لعام 2017



الشكل 49 يمثل نوزع نسب الاختبارات المدروسة لعام 2018



الشكل 50: يمثل نوزع نسب الاختبارات المدروسة لعام 2019



الشكل 51: يمثل توزيع نسب الاختبارات المدروسة لعام 2020

الجدول III: مجالات النسب المنوية الاختبارات المحددة بدلالة السنوات

T% < 20	20 <= T% < 50	T% > 50	
CUPRAC, RP, FP, ORAC, TRAP, PM, BC, NO., SR, HP, SO, CAA, M-Elctro	ABTS, FRAP, TPC, OH, TBA	DPPH	2015
CUPRAC, RP, PM, FR, ORAC, TRAP BC, NO, OH, SR, HP, SO SO, CAA elctro	ABTS, FRAP TBA	DPPH TPC	2016
CUPRAC, RP, PM, FR, ORAC, TRAP, BC, TBA, OH, SR, SO, CAA	ABTS, FRAP, TPC, NO, HP, M-E	DPPH	2017
CUPRAC, RP, PM, FR, ORAC, TRAP BC, TBA, OH, SR SO, CAA, HP, M-Electro	FRAP, TPC, OH	DPPH, ABTS	2018
CUPRAC, RP, PM, ORAC, TRAP, FR, BC, TBA, SR, SO, CAA, HP, NO M-Electro	ABTS, FRAP, TPC, OH	DPPH	2019
CUPRAC, RP, PM, ORAC, TRAP, FR, BC, TBA, SR, SO, CAA, HP, NO M-Electro	ABTS, FRAP, TPC, OH	DPPH	2020

حيث $T\%$: هي النسبة المئوية لعدد استعمال الاختبار المعني نسبة إلى العدد الإجمالي للاختبارات في سنة الدراسة المحددة .

• حالة $t\% > 50$:

من خلال قيم المحصل عليها نلاحظ أنه في خلال سنوات الدراسة تبين منها أن اختبار DPPH له تواجد عالي في جميع السنوات الدراسة ما فاقت نسبته أكثر من 50% وهذا ما يفسر ما أدلينا به سابقا في المنحنيات و ما يفسر كذلك بأن الآلية السائدة في هذا المجال من نوع الآلية الجذرية.

• حالة $20 \leq t\% < 50$:

فنلاحظ أنه تم استعمال اختبار بشكل معتبر على غرار FRAP الذي تراوحت نسبته (32% ← 45%)، في حين كانت قيم TPC (24% ← 45%) بينما كانت قيم ABTS (27% ← 76%) إذ يلاحظ بين هذه الاختبارات تقارب في النسب إلى وجود علاقة بينها ما قد نفسره بأهم معيار قطبية المذيب ووسط التفاعل المستعمل على اعتباره المعيار المؤثر في التقارب.

• حالة $t\% < 20$:

نلاحظ كذلك في هذا المجال أن غالبية الاختبارات المدروسة انتمت إلى هذا المجال فعلى سبيل المثال تراوحت قيم PM (9.09% و 17%) و قيم ORAC (9.09% ← 16%) أما قيم FR فكانت (9.9% ← 18.18%) ، بينما لم تتعدى قيم بعض الاختبارات 10% كما في اختبار SO الذي انعدمت نسبته في بعض السنوات و ظهرت بقيمة ضعيفة (5%) سنة 2020.

كما لوحظ كذلك بالنسبة لبعض الاختبارات الخاصة بالجذور الحرة البيولوجية مثل O_2^- , H_2O_2 , NO^* فعلى الرغم من بساطة طرق استعمالها ألا أن العائق قد يكمن في الكواشف الباهضة الثمن.

الجانب العملي



I. مدخل:

تكملة للعمل السابق و المتمثل في دراسة أسس و معايير اختيار طرق تقدير الفعالية المضادة للأكسدة تم تدعيم هذه الدراسة باستبيان عملي حيث كانت الفئة المستهدفة هي فئة الباحثين في مجال الفعالية المضادة للأكسدة من حيث (أساتذة، طلبة دكتوراه، طلبة ماجستير)، و ذلك بإنشاء استبيان إلكتروني على منصة (google form) في الفترة الممتدة من 12 أفريل إلى 20 ماي و الذي تمحور حول الأسئلة التالية:

قسم 1 من 3

دراسة معايير و أسس إختيار طرق تقدير الفعالية المضادة للأكسدة للمركبات الفعالة

نرجو من سيادتكم أن تمدوا لنا يد المساعدة بالإجابة على هذا الإستبيان بدقة و موضوعية مما يعزز الدقة في نتائج هذه الدراسة و التي نأمل أن تعود على الجميع بالنفع و الفائدة و نؤكد لكم أن الآراء التي ستدلون بها سوف تتسم بالسرية التامة و تستخدم لأغراض البحث العلمي فقط.

المستوى

طالب ماجستير

طالب دكتوراه

استاذ

قسم 2 من 3

المحور الأول

ينطوي هذا المحور حول بعض الاسئلة العملية (تطبيقية) لتقدير الفعالية المضادة للأكسدة باستعمال طرق و فحوصات مختلفة بناءا على نوع العينة المستخدمة في الدراسة

نوع العينة المستخدمة في الدراسة

عينة نباتية

مركب محضر مخبريا

مركب قياسي نقي

عينة بيولوجية

عينة أخرى

نص الإجابة القصير

نوع المستخلص المستخدم في الدراسة

فينولي

زيتي

زيت طيار

مائي

خيار آخر

نص الإجابة الطويلة

⋮

آلية تفاعل الإختبار (الإختبارات) المدروسة

Colonne 4

إنزيمية

أكسدة/إرجاع

جذرية

...nging assay(DPPH)

...ant capacity(ABTS)

...xidative assay(PM)

...ower assay(FRAP)

...er assay(CUPRAC)

...acity assay(ORAC)

...metre assay(TRAP)

... substanes(TBARS)

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	...ing antioxidant HO
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	...activity assay(CAA)
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	...leaching assay(BC)
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	...ucing power asaay
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Method caloremètre
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Method voltamètre
إختبار (أو إختبارات) قمت بدراسته مع توضيح آلية التفاعل إن وجد				
نص الإجابة القصير				
حساسية الإختبارات المدروسة				
غير حساس	متوسط الحساسية	شديد الحساسية		
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	...cavenging assay(DPPH)
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	...tioxidant capacity(ABTS)
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	...um oxidative assay(PM)
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	...dant power assay(FRAP)
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	...t power assay(CUPRAC)
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	...e capacity assay(ORAC)
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	...t parmetre assay(TRAP)
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	...ctive substanes(TBARS)
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	...avenging antioxidant HO
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	...dant activity assay(CAA)
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	...éne bleaching assay(BC)
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Reducing power asaay
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Method caloremètre
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Method voltamètre

حساسية الإختبار أو (الإختبارات) إن وجدت

نص الإجابة الطويلة

⋮

إستقرائية المتفاعلات بالنسبة للإختبار المستعمل

غير مستقر

متوسط الإستقرائية

مستقر

...cavenging assay(DPPH)

...tioxidant capacity(ABTS)

...um oxidative assay(PM)

...dant power assay(FRAP)

...t power assay(CUPRAC)

...e capacity assay(ORAC)

...t parmetre assay(TRAP)

...ctive substanes(TBARS)

...avenging antioxidant HO

...dant activity assay(CAA)

...éne bleaching assay(BC)

Reducing power asaay

Method caloremètre

Method voltamètre

إستقرارية المتفاعلات (لإختبارات أخرى) إن وجدت

نص الإجابة الطويلة

قطبية المذيب للإختبار المستعمل

غير قطبي	متوسط القطبية	قطبي	
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	...cavenging assay(DPPH)
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	...tioxidant capacity(ABTS)
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	...um oxidative assay(PM)
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	...dant power assay(FRAP)
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	...t power assay(CUPRAC)
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	...e capacity assay(ORAC)
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	...t parmetre assay(TRAP)
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	...ctive substanes(TBARS)
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	...avenging antioxidant HO
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	...dant activity assay(CAA)
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	...éne bleaching assay(BC)
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Reducing power asaay
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Method caloremétre
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Method voltamétre

قطبية المذيب للإختبار (أو الإختبارات) إن وجدت

نص الإجابة القصير

⋮			مدة الإختبار المستعمل
طويلة	متوسطة	قصيرة	
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	...cavenging assay(DPPH)
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	...tioxidant capacity(ABTS)
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	...um oxidative assay(PM)
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	...dant power assay(FRAP)
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	...t power assay(CUPRAC)
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	...e capacity assay(ORAC)
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	...t parmetre assay(TRAP)
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	...ctive substanes(TBARS)
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	...avenging antioxidant HO
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	...dant activity assay(CAA)
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	...éne bleaching assay(BC)
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Reducing power asaay
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Method caloremétre
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Method voltamétre

مدة الإختبار (أو الإختبارات) إن وجدت

نص الإجابة الطويلة

الأجهزة المستعملة في الإختبار المدروس

voltalab

spectrophotométre(UV-VIS)

Radical scavenging assay(DPPH)

...valant antioxidant capacity(ABTS)

...molybdenum oxidative assay(PM)

...g antioxidant power assay(FRAP)

...ntioxidant power assay(CUPRAC)

...bsorbance capacity assay(ORAC)

...ntioxidant parmetre assay(TRAP)

... acide reactive substanes(TBARS)

...radical scavenging antioxidant HO

...ar antioxidant activity assay(CAA)

β -caroténe bleaching assay(BC)

Reducing power asaay

Method caloremétre

Method voltamétre

إضافة اجهزة أخرى إن وجدت

نص الإجابة الطويلة

مجال الطول الموجي المستعمل في الإختبار

فوق بنفسجي

مرئي

Radical scavenging assay(DPPH)

...valant antioxidant capacity(ABTS)

...molybdenum oxidative assay(PM)

...g antioxidant power assay(FRAP)

...ntioxidant power assay(CUPRAC)

...bsorbance capacity assay(ORAC)

...ntioxidant parmetre assay(TRAP)

... acide reactive substanes(TBARS)

...radical scavenging antioxidant HO

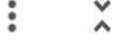
...ar antioxidant activity assay(CAA)

β -carotène bleaching assay(BC)

Reducing power asaay

Method caloremètre

Method voltamètre



المحور الثاني

يتضمن هذا المحور بعض الأسئلة المباشرة والتي تتمحور حول بعض الإشكاليات و الصعوبات التي يواجهها الطالب عمليا :

هل يعتبر تقدير نشاط فعالية المضادة للأكسدة من أهم مراحل التي يلزم على الطالب الفيتوكيمياء معالجتها مخبريا ؟

أوافق بشدة

أوافق

لا أوافق

هل أنتك الرغبة في الحصول على فرص بإجراء إختيارات من شأنها تعزز من نتائج بحثك(أكثر دقة)؟

