رقم الترتيب:
رقم التسلسل:

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جـــامعة الـــــوادي

كليـــــة العلوم والتكنولوجيا

مذكرة تخرج لنيل شهادة

ماستر أكاديمي

مجال: علوم وتقنيات

فرع: هندسة طرائق

تخصص: هندسة كيميائية

من إعداد:

آسيا بته سمية تركي

الموضوع

دراسة جودة و مكونات البربوليس وحبوب اللقاح بالطرق الطيفية و الكهروكيميائية

نوقشت يوم: 2013/06/30

أمام لجنة المناقشة المكونة من:

السيد شعيبية ناصر	أستاذ مساعد (ب)	جامعة الوادي	رئيس
السيد التهامي العانز	أستاذ التعليم العالي	جامعة الوادي	مناقش
السيد اوراري علي	أستاذ التعليم العالي	جامعة سطيف	مناقش
السيد مصطفى بوقوادة	أستاذ مساعد (ب)	جامعة الوادي	مناقش
السيد ربيعي عبد الكريم	أستاذ مساعد (أ)	جامعة الوادي	مؤطر

2013-2012

شكر و تقدير

الحمد لله حمدا كثيرا ونشكره على نعمته و عونه في إتمام هذا البحث المتواضع

نتقدم في بداية بحثنا هذا بجزيل الشكر والاحترام إلى الأستاذ المؤطر " ربيعي عبد الكريم " على التوجيهات التي مدنا بها طيلة بحثنا فكان نعم المشرف حيث وجهنا حين الخطأ وشجعنا عند الصواب

كما نتقدم بجزيل الشكر والتقدير والعرفان الى اساتذتنا الفضلاء

ونخص بالذكر الاستاذ الدكتور "العانز التهامي " رئيس مخبر ترقية و تكنولوجيا الموارد الصحراوية "VTRS"

كما نتقدم بالشكر الجزيل الى السيد شعيبية ناصر استاذ مساعد في جامعة الوادي

على قبوله ترأس جلسة مناقشة هذا البحث

كما نوجه خالص الشكر إلى

السيد العانز التهامي استاذ التعليم العالي بجامعة الوادي

السيد اوراري علي استاذ التعليم العالي بجامعة فرحات عباس بسطيف

السيد بوقوادة مصطفى استاذ بجامعة الوادى

على قبولهم المشاركة في لجنة المناقشة واثرائها

كما لا يفوتنا في هذا المقام ان نقدم بشكرنا الجزيل ايضا الى السيد طلبية مُحَمَّد علي مسؤول مخبر ترقية و تكنولوجيا الموارد الصحراوية على مساعدته و نصائحه طوال عملنا في المخبر.

إلى كافة الزملاء و الزميلات بقسم سنة ثانية ماستر هندسة كيميائية وقسم ثانية ماستر محروقات وقسم ثانية ماستر كيمياء عضوية تحليلية

وإلى الطاقم الإداري بمعهد العلوم و التكنولوجيا بالوادي

آسيا سمية

قائمـــــــــــــــة الرموز	
الرمـز	**العنـــــــــــــوان**
AA	حمض الاسكوربيك (*acid ascorbic*)
Abs	الامتصاصية الضوئية
ARP	مقلوب IC_{50} (*Anti-Radicalaire Puissance*)
DPPH	*(1 ,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)*
DPV	فولتا متري الموجة المربعة (*Différentiel pulse voltamètre*)
EtOH	الايثانول (*Ethanol*)
E_{p1}	الجهد عند القمة الاولى ، كمون النتوء المصعدي
IC_{50}	تركيز المستخلص الفينولي لتثبيط 50 % من الجذور الحرة.
I_{50}	النسبة المئوية للتثبيط
I_{P1}	التيار عند القمة الاولى ، تيار النتوء المصعدي
GA	حمض الغاليك (*acid gallique*)
HPLC	الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء.
λ_{max}	طول الموجة الأعظمي
MeOH	الميثانول (*Methanol*)
PIC_1	القمة الاولى
PP	عينات حبوب اللقاح
Pr	عينات البروبوليس
SD	*Standard deviation*
SWV	الفولتامتري النبضي التفاضلي (*Square Wave Voltammetry*)
UV-Vis	الأشعة فوق البنفسجية – المرئية