دائما

أحيانا

أبدا

على اي أساس تم إختيار الإختبار المستعمل في الدراسة؟

سهولة

توفر مواد في المخبر

وفقا لدراسات سابقة على نفس العينة

حسب آلية المركبات المدروسة

على أي أساس تم إختيار لإختبارات التي لها نفس الآلية؟

نص الإجابة الطويلة

هل وجهت صعوبة في إختبار مذيب معين لأحد الإختبارات بالنسبة للعينه المدروسة؟

دائما

إلى حد ما

أبدا

هل حساسية أحدالإختبارات أثرت على النتائج المتوقعة المحصل عليها لدراسة؟

دائما

أحيانا

أبدا

على أي أساس تم إختيارك المحلول المرجعي (القياسي) في تقدير الفعالية المضادة للأكسدة لأحد الإختبارات؟

وفقا لدراسات سابقة

بإعتباره يعطي إستجابة جيدة

ما توفر مخبريا

هل وجدت علاقة إرتباط بين الإختبارات المدروسة؟

دائما

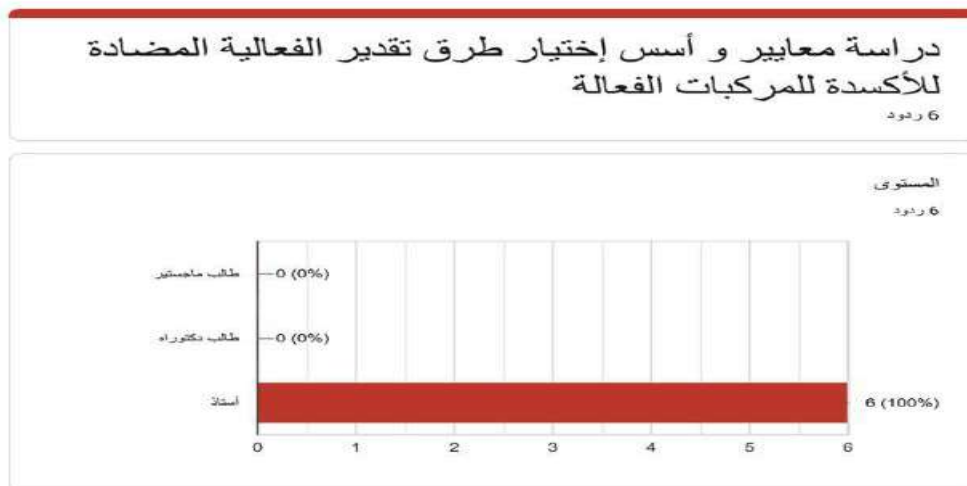
إلى حد ما

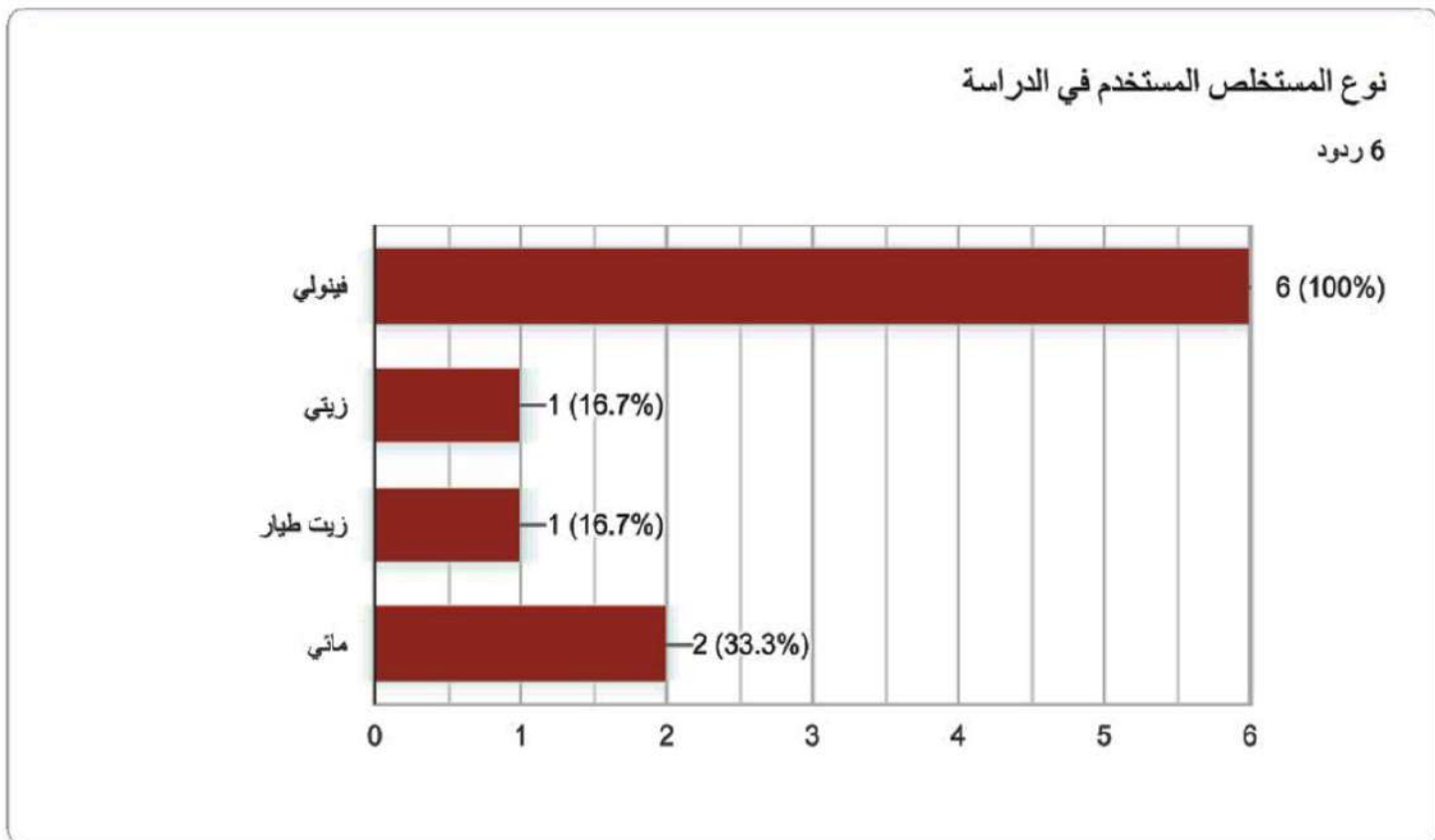
أحيانا

الشكل 52: أسئلة الإستبيان الالكتروني

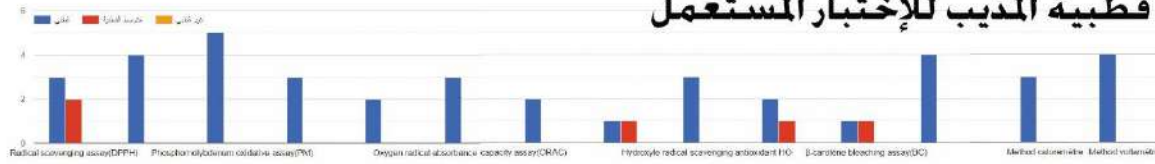
حيث تم إرساله إلى 50 بريد إلكتروني من خلال أبحاثهم فكانت عينة الردود من فئة % 100 أساتذة، تم بعد ذلك ترجمة درود الاستبيان المحصل عليها إلى إحصائيات حيث:

1.I ردود الأستبيان المحور الأول:

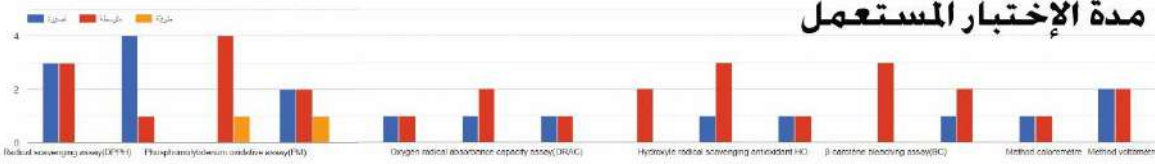




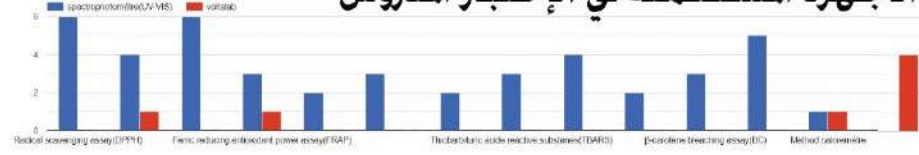
قطبية المذيب للإختبار المستعمل



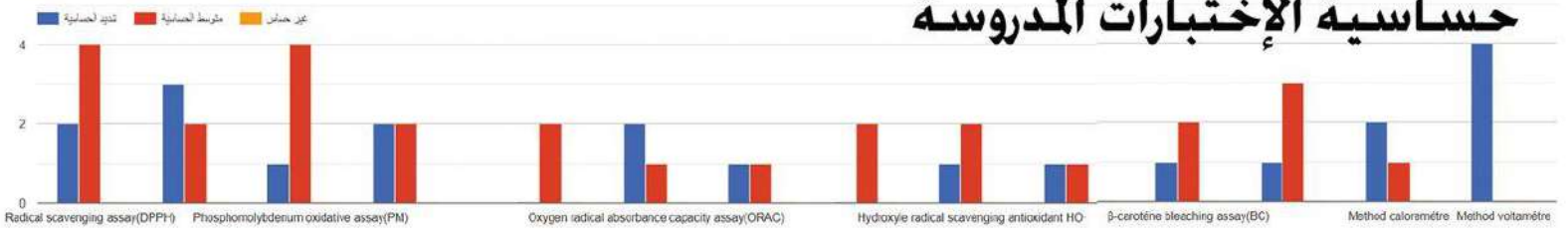
مدة الإختبار المستعمل



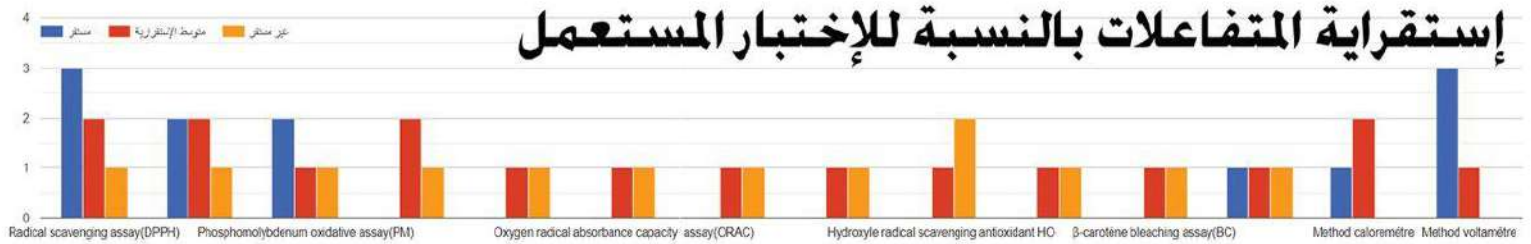
الأجهزة المستعملة في الإختبار المدرس



حساسية الإختبارات المدرسة



إستقرارية المتفاعلات بالنسبة للإختبار المستعمل



الشكل 53: ردود المستجوبين على المحور الأول

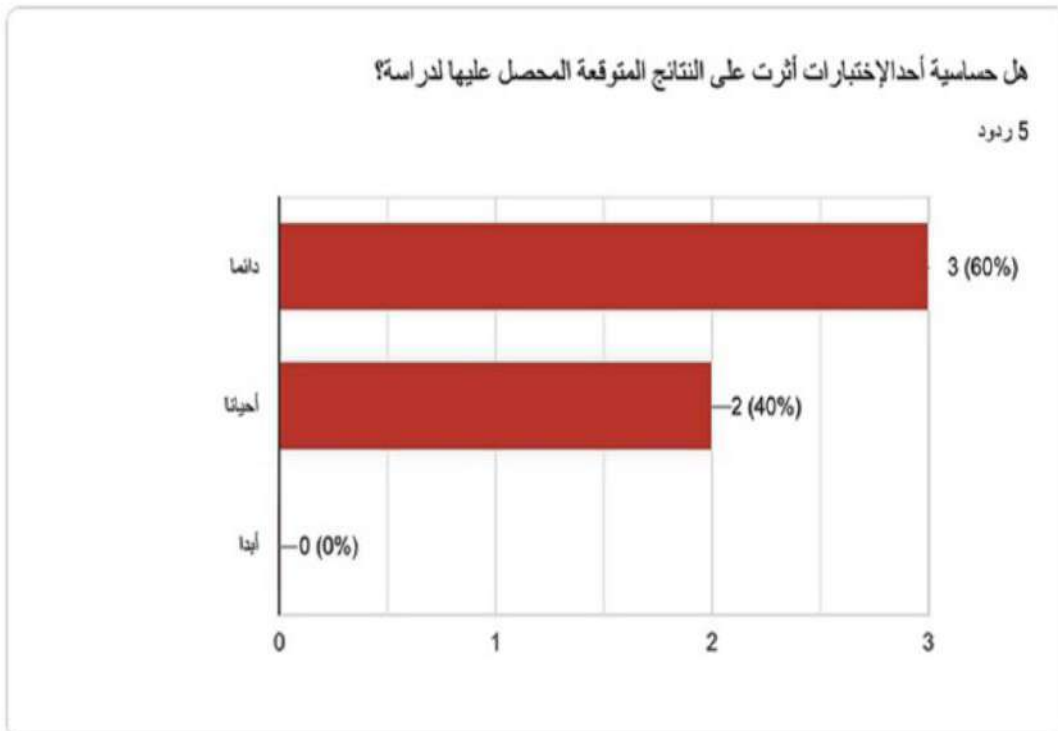
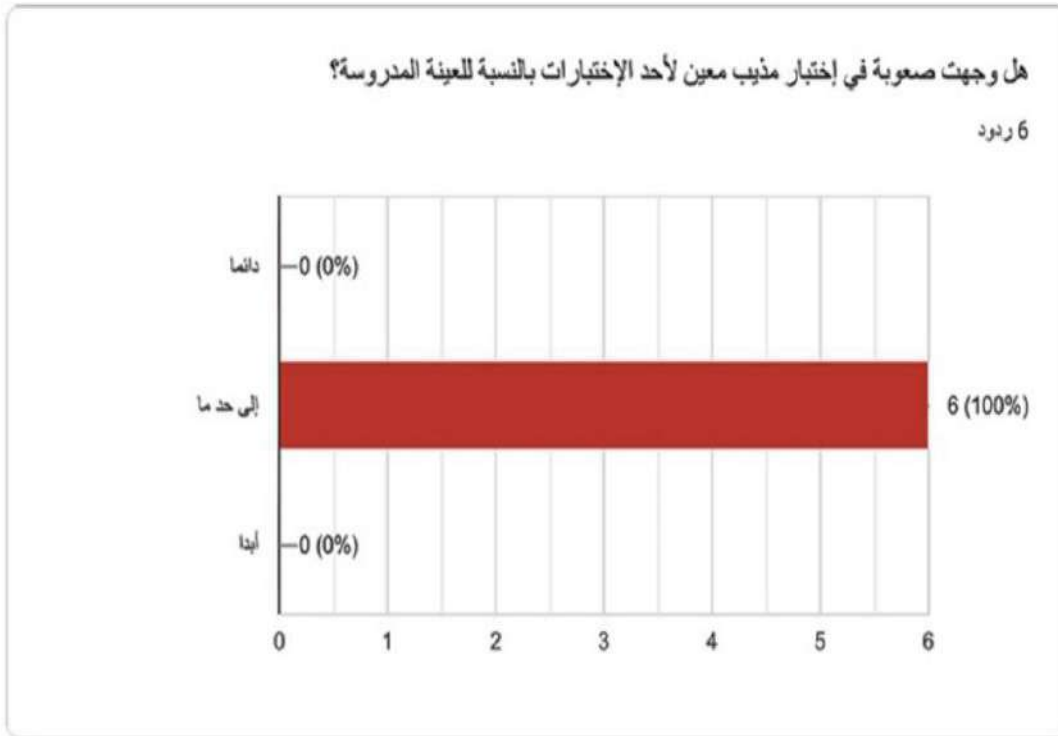
لم يتم تحليل كل ردود الاستبيان بناء على وجود بعض الإجابات الغير منطقية ، في حين تحصلنا على البعض منها كنوع العينة المستخدمة في الدراسة، حيث أجمعت كلها الإجابات على عينات نباتية و التي قد نفسرها بحكم أن اغلب الأبحاث تصب اهتمامها نحو المواد الطبيعية و فعاليتها البيولوجية، كذلك كانت اغلب ردود المستجوبين حول قطبية المذيب باستعمالهم لمذيبات قطبية في أغلب الإختبارات و هذا ما يدلي على ما تم تفسيره في الجزء الاول حول الاوساط الاكثر استعمالا في حين كانت الردود على أنواع المستخلص

الجانب العملي

المستخدم في الدراسة إذ نلاحظ أن جل الإجابات أجمعت على استخدام المستخلصات الفينولية ثم تليها المستخلصات الزيتية و الزيوت الطيارة و من ناحية استقرارية المتفاعلات حيث كان DPPH من بين أكثر الاختبارات استقرارا للمتفاعلات حسب ردود المستجوبين في حين تراوحت جميع الاختبارات بين المتوسطة و شديدة الحساسية .

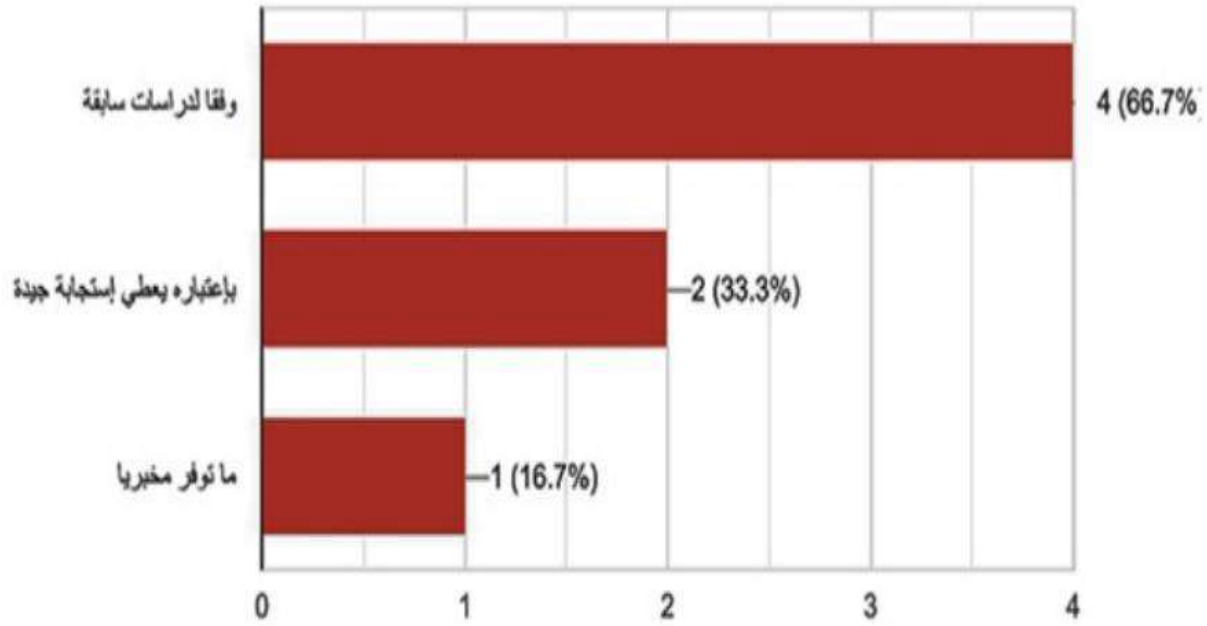
بينما أظهر مجال الطول الموجي المستعمل حدوده في المجال المرئي لأغلب الاختبارات و هذا لاعتمادها على التغير اللوني سواء في التفاعلات الجذرية و تشكيل المعقدات و تفاعلات الاكسدة و الارجاع باستثناء الطريقة الالكتروكيميائية التي لم تظهر في المجالين.