قائمـــــــة الاشكال

الشكـل **الصفحة**

الفصل الاول

الشكل (I.1)	صمغ النحل	03
الشكل (2.I)	صورة لاستخدامات البروبوليس في تقوية أماكن ترابط الأقراص	06
الشكل (3.I)	صور لزواحف قتلها النحل وحنطها بواسطة البروبوليس	06
الشكل (I.4)	حبوب اللقاح	10
الشكل (I.5)	عملية جني حبوب اللقاح من ازهار النباتات	12

الفصل الثاني

الشكل(II.1$_a$)	نموذجين لمركبين غير فينوليين	17
الشكل(II.1$_b$)	نموذج لفينول بسيط	17
الشكل (2.II)	المركبات الفينولية من الشكل C_6-C_2, C_6-C_1, C_6	18
الشكل(3.II)	نماذج للمركبات الفينولية من الشكل C_6-C_4 , C_6-C_3	18
الشكل(4.II)	بعض النماذج للفيونولات من الشكل: C_6-C_1-C_6, C_6-C_2-C_6،ثنائي الفلافونيل.	18
الشكل(5.II)	نماذج لأحماض البنزويك	19
الشكل(6.II)	أمثلة لأحماض السيناميك.	19
الشكل(7.II)	تشكل الكومارينات	19
الشكل(8.II)	شكل بعض الكومارينات	19
الشكل(9.II)	الهيكل الأساسي للفلافونويدات	20
الشكل(10.II)	التراكيب الرنينية في جزيء DPPH	24
الشكل(11.II)	رسم تخطيطي يوضح مصدر مختلف الجذور الحرة المؤكسدة وأنماط تفاعلات الأكسجين المطبقة بيولوجيا	26
الشكل(12.II)	بنيةBHA	27

الشكل(13.II) بنيةBHT 28
الشكل(14.II) بنية لـ(GA) 28
الشكل(15.II) معادلة تثبيط جذر DPPH في وجود مضادات الجذور 30
الشكل(16.II) الفولتامتري الحلقي 36
الشكل(17.II) الفولتامتري النبضي التفاضلي 37
الشكل(18.II) الفولتامتري النبضي 37
الشكل(19.II) الفولتامتري النبضي التفاضلي 37

الفصل الثالث

الشكل(1.III) طريقة استخلاص صلب – سائل لعينات البروبوليس و حبوب اللقاح. 44
الشكل(2.III) عينات البروبوليس المدروسة 46
الشكل(3.III) عينات حبوب اللقاح المدروسة 46
الشكل(4.III) المكونات الاساسية لجهاز *PGZ 402y* ,(80) Voltalab. 59
الشكل(5.III) جهاز سوكسلي (*Salvent extractor SER* 148) 50
الشكل(6.III) عملية الاستخلاص في حوض الامواج فوق الصوتية 50
الشكل(7.III) شروط الفولتامتري الحلقي *Cyclic Voltammetry* 57
الشكل(8.III) شروط فولتا متري الموجة المربعة (SW) 58
الشكل(9.III) شروط الفولتامتري النبضي التفاضلي (DP) 58
الشكل(10.III) جهاز الكروماتوغرافيا السائلة ذات الكفاءة العالية HPLC 61

الفصل الرابع

الشكل(1.VI) كروماتوغرام المحاليل القياسية 77

مقدمة عامة:

يعتقد اغلب الناس ان العسل هو المنتج الوحيد للنحل، هذه المغالطة جعلتهم يتهافتون على هاته المادة التماسا للغذاء والدواء ، فكيف بهم الحال اليوم اذا اكتشفوا ان هناك في الخلية الى جانب العسل منتوجات اخرى تتجاوز في خصائصها العلاجية وفائدتها الغذائية العسل وعلى رأسها البربوليس، وحبوب اللقاح. هذه الحقيقة اثبتت بعد الاكتشافات الحديثة والتطور العلمي الهائل في طرق تحليل وتثمين المواد الطبيعية.