2.I المحور الثاني من ردود الاستبيان :



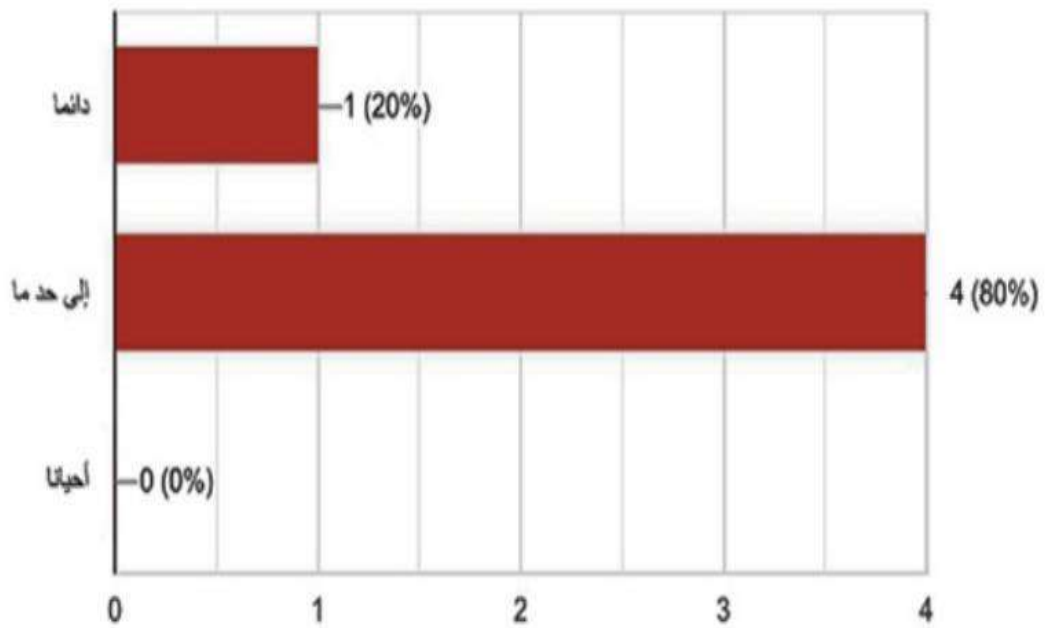
على أي أساس تم إختيارك المحلول المرجعي (القياسي) في تقدير الفعالية المضادة للأكسدة لأحد الإختبارات؟

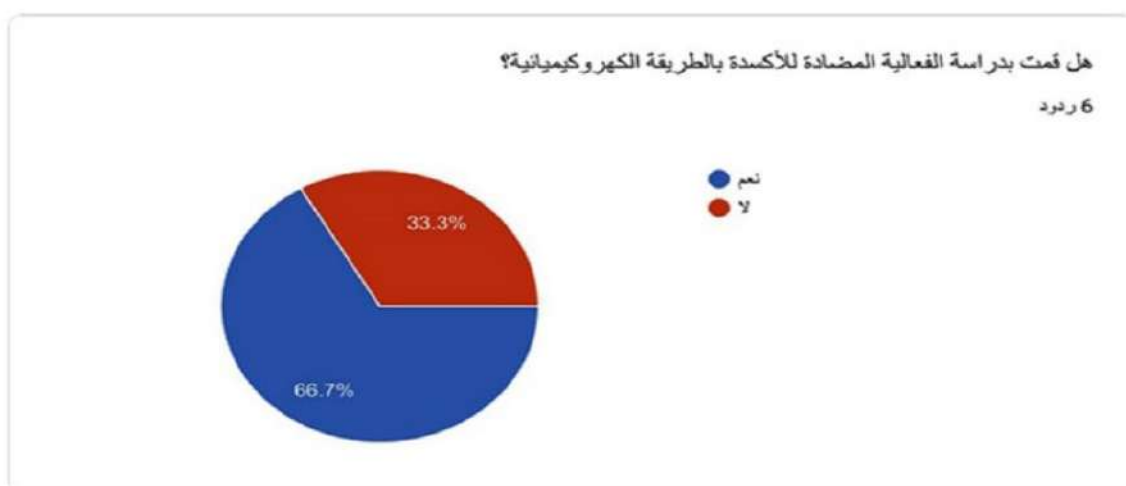
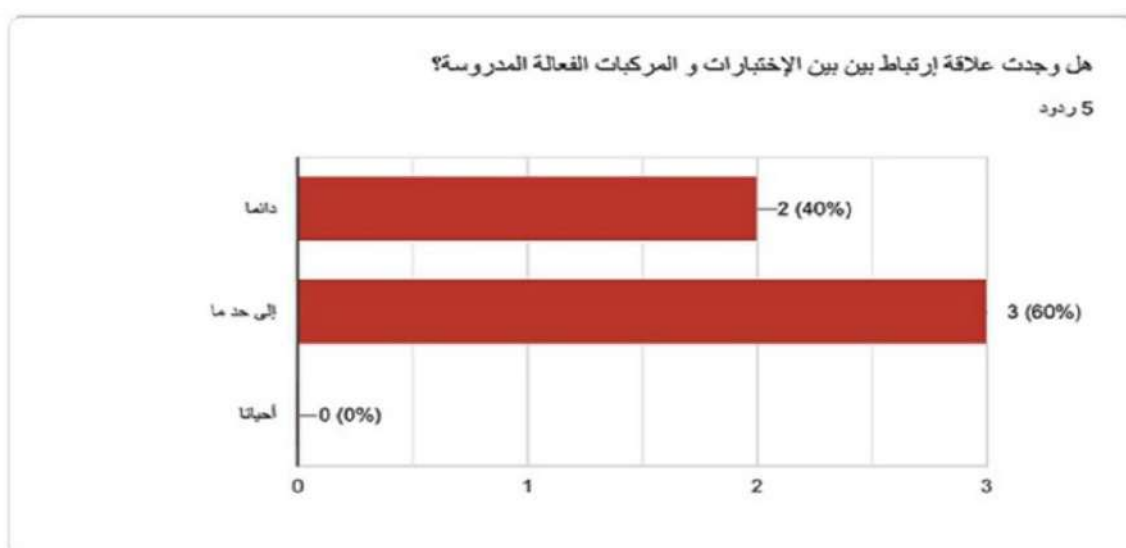
6 ردود



هل وجدت علاقة إرتباط بين الإختبارات المدروسة؟

5 ردود





الشكل 54 : درود المستجوبين على المحور الثاني

تمحورت إجابات الباحثين حول الأسئلة التي تتضمن بعض الصعوبات و الإشكاليات التي يواجهها الباحث في استعمال مثل هذا النوع من مراحل البحث العلمي الكيميائي ، حيث كانت الردود منقسمة بالتساوي (50%) على اعتبار تقدير نشاطية المضادة للأكسدة من أهم المراحل التي يلزم على طالب الفيتوكيمياء المرور بها في بحثه، فيما أدلت أكبر نسبة (83.3%) بالإجابة على أساس الاختبار المستعمل بما توفرت مواد في المخبر، في حين لاحظنا النسبة الكاملة (100%) بما يحض صعوبة اختيار المذيب المستعمل في الدراسة و التي كانت الإجابة عنها إلى حد ما، بينما كانت ردود المستجوبين بين (60% دائما و 40% أحيانا) على حساسية الاختبار و تأثيرها على النتائج، من جهة أخرى كانت الإجابة على السؤالين حول علاقة الارتباط بين الاختبارات في حد ذاتها التي استعملها الباحث و المركبات المدروسة و التي أدلت بأكبر نسبة أين وقع الاختيار (إلى حد ما) كل ذلك يفسر ما تم الإجابة عليه في السؤال و الذي كان مفاده الرغبة في الحصول على فرص بإجراء اختبارات أكثر دقة حيث كانت أكبر نسبة بدائما و هذا ما قد يفسر تقييد الباحث بما توفر له مخبريا .

فيما لاحظنا كذلك ردود الإجابة على السؤال بما يتعلق باختيار المحلول المرجعي (القياسي) حيث كانت أعلى نسبة بلغت (66.7%) باختيار الإجابة (وفقا لدراسات سابقة)، و هذا ما يدل على كثرة استعمال و الاستشهاد الواسع لاختبار ما و استعماله لمحلول قياسي معين .

الخلاصة

الخلاصة:

يتوق المجتمع العلمي دائما إلى تقنيات الجديدة و الحلول و التطبيقات و المنهجيات المستحدثة و ما إلى ذلك ، كل هذا الاهتمام الشديد يسعى من شأنه للتقدم بشكل أفضل و لتقديم نتائج أكثر موثوقية.

من خلال هذه الدراسة الإحصائية التي اشتملت على 120 مقال مختار بشكل عينة عشوائية في حدود السنوات الست الماضية (2015-2020) و نتائج الإستبيان المحصل عليها من طرف الباحثين تم التعرف من خلالها على المعايير و الاسس التي يعتمدها الباحثين في تقدير النشاطية المضادة للأكسدة للمستخلصات الحاوية على المركبات الفعالة، حيث حضت اختبارات نشاط الكسح الجذري (DPPH, ABTS) باستعمال كبير و انتشار واسع مقارنة بالاختبارات الأخرى، كذلك تليها بعض اختبارات التي تعتمد آليتها على نشاط (الأكسدة و الإرجاع)، فيما كانت معظم الإختبارات و التي نستطيع القول بأنها أكثر حساسية و إنتقائية ضعيفة الإستعمال (BC, TBA...) كل ذلك يؤكد على أساس المعايير التي يحددها الباحث في بحثه ما أدت بنا الحصول على هذه النتائج .

حيث أنه أثناء هذه الدراسة لاحظنا أن اختبارات مضادات الأكسدة الموجودة مخبريا لها العديد من الاختلافات التي قد تؤثر على موثوقيتها إذ أنه لحد الساعة لا يوجد اختبار يمكن أن يعطينا صورة شاملة للقدرة المضادة للأكسدة التي تمتلكها العينة المدروسة، أي و جب إجراء مجموعة من الاختبارات (ثلاثة على الأقل) للحصول على تقييم واقعي للنشاط المضاد للأكسدة كما أنه قد يستغرق وقتا طويلا و مكلفا نظرا لأن هناك حاجة للعديد من الكواشف، فعلى الرغم من أن اختبارات مضادات الأكسدة تمتلك العديد من نقاط القوة (كالإجراء البسيط و وقت التحليل السريع و فحص العديد من العينات في وقت مناسب و الكواشف الرخيصة و الأجهزة البسيطة)، كل هذه النقاط الشكلية جيدة، لكنها ليست قوية بما يكفي لدعم موثوقية و فعالية و إنتقائية كل اختبار على مستوى التطبيق المخبري الدقيق كون أن غالبيتها لا تتوافق مع المركبات ذات الصلة ببيولوجيا .

المراجع

- ا.عاشور أحمد، ع.غيث رضوان، أساسيات الكيمياء العضوية. 2006 دار الكتاب الجديدة المتحدة ليبيا: ص543-544.
- أحلام بوسطلة، دراسة نواتج الأيض الثانوي لنبته Bunimincrasstumboiss و Foeniculum Vulgare ،رسالة دكتوراه جامعة منتوري قسنطينة 2014 : ص171.
- آل دبليو.أوراندا إي وودز،ترجمة د،عادل جورج ساجدي د.علاء يحي محمد علي(1983).كيمياء الإغذية، للنشر و التوزيع.
- بشرى البشير، مجلة التغذية و الصحة، و الادارة العامة للتغذية بوزارة الصحة السعودية 2003.
- بلقار محمد لخضر، المساهمة في دراسة القدرة المضادة للأكسدة لبروبوليس جنوب الجزائر بالطرق الكيميائية و كهروكيميائية رسالة دكتوراه ، جامعة قاصدي مرباح ورقلة 2016.
- بلقار،آسية دراسة القدرة المضادة للأكسدة و للبكتيريا و للتآكل للمستخلصات الفينولية لنبات Limoniastrum guyonianum (Dur.) رسالة دكتوراه، جامعة قاصدي مرباح ورقلة 2018.
- بن ساسي حمزة، تصنيع ودراسة كهروكيميائية لبعض مشتقات الفينيل هيدرازيد الفيروسينية .مذكرة ماجستير .ورقلة: جامعة قاصدي مرباح،2013، 13-15 ص .
- بن ساسي،شيماء تقييم القدرة المضادة للأكسدة و المضادة للبكتيريا للمركبات الفينولية لبعض أصناف التمور من منطقة وادي ريغ بطرق مختلفة، رسالة دكتوراه جامعة قاصدي مرباح ورقلة 2018.
- بن على، مصطفى، دراسة الجزء الليبيدي و الفينولي لنوى بعض أصناف التمور المحلية رسالة دكتوراه ، جامعة قاصدي مرباح ورقلة2018 .
- بوليار طارق، فصل و تحديد نواتج الأيض الثانوي و دراسة الفعالية المضادة للأكسدة Euphorbia guyoniana مذكرة ماجستير، جامعة منتوري قسنطينة2008.
- تامة نور الدين الدراسة الفيتوكيميائية للمنتجات الفعالي (القلويدات، الفينولات و الفلافونيدات، التربينات الثلاثية) و النشاط المضاد للأكسدة و المضاد للميكروبات لنبات الباقل و الحمير الذي ينمو في جنوب شرق الجزائر، رسالة دكتوراه جامعة العربي بن مهيدي 2018.
- جمال عبد العزيم، إستشاري تصنيع غذائي، الرابطة العربية للصناعات الغذائية (AaFi)
- د.باسل كامل دلالي، د. كامل الركابي ، كيمياء الأغذية ، دار الكتب للطباعة و النشر جامعة الموصل 1981.
- درويش، سحر كتاب الورقيات الخضراء : الفوائد و الأضرار، صفحة12 .
- ربيعي عبد الكريم، تقدير المحتويات الفينولية والفعالية المضادة للأكسدة لمنتجات النحل فيالجزائر بالطرق الكهروكيميائية رسالة دكتوراه، جامعة قاصدي مرباح ورقلة 2016.
- س، ه باين، هندريكسون، د،ج إكرام . ج. س هاموند(1995). الكيمياء العضوية، المجلد الثاني الطبعة الرابعة دار الدولية للنشر و التوزيع.
- شربي رقية، "Etude de l'activité antioxydante des fraction lipidique et phénolique des feuilles et des graines de Lawsonia inermis d'Algérie " رسالة دكتوراه، جامعة قاصدي مرباح ورقلة 2017.
- الصديق قمولي،دراسة الكهروكيميائية لفينولات بعض أنواع التمرالمحلي .مذكرة ماستر .ورقلة : جامعة قاصدي مرباح،ص، 2010 .
- علاوي مسعودة، الدراسة الفيتوكيميائية و التقييم الميكروبيولوجي لنبنتين فصيلة الرمرامية تستعملان في الطب التقليدي و الصحراوي (Remth) Haloxylon scoparium Pomel (Thamran)،Traganum nudatum رسالة دكتوراه، جامعة قاصدي مرباح ورقلة 2015.

- فؤاد عبد العزيز الشيخ (1999). صناعة زيت النخيل و مشتقاته ، دار النشر للجامعات الطبعة الأولى.
- لقميريسهيلة، تحضير ودراسة الكتروكيميائية وبنوية للأمينات فيروسينيل مثيلأمين 2 - (3و4) -نتروبنزين،ماجستير . ورقة : جامعة قاصدي مرباح،2008، 24-30ص.
- م.بوقوادة، دراسة فيتوكيميائية لليبيدات و الفينولات في بعض أنواع نوى التمر المحلى رسالة ماجستير،جامعة قاصدي مرباح ورقة 2008.
- موريس و بويد،ترجمة فاروق قنديل و صلاح القادري(2000) كيمياء عضوية.منشورات المركز العربي للتعريب و الترجمة و التأليف و النشر، دمشق.
- ه.ع، عبد الواحد،م.ف، عباس .ك،ا،عباس.، تأثير صنف اللقاح في التغيرات ببعض الأنزيمات النباتية خلال نمو ثمار نخيل التمر صنف الحلاوي. مجلة أبحاث البصرة 2010.6 (36): ص 115-124.

- A.D.Sarma,AR Mellick,and A.K Gloosh,free radical and thier role in different chichal conditions:Anoverview.international journal pd pherma Science and Research,2010,1(3):P185-192.
- A.merouane., A.noui., H.Medjahed., K.Nedjari., A.nhadj, A.saadi, Activité antioxydante des composés phénoliques d'huile d'olive extraite par méthode traditionnelle. *Int. J. Biol. Chem. Sci*, 2014, 8(4) : 1865-1870.
- Ainsworth, E.A.; Gillespie, K.M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nat. Protoc.* **2007**, 2, 875–877.
- Aktumsek, A.; Zengin, G.; Guler, G.O.; Cakmak, Y.S.; Duran, A. Screening for in vitro antioxidant properties and fatty acid profiles of five *Centaurea L.* species from Turkey flora. *Food Chem. Toxicol.* **2011**, 49, 2914–2920.
- Alam, M.N.; Bristi, N.J.; Rafiquzzaman, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharm. J.* **2013**, 21, 143–152.
- Al-Badr, A.A.; Mostafa, G.A.E. Chapter Eight—Pravastatin Sodium. In *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*; Brittain, H.G., Ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, **2014**; Volume 39, pp. 433–513.
- AMINA,BOUDJADA,Etude Phytochimique de deux espèce *Cratagus azarolus L.*(Rosaceace) et *Dioscorea communis L.*(Dioscoreaceae) le Diplôme de Doctorat,Université des freres Mantouri Constantine **2018**.
- Anyasor G.,Kyode O. Comparative antioxidants,phytochemical and proximade analysis of Aqueous Methanilic Extracts of *Vernonia amygdalina* and *Talinum triangullar* pakistan journal of Nutrition **2010**.9(3).p259-264.
- Apak, R.; Çapanoğlu, E.; Shahidi, F. Measurement of Antioxidant Activity and Capacity—Recent Trends and Applications; John Wiley & Sons Ltd.: Hoboken, NJ, USA, **2018**; pp. 1–283.]
- Apak, R.; Guclu, K.; Ozyurek, M.; Karademir, S.E. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 7970–7981.
- Apak, R.; Guclu, K.; Ozyurek, M.; Karademir, S.E.; Altun, M. Total antioxidant capacity assay of human serum using copper(II)-neocuproine as chromogenic oxidant: The CUPRAC method. *Free Radic. Res.* **2005**, 39, 949–961.
- Apak, R.; Özyürek, M.; Güçlü, K.; Çapanoğlu, E. Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, 64, 997–1045.
- Aparadh, V.; Naik, V.; Karadge, B. Antioxidative properties (TPC, DPPH, FRAP, metal chelating ability, reducing power and TAC) within some Cleome species. *Ann. Bot.* **2012**, 2, 49–56.
- B.J.Day,catalase and glutathique perosidase mimics.biochemical peroxidases febs journal,2007.274(9):P.2163-2180.
- Bara.D,Lahiri.D.and Nag.A,Studies on a natural antioxidants for stabilization on a oil and comparison with synthetic antioxidants journal of food engineering,2006.(4):P.542-545.
- Becker, E.M.; Nissen, L.R.; Skibsted, L.H. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. *Eur. Food Res. Technol.* **2004**, 219, 561–571.
- Benjamin M. Dorsey, Marjorie A. Jones, in *Handbook of Coffee Processing By-Products, Healthy components of coffee processing by products*;2017.
- Benzie, I.F.; Strain, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal. Biochem.* **1996**, 239, 70–76.
- Benzie, I.F.F.; Strain, J.J. [2] Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. In *Methods in Enzymology*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, **1999**; Volume 299, pp. 15–27.
- Berker, K.I.; Guclu, K.; Tor, I.; Apak, R. Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. *Talanta* **2007**, 72, 1157–1165.

- Bhaskar, H.; Balakrishnan, N. In vitro antioxidant property of laticiferous plant species from Western Ghats Tamilnadu, India. *Int. J. Health Res.* **2009**, *2*, 163–170.
- Birden, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O. oxidative stress and antioxidant Defence. *The world allergy organization Journal* **2012**, *5*(1), 9.
- Blasco, A. J., González, M. C., & Escarpa, A. Electrochemical approach for discriminating and measuring predominant flavonoids and phenolic acids using differential pulse voltammetry: towards an electrochemical index of natural antioxidants. *Analytica Chimica Acta*, **2004**. *511*(1), 71-81.
- Blasco, A.J.; Rogerio, M.C.; Gonzalez, M.C.; Escarpa, A. Electrochemical index as a screening method to determine total polyphenolics in foods: A proposal. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *539*, 237–244.
- Boora, F.; Chirisa, E.; Mukanganyama, S. Evaluation of nitrite radical scavenging properties of selected Zimbabwean plant extracts and their phytoconstituents. *J. Food Process.* **2014**, *2014*, 918018.
- Bordonaba, J. G., & Terry, L. A. Electrochemical behaviour of polyphenol rich fruit juices using disposable screen-printed carbon electrodes: Towards a rapid sensor for antioxidant capacity and individual antioxidants. *Talanta*, . **2012**. *90*, 38-45.
- Brainina, K. Z., Ivanova, A. V., Sharafutdinova, E. N., Lozovskaya, E. L., & Shkarina, E. I. Potentiometry as a method of antioxidant activity investigation. *Talanta*, **2007**. *71*(1), 13-18.
- Bubliss, A. J., Clydesdale, E. M., & Decker, E. Antioxidants in wheat based breakfast cereals. *Cereal Foods World*, **2000**. *45*:71-74.
- Bukman, L., Martins, A. C., Bazià, E. O., Visentainer, J. V., & de Cinq Almeida, V. DPPH assay adapted to the condition Using the reponse surface methodology. *Food analytical Method*, . **2013**. *6*(5), 1424-1432.
- Butuariu, M., and Grozea, I. :antioxidants (antiradical) compounds, *J bioequivavailab.*, **2012**, *4*:107-109.
- C. Enrique, P. lester. "Handbook of antioxidant", 2^{ème} end, New York Basel Marsel Dekker. Inc. **2002**.
- Cai, Y., Q. Luo, et al. (2004). "Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer." *Life sciences* **74**(17): 2157-2184.
- Campos, C.; Guzmán, R.; López-Fernández, E.; Casado, Á. Evaluation of the copper (II) reduction assay using bathocuproinedisulfonic acid disodium salt for the total antioxidant capacity assessment: The CUPRAC-BCS assay. *Anal. Biochem.* **2009**, *392*, 37–44.
- Cao, G., Alessio, H. M., Culter, R. G. Oxygen radical absorbance capacity assay for antioxidant free radicals. *Biol. Med.* **1993** *14*, 303–311.
- Carocho, M.; Ferreira, I. C. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, *51*, 15–25.
- Carocho, M. and Ferreira, I. C., A Review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, Screening and analysis methodologies and future perspective. *Food and chemical Toxicology*, **2013**. *51*:P.15-25.
- Çekiç, S. D.; Çetinkaya, A.; Avan, A. N.; Apak, R. Correlation of Total Antioxidant Capacity with Reactive Oxygen Species (ROS) Consumption Measured by Oxidative Conversion. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 5260–5270.
- CH. Kochelin-Ramonatxo, Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*, **2006**, *20*, 165-177.
- Cham, B. E., Smith, J. L., and Colquhoun, D. M. interdependence of Serum Concentration of vitamine K 1, vitamine E lipids, apolipoprotein A1, and apolipoprotein B: importance in assessing vitamin status. *Clinica chimica acta*, **1999**. *287*(1-2):P45-57.
- Choirunnisa, A. Comparison of five antioxidant assays for estimating antioxidant capacity from three *Solanum* sp. extracts. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* **2016**, *9*, 123–128.
- Corbett, J. T. The scopoletin assay for hydrogen peroxide—A review and a better method. *J. Biochem. Biophys. Methods* **1989**, *18*, 297–307.
- D. D. M. wayner, G. w. Burton, K. U. Ingold, S. Locke. Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation: The important contribution made by plasma proteins; **1985**.