تعتبر حبوب اللقاح من اهم منتجات خلية النحل ،وهي التي تنتجها الاعضاء الزهرية المذكرة (الأسديه) بالزهرة وتجمع طبيعيا بواسطة النحل وهي المصدر الاساسي للبروتين و الدهون و الفيتامينات و الهرمونات للنحل و منتجاته، اذ بدونها لا يستطيع النحل العيش. تم اثبات فعالية حبوب اللقاح في علاج الكثير من الحالات المرضية ،واعتمد هذا الإجراء العلاجي على تعدد المركبات الفينولية ذات الفعالية المضادة للأكسدة ، الموجودة في هذه المنتجات. حيث عرفت حوالي 50 مادة فعالة بيولوجيا في حبوب اللقاح ،استخدمت كمضادات للميكروبات و مضادات للفيروسات و الفطريات و مضادات للأكسدة ، لمنعها تأكسد الدهون داخل الخلايا و هو الامر المهم في الوقاية من امراض الاورام.

من المعلوم ان النحل حشرة صغيرة محدودة القوة في القدرات الدفاعية التقليدية ،ويعيش في بيئة مليئة بالأعداء وبالظروف المناخية والطبيعية التي ربما تؤذي وتدمر مستعمراته ومنتجاته ،ولا بد له من البحث عن الوسائل التي توفر له شيئا من الحماية ضد ما قد يضره ،ومن الواضح أن إحدى اهم وسائل حماية النحل هو انتاجه لمادة (البروبوليس). فالنحل أمامه النباتات ،إليها يتجه في الحصول على غذائه وعلى المواد الأولية لبناء مستعمرات أماكن سكنه ،وتكاثره ،وتخزين غذائه ،وهناك مواد تصنعها النباتات لكي تستخدمها في معالجة وتعجيل التآم الخدوش والجروح التي تتعرض لها في الجذوع أو السيقان أو الفروع ،بفعل مختلف العوامل البيئية ،وهذه المواد ذات قوام صمغي ،تحتوي على مواد كيميائية ذات قدرات عالية على مقاومة نمو الميكروبات وتكاثرها ،ولذا يقوم النحل بتجميع تلك المواد النباتية من براعم قمم الأشجار ،ومن مواد سائل النسغ الصمغية المتدفقة على جذوعها وسيقانها ،ومن غيرها من أجزاء الأشجار،ثم صنع منها المزيج الصمغي لمادة «البروبوليس» الغروية ،كي يتم استخدمها قصد الحماية، ولمنع أي فرصة للكائنات او الظروف الطبيعية لإلحاق الاذى بالخلية .

في السنوات الأخيرة زاد العلماء من وتيرة الابحاث العلمية حول هاتين المادتين (حبوب اللقاح و البروبوليس) فوجدوا أن لهما تأثير فعال على جسم الإنسان من الناحية العلاجية و

الغذائية وليس له أي آثار جانبية معروفة، شملت هاته الابحاث و مسحت أغلب المناطق في العالم خاصة المعروفة بغطائها النباتي الكثيف و بإنتاجها الضخم لمنتجات النحل، و استكمالا للبحوث في هذا الصدد ارتأينا دراسة جودة و تركيبة كل من بروبوليس وحبوب اللقاح المنتجة في الجزائر نظرا لعذارة ونقص البحث في هذا الميدان في منطقتنا وذلك بإجراء تحاليل كمية و نوعية لتقدير بعض المركبات الفينولية بها، اضافة إلى اختبارات القدرة المضادة للأكسدة لهذه المنتجات بطرق دقيقة وحديثة.

قسمنا الدراسة الى جزأين :

الجزء النظري: ضم هذا الجزء فصلين

- ✓ الفصل الأول : عموميات حول مركبات البروبوليس و حبوب اللقاح.
- ✓ الفصل الثاني : دراسة عامة حول المركبات الفينولية ،و اقسامها و خصائصها العامة، فعالية مضادات الاكسدة ،وطرق تقدير فعالية المواد المضادة للأكسدة.

الجزء العملي: ضم هذا الجزء فصلين

- ✓ الفصل الثالث: تم تحديد مواد و طرق استخلاص العينات وطريقة تقدير كمية الفينولات و تقدير فعالية المواد المضادة للأكسدة.
- ✓ الفصل الرابع : يتم في هذا الفصل مناقشة وتحليل النتائج المتحصل عليها .

كما ذيلنا هذا البحث بخلاصة هي زبدة البحث و افاق تطويره و الاستفادة منه.