- D.Mark Hodges.;John M.Delong.;Charles F.Forney.;Robert K.Parange. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substance assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds;**1999**, 207(4):604-611.
- de Quiros.A.R.B,and Costa H.S,Analysis vegetable and Plasma Samples:A review journal of Food composition and analysis,**2006**.19(2-3):P.111-97.
- Denys J.Charls.book,Antioxidant Properties of Spices,Herbs and Other Sources Chapetre 01;**2013**.13,17,15.
- Devasagayam,T.P.A,Tilak,J.C.,Bloor,K.K.,same , K.S., Ghaskadbi,S,S.
- Dinis, T.C.P.; Madeira, V.M.C.; Almeida, L.M. Action of phenolic derivatives (Acetaminophen, Salicylate, and 5-Aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Arch. Biochem. Biophys.* **1994**, *315*, 161–169.
- Eduardo, Lissi.; Marta,Salim-Hanna.; Carlos,Pascual.;Maria D,del,Castillo.Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements;**1995**, 153-158.
- Farmer EE, Davoine C Reactive electrophile species. *Curr OpinPlant Biol***2007**. 10:380–386.
- Fasiku, V.; Omolo, C.A.; Govender, T. Free radical-releasing systems for targeting biofilms. *J. Control. Release* **2020**, *322*, 248–273.
- Fereidoon,Shahidi.;Y,Zhong. Methods for the assessment of in antioxidant activity foods11This chapter is reproduced to a large extent from an article in press by the authors in the Journal of Functional Foods; in book: Handbook of Antioxidants for Food Preservation**2015** (pp.287-333).
- Forss D.A. Pont E.G. Stark W. The Volatile Compounds Associated with Oxidized Flavour in Skim Milk. *J. Dairy Research.* **1955**; 22- 91.
- Fortalezas, S.; Tavares, L.; Pimpão, R.; Tyagi, M.; Pontes, V.; Alves, M.P.; McDougall, G.; Stewart, D.; Ferreira, B.R.; Santos, N.C. Antioxidant properties and neuroprotective capacity of strawberry tree fruit (*Arbutus unedo*). *Nutrients* **2010**, *2*, 214–229
- Foti, M.C. Use and Abuse of the DPP^{H+} Radical. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 8765–8776.
- Frank@ fengchengroupe.com
- Fritsche.K,and Mc Guire. S, the use of dietary synthetic antioxidants at recommended levels does not alter rat immune cell eicosanoid production or hepatic Vitamin E Concentration *Nutrition Research*,**1999**.17(8):P.1311-1319.
- Galato, D., Ckless, K., Susin, M. F., Giacomelli, C., Ribeiro-do-Valle, R. M., & Spinelli, A. Antioxidant capacity of phenolic and related compounds: correlation among electrochemical, visible spectroscopy methods and structure–antioxidant activity. *Redox Repor.* **2001**.t, *6*(4), 243-250.
- Gerdon,M.H.: the mechanism of antioxidant in vitro "Food antioxidant" : ed HuDSON B.J.F. (**1990**) pp: 1-18.
- Gil, M.I.; Tomas-Barberan, F.A.; Hess-Pierce, B.; Holcroft, D.M.; Kader, A.A. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 4581–4589.
- Gnonlonfin, B.; Sanni, A.; Brimer, L. Review Scopoletin—A Coumarin Phytoalexin with Medicinal Properties. *Crit. Rev. Plant Sci.* **2012**, *31*, 47–56.
- Griess, J.P., XVIII. On a new series of bodies in which nitrogen substituted for hydrogen. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* **1864**, *154*, 667–731.
- Grigore, A.; Paraschiv, I.; Mihul, A.; Corina, B.; Draghici, E.; Ichim, M. Chemical composition and antioxidant activity of *Thymus vulgaris* L. volatile oil obtained by two different methods. *Rom. Biotechnol. Lett.* **2010**, *15*, 5436–5443.
- Grisham, M.B. Methods to detect hydrogen peroxide in living cells: Possibilities and pitfalls. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **2013**, *165*, 429–438.
- Grossi, L.; D'Angelo, S. Sodium Nitroprusside: Mechanism of NO Release Mediated by Sulfhydryl-Containing Molecules. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 2622–2626.
- Grotto, D.; Maria, L.S.; Valentini, J.; Paniz, C.; Schmitt, G.; Garcia, S.C.; Pomblum, V.J.; Rocha, J.B.T.; Farina, M. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects FOR malondialdehyde quantification. *Quím. Nova* **2009**, *32*, 169–174.
- Guo, L.; Zhang, Y.; Li, Q. Spectrophotometric determination of dopamine hydrochloride in pharmaceutical, banana, urine and serum samples by potassium ferricyanide-Fe(III). *Anal. Sci.* **2009**, *25*, 1451–1455.

- Gürkan;H.the role of free radicas ethiopathogenesis of dideases.Advance in Molecular Biology, **2008** ,(1),1-9.
- H. Sies, Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med*, 1991, 91, 31S-38S.
- Halliwell,B.,Aeschbach,R.,Ioliger,J.,aruoma,OI.the characterization of antioxidant Food chem Toxicol., **1995**.33(7):601-617.
- Halliwell, B. Free radicals and antioxidants—Quo Vadis? *Trends Pharmacol. Sci.* **2011**, 32, 125–130.
- Halliwell, B. How to characterize a biological antioxidant. *Free Radic. Res.* **1990**, 9, 1–32.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C.; Aruoma, O.I. The deoxyribose method: A simple “test-tube” assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal. Biochem.* **1987**, 165, 215–219.
- Hegerman, A.E.; Riedl, K.M.; Jones, G.; Sovik, K.N.; Rechard, N.T.; Hartzfeld, P.W.; Reichel, T.L. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, 1887–1892.
- Hetrick, E.M.; Schoenfisch, M.H. Analytical chemistry of nitric oxide. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2009**, 2, 409–433.
- Hogg, J.S., Lohmann, D.H. & Russell, K.E. The kinetics of reaction of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl with phenols. *Canadian Journal of Chemistry*,**1961**.39(8), 1588–1594.
- Huang, D.; Ou, B.; Prior, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 1841–1856.]
- Irina Georgiana, Munteanu, Constantin,Apetrei .Analytical method Used in Determining antioxidant activity :A Review;**2021**, 5.
- Jacobi.H,Eicke.B.,and Witdte I,DNA stand break induction and enhancel cytotoxicity of propyl gallate in the presence of copper (II).free radical biology and Medicine,**1998**.24(6) P:972-978.
- Jayathilakan.K,Sharma.G,Radthakrishma. K,and Baw.A,antioxidant potential of synthetic and naturel antioxidants and its rffect on warmedover –flavour in different Species of meat. Food chemistry,**2007**.105(3) :P.908-916.
- Johnson-Davis.K.L,Moore.S.J,Owen.W.E,Cutler.J.M,and Frank.E.L,A rapid HPLC method Used to establish pediatric reference intervals for vitamine A and E.clin chimacta,**2009**.405(1-2):P.35-38.
- Jose, C. G., R. H. Jacob, et al"Short term supplementation rates to optimise vitamin E concentration for retail colour stability of Australian lamb meat." *Meat Science.* (**2016**).**111**: 101-109.
- K. Yen, H.B. Patel, A.L. Lublin, and C.V. Mobbs, *SOD isoforms play no role in lifespan in adlib or dietary restricted conditions, but mutational inactivation of SOD-1 reduces lifeextension by cold.* *Mechanisms of ageing and development*, **2009**. **130**(3): p. 173-178.
- Kanofsky, J. R.. "Singlet oxygen production by biological systems." *Chemico-Biological Interactions* (**1989**).**70**(1–2): 1-28.
- Karadag, A.; Ozcelik, B.; Saner, S. Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Anal. Methods* **2009**, 2, 41–60.
- Kedare, S.B.; Singh, R.P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J. Food Sci. Technol.* **2011**, 48, 412–422.
- Kh. Z. Brainina, A.V. Ivanova, Mean of solutions oxidant/antioxidant activity determination, Patent of RF No. 2235998 (Priority date14/11/**2002**).
- Kim, D.-O.; Lee, K.W.; Lee, H.J.; Lee, C.Y. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 3713–3717.
- Kohn, H.I.; Liversedge, M. On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine, and menadione. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1944**, 82, 292–300.
- Korotkova, E. I., Karbainov, Y. A., & Avramchik, O. A. Investigation of antioxidant and catalytic properties of some biologically active substances by voltammetry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, **2003**.375(3), 465-468.
- Korotkova, E. I., Karbainov, Y. A., & Shevchuk, A. V. Study of antioxidant properties by voltammetry. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, (**2002**).518(1), 56-60.
- Krasnovsky Jr, A. A. "Luminescence and photochemical studies of singlet oxygen photonics." *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*(**2008**).**196**(2–3): 210-218.
- L.Flohé and F. Ursini,peroxidase: a term of many meanings.antioxidants redox signaling ,**2008**.10(9):P1485-1490.

- Lage, M.Á.P.; García, M.A.M.; Álvarez, J.A.V.; Anders, Y.; Curran, T.P. A new microplate procedure for simultaneous assessment of lipophilic and hydrophilic antioxidants and pro-oxidants, using crocin and β -carotene bleaching methods in a single combined assay: Tea extracts as a case study. *Food Res. Int.* **2013**, *53*, 836–846.
- Lakhanpal, P.; Rai, D.K. Quercetin: A versatile flavonoid. *IJMU* **2007**, *2*, 22–37.
- Larson, R.A.; the antioxidants of higher plants. *phytochemistry*, **1988**.27:969-978.
- Leher, H.A, Vajkoczy, P, Menger, M.D and arfors, K.E. DO vitamine E supplements in diets for laboratory animals jeopardize findings in animals models of disease. *free radical biology and Medicine*, **1999**.26(3-4):P474-481.
- Lele ,R.D., Health:Current status and Future Prospects. *JA PI*.52:794-804.
- Lissi, E.; Salimhanna, M.; Pascual, C.; Delcastillo, M.D. Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. *Free Radic. Biol. Med.* **1995**, *18*, 153–158.
- Lu, Y, Jiang, F, Jiang .H, Wu .K, Zheng, X, Cai, Y, Katakowski, M, chopp, M and To, S.S, Gallic acid suppresses cell viability, proiferation, invasion and angiogenesis in human glioma cells. *European journal pharmacology*, **2010**.614 (2-3):P.102-107.
- M. ADJADJ, Activité antioxydante et anti-inflammatoire de la plante médicinale *Paronychia argentea* L. Thèse de Doctorat, Université Ferhat Abbas Sétif 1, **2016**.
- M.Ali, Aboudzadech. Book" Emulsion-based Encapsulation of antioxidants Desing and performance" ,**2020**, 197'(4).
- M.Ali, Abouzadech.; Book, Emulsion-based Encapsulation of antioxidants; **2020**
- M.mongens, origine et conséquences du stress oxydant. Thèse de doctorat, école nationale vétérinaire d'alfort, **2013**.
- M.N.Alvare Z, G.peluffo, L.piacenza, and R.Radi, Intrapagosomal peroxynitrite as a macrophage-derived cytotoxin against internalized trypanosoma cruzi consequences for oxidative killing and role of microbial chemistry, **2011**.286(8):P6627-6640.
- Magalhães, L.M.; Segundo, M.A.; Reis, S.; Lima, J.L.F.C. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Anal. Chim. Acta* **2008**, *613*, 1–19.
- María Teresa Morenoa .; Rafael Estévez Britoa .; José Miguel Rodríguez Mellado. Modified CUPRAC method with electrochemical detection for the determination of antioxidant capacity of gallic acid ;**2020**, p. 395-401
- Marques, S.S.; Magalhães, L.M.; Tóth, I.V.; Segundo, M.A. Insights on Antioxidant Assays for Biological Samples Based on the Reduction of Copper Complexes—The Importance of Analytical Conditions. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 11387–11402.
- Marquez, L.A.; Dunford, H.B. Transient and Steady-State Kinetics of the Oxidation of Scopoletin by Horseradish Peroxidase Compounds I, II and III in the Presence of NADH. *Eur. J. Biochem.* **1995**, *233*, 364–371.
- Mazumder, P.M, Rathinavelusany, P and Sasmal, D, Role of antioxidants in phytomedicine with special refernce to antidiabetic herds. *Asin pacific journal of Tropical Disease*, **2012**.2:p.969-979.
- Milardovic, S., Iveković, D., & Grabaric, B.S. A Novel amperometric method for antioxidant activity determination Using DPPH free radical bioelectrochemistry, **2006**.68(2);175-180.
- Miller, C.; Taylor, A. On reduction of ammonium molybdate in acid solution. *J. Biol.* **1914**, *17*, 531–535.
- Miller, N.J.; Rice-Evans, C.; Davies, M.J.; Gopinathan, V.; Milner, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.* **1993**, *84*, 407–412.
- Miller, N.J.; Rice-Evans, C.A. Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS•+ radical cation assay. *Free Radic. Res.* **1997**, *26*, 195–199.
- Miller, R.W.; Sirois, J.C.; Morita, H. The reaction of coumarins with horseradish peroxidase. *Plant Physiol.* **1975**, *55*, 35–41.
- Miller, N.J., Sampson, J., Candeias, L.P., Bramley, P.M., Rice-Evans, Min, D.B.; Boff, J.M. Lipid oxidation of edible oil. In *Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology*; Marcel Dekker: New York, NY, USA, **2002**; pp. 335–363.
- Mimić, J., Dragan V , Tatjana P ; Free Radicals In Cardiovascular Diseases ; *Medicine And Biology* 6.1.11-22(**1999**).
- Molina-Díaz, A.; Ortega-Carmona, I.; Pascual-Reguera, M.I. Indirect spectrophotometric determination of ascorbic acid with ferrozine by flow-injection analysis. *Talanta* **1998**, *47*, 531–536.
- Mozahheb, N.; Arefian, E.; Amoozegar, M.A. Designing a whole cell bioreporter to show antioxidant activities of agents that work by promotion of the KEAP1–NRF2 signaling pathway. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 3248.

- N.MOUATS.Etude électrochimique des dérivés de l'acide 2-Nitrophenyl sulfonyl Acétique. Mémoire de Magister. Skikda : Université De 20 Aout **1955**, 2010, 20 p.
- Nabeelah,Bibi.; Dominico,Montesano.; Stefania ,Albrizio.; Gokhan,Zengin.; Mohamad ,Fawzi,Mahomoodally. The Versatility of Antioxidant Assays in Food Science and Safety—Chemistry, Applications, Strengths, and Limitations.**2020**, 02.
- Nagul, E.A.; McKelvie, I.D.; Worsfold, P.; Kolev, S.D. The molybdenum blue reaction for the determination of orthophosphate revisited: Opening the black box. *Anal. Chim. Acta* **2015**, 890, 60–82.
- Newkirk .K A, Gilchrist .L,Hand.L.W,and sutton.D.S, effects of synthetic antioxidants and Rosemary Extracts of synthetic antioxidative Rancidity and color stability in whole hog Sausage.*animal science*,**1993**:P.78-83.
- Nguyen, V.B.; Wang, S.-L.; Nguyen, A.D.; Lin, Z.-H.; Doan, C.T.; Tran, T.N.; Huang, H.T.; Kuo, Y.-H. Bioactivity-guided purification of novel herbal antioxidant and anti-NO compounds from *Euonymus laxiflorus* champ. *Molecules* **2018**, 24, 120.
- nikov, H. C., & Pogorel'tzev, V. I. Electrochemical determination of the total antioxidant capacity of human plasma. *Analytical and bioanalytical chemistry*,**(2005)**.381(8), 1546-1551.
- Nimse, S.B.; Pal, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Adv.* **2015**, 5, 27986–28006.
- Opitz, S.E.W.; Smrke, S.; Goodman, B.A.; Yeretziyan, C. Chapter 26—Methodology for the measurement of antioxidant capacity of coffee: A validated platform composed of three complementary antioxidant assays. In *Processing and Impact on Antioxidants in Beverages*; Preedy, V., Ed.; Academic Press: San Diego, CA, USA, 2014; pp. 253–264Özyürek, M.; Güçlü, K.; Tütem, E.; Sözgen Başkan, K.; Erçağ, E.; Karademir Çelik, S.; Baki, S.; Yıldız, L.; Karaman, Ş.; Apak, R. A comprehensive review of CUPRAC methodology. *Anal. Methods* **2011**, 3, 2439–2453.
- Ou B, Hampsch-Woodill M and Prior R L Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescence probe. *J Agric Food Chem***2001**. 49(10): 4619-4626.
- Ou,Boxin.; DeJain Haung.; Maureen Hampsch-woodill.; Judith A.Flangan.;Elizabeth K.Deemer.Analysis of antioxidant activity of common Vegetable Employing oxygen Radical Capacity(ORAC) and Ferric Reducing antioxidants Power (FRAP) assays:A Comparative study; **2002**
- P.I. Merksamer., Y Liu., W He., M.D. Hirschey., D. Chen, E. Verdin, The sirtuins, oxidative stress and aging: an emerging link. *Aging*, **2013** ,5 (3) : 144-150.
- P.Sharma,A.B.Jha,R.S.Duby, and M Pessaraki .and Reactive oxygen Species, oxidative Dannage and antioxidative Dfence Mechanism in plants Under stressful conditions .*Journal od Botany* ,**2012**(2012):P.26.
- Pelli.K.and lyly.M,les antioxidants dans l'aliementation.2003:institut national de la recherche agronomique.
- Porter, W.L.; Black, E.D.; Drolet, A.M. Use of polyamide oxidative fluorescence test on lipid emulsions: Contrast in relative effectiveness of antioxidants in bulk versus dispersed systems. *J. Agric. Food Chem.* **1989**, 37, 615–624.
- Prado, F.; González, J.; Boero, C.; Sampietro, A. A simple and sensitive method for determining reducing sugars in plant tissues. Application to quantify the sugar content in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) seedlings. *Phytochem. Anal.* **1998**, 9, 58–62.
- Prieto, M.A.; Rodríguez-Amado, I.; Vázquez, J.A.; Murado, M.A. β -carotene assay revisited. Application to characterize and quantify antioxidant and prooxidant activities in a microplate. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, 60, 8983–8993.
- Prieto, P.; Pineda, M.; Aguilar, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of Vitamin E. *Anal. Biochem.* **1999**, 269, 337–341.
- Prieto, P.; Pineda, M.; Aguilar, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of Vitamin E. *Anal. Biochem.* **1999**, 269, 337–341.
- Prior, R.L., Hoang, H., Gu, L., Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity(ORAC (FL)) of plasma and other biological and food samples. *J. Agric. Food Chem.***2003**. 51, 3273–3279.
- Prior, R.L.; Wu, X.; Schaich, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 4290–4302.