الفصل الأول:

عموميات حول منتجي

البروبوليس وحبوب اللقاح

. عموميات حول منتجي البروبوليس وحبوب اللقاح :

1.I. مقدمـة:

لقد أصبح استخدام منتجات النحل علما قائما بذاته وجه العلماء و الباحثين للغوص في أعماقه واكتشاف خباياه،حيث استخدمت منتجات النحل في العلاج منذ أمد بعيد، و لما كانت هذه الموارد طبيعية فليس هناك خوف من مضاعفات استخدامها و أيضا قد أثبتت جدواها في علاج بعض الأمراض الباطنية المختلفة و أيضا في الأمراض الجلدية و أمراض نقص المناعة و السرطان و العدوى الميكروبية سواء الفيروسية و البكتيرية و الفطرية، حيث بلغ عدد الأمراض التي تعالج بمنتجات النحل نحو 500 مرضاً، كما يوجد عديد من المستحضرات الدوائية في عدد من دول العالم لمنتجات النحل [1] .

2.I. البروبوليس:

1.2.I. تعريف االبروبوليس:

يعرف البروبوليس بعدة أسماء منها صمغ النحل، العكبر و علك النحل و صمغ النحل وغراء النحل وسذاب النحل والصمغ الشمعي والراتنجي و الدنج و السميطة[2-4].

الشكل (I.1) : صمغ النحل

صمغ النحل هو مادة ينتجها النحل عن طريق تجميع مواد راتنجية صمغية من قلف الأشجار وبراعمها ومعالجتها بطرق خاصة وإضافة بعض إفرازات يخرجها النحل من بطونه، و يتدرج لون صمغ النحل بين اللون الأصفر والبني إلى البني المخضر حسب المصدر النباتي، وله رائحة زكية تشبه رائحة الفانيلا، وإذا أحرق أصدر رائحة عطرية ممتعة جداً [2]. وهو لاذع المذاق، لزج الملمس، سهل الخلط مع شمع النحل.

وفي الخلية تقوم جماعات النحل بإضافة مُفرزات لعابية مختلفة إلى هذا الصمغ، كما تضيف إليه شرائح من الشمع الذي تصنعه أيضاً، فيخرج مزيج خاص من صنع النحل تستخدمه النحل بطريقتين؛ الأولى في تثبيت خلية النحل ودعمها وإغلاق الثقوب والفوهات التي فيها، وثانيها كمادة حامية لخلية النحل تقف سدًا منيعًا ضد دخول تلك الجراثيم والفطريات إلى

الخلية [2].وتحنيط جثث الكائنات الدخيلة مثل القوارض الصغيرة وغيرها، هذا التطهير من شأنه أن يمنع كل عمليات التعفن داخل الخلية [5].

I.2.2. تاريخ البروبوليس:

يقول الخبراء إن البروبوليس موجود منذ أكثر من 54 مليون عام، وإنه استخدم من قبل الإنسان لآلاف السنين، وقد استعمل أبوقراط البروبوليس كمرهم في علاج الجروح والقروح، وبعد أربعة قرون كتب الطبيب الروماني الشهير (ليني) عن فوائد العبر في شفاء القروح وتخفيف التورمات وتطرية المناطق القاسية، واستعمل البروبوليس في القرون الوسطى كمادة مضادة لالتهابات جوف الفم ومضاد لفلح الأسنان، كما استعمل في علاج الزكام وآلام المفاصل، ومن إحدى العادات المتبعة في ذلك الحين أن توضع كمية قليلة منه على سُـره الوليد[2] .

لكن معرفة البروبوليس أقل قدما من معرفة العسل ويعتقد أنه عرف عند المصريين القدامى[6] حيث أشارت النقوش المرسومة على جدران المعابد الفرعونية أنهم استخدموا البروبوليس للحفاظ على الصحة و الجمال كما استخدموه كمضاد حيوي طبيعي و مضاد للبكتيريا[6-9]. كما ثبت استخدامه في التحنيط، ولعلهم اكتسبوا ذلك من ملاحظتهم تحنيط النحل لجثث الكائنات التي تدخل خليته ولا يستطيع إخراجها بعد قتلها. و كان أرسطو أول من كتب عن البروبوليس وأول من سماه "Propolis" و هي كلمة يونانية الأصل تتألف من مقطعين:

- **Pro :** تعني قبل
- **Polis :** المدينة ، وهو مدخل خلية النحل[2].

فالنحل البري يستعمل البروبوليس لإحكام مداخل خليته وسد الشقوق لمنع الحشرات، والهوام وكذلك الهواء البارد من دخول الخلية. وقبل حوالي ألف سنة تقريبا ناقش الرومانيان :ديوسكوريد (Dioscoride) – بليني (Pline) مصدر هذه المادة وكتبا في شأنها: تنزع الشوك وكل ما يدخل الجلد، تنقص من التورم، وتلين تصلب الجلد، تنقص ألآم العصبة وتداوي القروح والدمل [9].

وفي القرن الثاني جاء دور الطبيب (Gatien) ليتطرق إليها في أبحاثه وهذا قبل الفيلسوف والطبيب المسلم ابن سينا الذي كتب في صددها في القرن الحادي عشر: لديها قدرة على نزع حدود الأسهم والشوك بشكل فائق النظير[10،2]. و في بداية القرن الماضي زادت شعبية هذه المادة بشكل باهر قبل ان تكتشف المضادات الحيوية، وكان العلاج يتم بوضع مادة البروبوليس مباشرة على الجروح و التورمات.

وصمغ النحل يعتبر من أقوى المضادات الحيوية الطبيعية على الإطلاق لذلك زاد التركيز عليه في الآونة الأخيرة وقامت العديد من شركات الأدوية بتعليبه وتقديمه للمستهلكين

بسبب زيادة الطلب عليه لعلاج الأمراض المختلفة، خصوصا وانه يرفع من درجة مناعة الجسم ضد الإصابة بالعوامل الممرضة[11].

وقد استهوى البروبوليس فؤاد الباحثين بسبب اكتشاف خواصه المضادة للجراثيم، والمضادة للأكسدة، والمضادة للقروح، إضافة إلى فعاليته كمضاد للأورام السرطانية، حيث ان خلال الثلاثين سنة الأخيرة أجريت بحوثا تحليلية وصيدلية وطبية لهذه المادة في كل أصقاع العالم، و استطاعوا إن يحصروا الأهمية الكبرى للبر وبوليس في مركبات كيميائية متعددة الفينول [12] .

وقد نجح العلماء في تحديد التركيب الكيميائي لهذه الفينولات المتعددة (وهذا حسب مصادر جنيه) وعزل المواد الفعالة المسئولة عن نشاطه العلاجي[13].

I.3.2. مكوناته:

يعتبر البروبوليس مادة طبية ذات مصدر نباتي و بالتالي كانت مثلها مثل النباتات الطبية حيث خضعت لدراسات من قبل الكيميائين النباتيين و الصيادلة و البيولوجيين، و يعتمد تركيب البروبوليس على النباتات المحلية و الخصائص الجغرافية و المناخية للموقع، هذه الحقيقة تفسر التنوع الكبير لتركيبه و خاصة في المنطقة الاستوائية [14] .

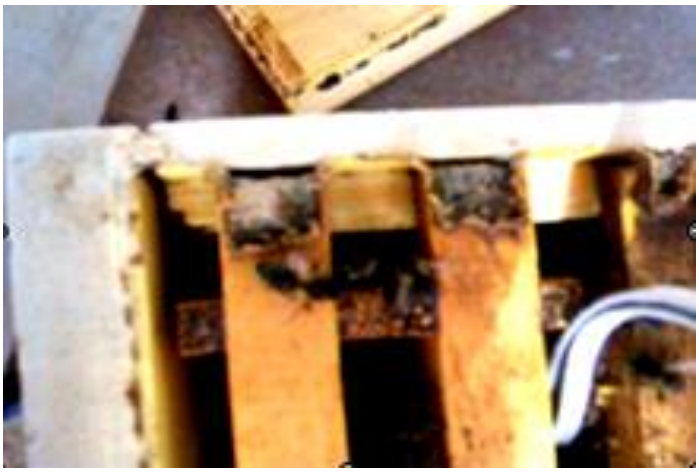
حيث يتكون البروبوليس من 55% مواد راتنجية و بلسم 30 % من الشمع، 10% زيوت عطرية، 5% حبوب اللقاح، ويحتوي على العديد من الفيتامينات منها فيتامين E،C، وأهمها فيتامين A، ويحتوي على المعادن الأربعة عشر المهمة للجسم البشري منها الكالسيوم والصوديوم والبوتاسيوم وغيرها، ويحتوي على أحماض امينية منها الثيامين، حمض النيكوتين وغيرها من الأحماض، والتركيب الكيميائي البروبوليس معقدا جدا، ولم تستطع التجارب المخبرية حتى الآن معرفته، كما انه يختلف من خلية إلى أخرى [11] .