- Pulido, R., Bravo, L., & Sauro-Calixto, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (2000), 48(8), 3396–3402.
- Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, 26, 1231–1237.
- Regoli, F.; Winston, G.W. Quantification of Total Oxidant Scavenging Capacity of Antioxidants for Peroxynitrite, Peroxyl Radicals, and Hydroxyl Radicals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1999**, 156, 96–105.
- Remmlt van der werf. Evaluation du pouvoir anti-oxydant des aliments : recherche de leurs effets modulateurs sur le stress oxydant dans le cas du diabète, 2013. 84 .
- Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* **1996**, 20, 933–956.
- Ruch, R. J., Cheng, S. J., & Klaunig, J. E. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intracellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis*, (1989). 10, 1003–1008.
- Russel, G.A.; Deuterium isotope effects in the autoxidation of aralkyl hydrocarbons Mechanism of the interaction of peroxy radical. *J. Am. Chem. Soc.*, **1957**, 79:3871-3877.
- S. Herbett, P. Roeckel-Devert, and J. R. Devert, Seleno-independent glutathione peroxidases. *Febs journal*, **2007**, 274(9):P.2163-2180.
- S. Sen. R, Charkraborty, c. sridhar, y. Reddy, and B. De, free radical, antioxidants, diseases and phytomedicines: current status and future prospects. *international journal of pharmaceutical science Review*. 3(1):P91-100.
- Sánchez-Moreno, C. Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. *Food Sci. Technol. Int.* **2002**, 8, 121–137.
- Sánchez-Rangel, J.C.; Benavides, J.; Heredia, J.B.; Cisneros-Zevallos, L.; Jacobo-Velázquez, D.A. The Folin–Ciocalteu assay revisited: Improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Anal. Methods* **2013**, 5, 5990–5999.
- Santos, J.S.; Alvarenga Brizola, V.R.; Granato, D. High-throughput assay comparison and standardization for metal chelating capacity screening: A proposal and application. *Food Chem.* **2017**, 214, 515–522.
- Schaich, K.M.; Tian, X.; Xie, J. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *J. Funct. Foods* **2015**, 14, 111–125.
- Shaffer, P.A.; Williams, R.D. Sugar determination by the ferricyanide electrode. *J. Biol.* **1935**, 111, 707–723.]
- Shahidi, F.; Zhong, Y. Revisiting the polar paradox theory: A critical overview. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, 59, 3499–3504.
- Siddeeg, A.; AlKehayez, N.M.; Abu-Hiamed, H.A.; Al-Sanea, E.A.; AL-Farga, A.M. Mode of action and determination of antioxidant activity in the dietary sources: An overview. *Saudi J. Biol. Sci.* **2021**, 28, 1633–1644.
- Sies, H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol.* **2017**, 11, 613–619.
- Singleton, V.L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventos, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* **1999**, 299, 152–178.
- Smith, P.; Krohn, R.; Hermanson, G.; Mallia, A.; Gartner, F.; Provenzano, M.; Fujimoto, E.; Goeke, N.; Olson, B.; Klenk, D. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **1985**, 150, 76–85.
- Sohal, R., Allen, R., and Nations, C. Oxygen free radicals play a role in cellular differentiation: an hypothesis. *Journal of free radicals in biology & medicine*, 1986. 2(3): p. 175-181.
- Sorg, O. "Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality?" *Comptes Rendus Biologies* (2004), 327(7): 649-662.
- Souhila, Rouna & Hayat, Boudour, Etude de l'activité antioxydante de quelques composés de synthèse organique Master en chimie, Université Mohamed Seddik BEN-YAHIA-Jijel **2019**.
- Souza, L. P., Calegari, F., Zarbin, A. J., Marcolino-Júnior, L. H., & Bergamini, M. F. Voltammetric determination of the antioxidant capacity in wine samples using a carbon nanotube modified electrode. *Journal of agricultural and food chemistry*, **2011**. 59(14), 7620-7625.
- T. Fukia and M. Ushio-Fukia, Superoxide dismutase role in redox signaling, Vascular function, and diseases, antioxidants and redox signaling, **2011**, 15(6):P.1583-1606.

- T.Takigwa,K.Ogino,and M.Nishimuura,the role of catalase in pulmonary Fibrosis respiratory research,**2010**.11.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Byrne, D. H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating 19(6), 669-675.
- Thangaraj, P. Medicinal Plants: Promising Future for Health and New Drugs, 1st ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, **2018**; 382p.
- Thomas P.A. Devasagayam, Jai C Tilak, K. K. Bloor, Ketaki S Sane, Saroj S. Ghaskadbi, Ramchandra D. Lele, Free Radicals And Antioxydants In Human Health :Current Status And Future Prospects, *JAPI*,VOL.52,794-804(**2004**).
- Thomas, D.D. Breathing new life into nitric oxide signaling: A brief overview of the interplay between oxygen and nitric oxide. *Redox Biol.* **2015**, *5*, 225–233.
- Tsikas, D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *J. Chromatogr. B* **2007**, *851*, 51–70.
- Tung-Sheng Chen.;Show-Yih Liou.;His-Chin wu.;Fuu-jen Tasai.;Chang-Hai Tsia.;Chih-yang Huang.;Yen-lin Chang. New Analytical Method for Invertingating the antioxidant Power of Food Extracts on the Basis of their Electron-Donating Ability:Comparision to the Ferric Reducing /Antioxidant Power(FRAP) assay;**2010**
- Tur'yan, Y. I., Gorenbein, P., & Kohen, R. Theory of the oxygen voltammetric electroreduction process in the presence of an antioxidant for estimation of antioxidantactivity. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, (**2004**).571(2), 183-188.
- Tyler Barker, V. T. H., Victoria E. Rogers, Roy H. Trawick. "Serum cytokines and muscle strength after anterior cruciate ligament surgery are not modulated by high-doses of vitamins E (α - and γ -tocopherol's) and C." *Cytokine*(**2015**).**74**: 279-286.
- Ueno, H.; Yamakura, S.; Arastoo, R.S.; Oshima, T.; Kokubo, K. Systematic evaluation and mechanistic investigation of antioxidant activity of fullerenols using β -carotene bleaching assay. *J. Nanomater.* **2014**, *2014*, 802596.
- 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.
- Van den Berg,R.,Haenen,G.R.,Van den Berg,H.,&Bast A,A.L.T. Applicability of an improved trolox equivalent antioxidants capacity(TEAC) assay for evalution of antioxidant capacity measurements of mixures.Food chemistry, (**1999**).88(4),567-570.
- Vollhart ,P.lester "Handbook of antioxidant",2émé end,NewYork Bsel.Marsel dakker.Inc. (**2002**)
- Walker, R.B.; Everette, J.D. Comparative Reaction Rates of Various Antioxidants with ABTS Radical Cation. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 1156–1161.
- Wang, J., Musameh, M., & Mo, J. W. Acid stability of carbon paste enzyme electrodes. *Analytical chemistry*, (**2006**).78(19), 7044-7047.
- Wang, J., X. Yuan, et al,"Scavenging activity of enzymatic hydrolysates from wheat bran." *Food Technology and Biotechnology.* (**2009**).**47**(1): 39.
- Wright, J.S.; Johnson, A.E.R.; DiLabio, G.A. Predicting the Activity of Phenolic Antioxidants: Theoretical Method, Analysis of Substituent Effects, and Application to Major Families of Antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1173–1183.
- Wu.T.W,Fung.K.P ,Zeng.L.H .Wu.J, and Nakamura .M, propyle gallate as a hepatoprotecotor in vitro and in vivo .biochemical pharmacology,1994.48(2):P.419-422.
- X.WU.Z.FU,and X.Wang,perxiredoxins in Colorectal neoplasms.Histology and Histopathology,**2010**.25(10):p.1297.
- XiU-Qin-L,chao.J,yan.S,Min-Li.Y,and Xiao-Gang.C,analysis of synthetic antioxidants and preservatives in edible Vegetable oil by HPLC/TOF –Ms.Food chemistry,**2009**.113(2):.692-700.
- Yahia, Y.; Benabderrahim, M.A.; Tlili, N.; Bagues, M.; Nagaz, K. Bioactive compounds, antioxidant and antimicrobial activities of extracts from different plant parts of two *Ziziphus* Mill. species. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0232599.
- Yashin, A. Y., Yashin, Y. I., & Chernousova, N. I. (2006). Definition of natural antioxidants by amperometric method. *PISHCHEVAIA PROMYSHLENNOST'- MOSKVAAGROPROMIZDAT*-,2,10.
- Zengin, G.; Sarikurkcu, C.; Aktumsek, A.; Ceylan, R.; Ceylan, O. A comprehensive study on phytochemical characterization of *Haplophyllum myrtifolium* Boiss. endemic to Turkey and its inhibitory potential against key enzymes involved in Alzheimer, skin diseases and type II diabetes. *Ind. Crops Prod.* **2014**, *53*, 244–251.

- Zengin, G.; Sarikurkcu, C.; Uyar, P.; Aktumsek, A.; Uysal, S.; Kocak, M.S.; Ceylan, R. *Crepis foetida* L. subsp. *rhoeadifolia* (Bieb.) Celak. as a source of multifunctional agents: Cytotoxic and phytochemical evaluation. *J. Funct. Foods* **2015**, *17*, 698–708.
- Zhou, F.; Millhauser, G.L. The rich electrochemistry and redox reactions of the copper sites in the cellular prion protein. *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256*, 2285–2296.
- Ziyatdinova, G. K., Budnikov, H. C., Pogorel'tzev, V. I., & Ganeev, T. S. The application of coulometry for total antioxidant capacity determination of human blood. *Talanta*, (2006).68(3), 800-805.

ملخص الدراسة:

هدفت هذه الدراسة المنهجية لتقييم ما ورد في الدراسات السابقة بخصوص المعايير و الأسس التي يتم من خلالها اختيار طرق تقدير الفعالية المضادة للأكسدة لبعض مستخلصات نباتات الطبية، حيث تم الاعتماد في الدراسة على إختيار 120 مقال مختار بشكل عشوائي في حدود السنوات من 2015 إلى 2020 و التي تم تصنيفها حسب العام نشرها و ترجمتها الى قيم نسبية، بالإضافة إلى ذلك و تكملة لما ورد في الدراسة الإحصائية للمقالات، تم الاستدلال بإستبيان إلكتروني، وادي تم إنشائه على منصة (google form) في الفترة الممتدة من 12 افريل إلى 20 ماي من السنة الجارية. وجد من خلال هذه الدراسة ماهية الأسباب التي تجعل الباحث على اختيار طرق تقدير الفعالية المضادة للأكسدة دون غيرها ، و التي أدلت على أن نسب إختبار الكسح الجذري كأعلى نسبة، تليها إختبارات الأكسدة و الارجاع فيما كانت جل الإختبارات الأخرى بنسب ضعيفة و التي أدلت بالأسباب في الجزء العملي.

الكلمات المفتاحية:

- Antioxydants
- Antioxydant efficacy astimation methods

This systematic study aimed to evaluate what was mentioned in previous studies regarding the criteria and bases by which methods for estimating the antioxidant activity of some medicinal plant extracts are selected. The study was based on the selection of 120 randomly selected articles within the years from 2015 to 2020, which They are categorized by year of publication and translated into relative values. In addition to this and a continuation of what was mentioned in the statistical study of the articles, an electronic questionnaire was inferred, which was created on the (google form) platform in the period from April 12 to May 20 of this year. Choosing the methods of estimating the antioxidant activity and not others, which showed that the percentage of smallpox scavenging test was the highest, followed by the oxidation and reflux tests, while most of the other tests had weak percentages, which indicated the reasons in the practical part.

Modes clés :

- Antioxydants
- Antioxydants efficacy astimation methods