الجدول (1.I) : خصائص العامة للبربوليس [23]

مادة عطرية%	57	58	18	82
الفينولات %	28	27.6	7.9	46
فلافون والفلافانول %	8	8.2	1.3	17.9
فلافانون وثنائي هيدروفلافانول %	6	6	1.5	15.2

I.4.2. دور البروبوليس في خلية النحل:

العكبر له دوراً أساسيا في الحفاظ على صحة وسلامة الخلية لأنه يعد مضاد بكتيري وفطري ومضاد حيوي، حيث أن خلية النحل تحتوي على عدد هائل من أفراد الطائفة، إضافة إلى إن درجة حرارتها 35 مْ، والرطوبة داخلها تصل إلى 90%، وهذه البيئة أفضل بيئة لتطور أنواع كثيرة من الجراثيم والفطريات والتعفنات، لكن جو الخلية يبقى إلى حد ما خالياً من هذه الجراثيم وهذا يرجع إلى دور العكبر في الحفاظ على صحة وسلامة الخلية [15] . حيث يستعمل النحل هذا العبر لتضييق مداخل خلاياه في فصل الشتاء، وكذلك في لصق الإطارات الخشبية الخاصة بخلية النحل، وفي تثبيت الأقراص الشمعية في سقوف جحوره التي يسكنها في الجبال أو في الأشجار.[2] و يتم وضعه من قبل الشغالات لتغطية و تلميع العيون السداسية قبل وضع البيض أو وضع العسل أو حبوب اللقاح أو غذاء الملكات للحفاظ و الحماية على العيون، كما إن صمغ العسل يوضع أيضا عندما يكتمل ملئ العيون السداسية بالعسل الناضج فيتم وضع صمغ النحل قبل طبقة الشمع التي يختم بها البرواز حتى يحمي العسل من الملوثات الميكروبية بالخلية [16]، بالاضافة إلى حماية الخلية من الابتلال بالماء.



الشكل (2.I): صورة لاستخدامات البروبوليس في تقوية أماكن ترابط الأقراص

ويستخدمه النحل أيضاً في تحنيط الحشرات والكائنات التي تغزو خلاياه مثل الفئران والوزغ والدبابير وغيرها، بعد أن يقتلها بوخزها بآلة اللسع، فيغطيها بطبقة من العكبر ليمنعها من التحلل، ثم بطبقة من الشمع الذي يفرزه حتى لا تفسد هذه الكائنات جو الخلية الشكل (2.I)

الشكل (3.I): صور لزواحف قتلها النحل وحنطها بواسطة البروبوليس [15]

5.2.I. جمع البروبوليس:

بعد أن تعثر شغالة نحل العسل الجامعة للبروبوليس على مصدر البروبوليس فإنها تقضم فيه فى الحال بواسطة فكوكها العليا وتحاول بمساعدة الزوج الأمامي للأرجل في تمزيق قطعة صغيرة منه وتقوم بعجن هذه القطعة بين فكوكها العليا وذلك بمساعدة واحدة من الأرجل الوسطى وبسرعة تقوم بنقل قطعة البروبوليس إلى سلة حبوب اللقاح التي على نفس الجانب، وهى تفعل ذلك أثناء وقوفها أو خلال الطيران،ويلى ذلك وضع قطعة أخر ى من البروبوليس في سلة حبوب اللقاح التي على الجانب الآخر، والبروبوليس المتجمع يتم كبسه بشكل متكرر بواسطة الرجل الوسطى لجعله فى قالب مناسب، وتستمر فى جمعها حتى تكتمل حمولة كل من سلتى حبوب اللقاح،ولتحصل النحلة على حمولة بروبوليس فإنها تعمل بنشاط فى وقت يتراوح من 15- 60 دقيقة.

وعند دخول النحلة للخلية وهى محملة بالبروبوليس فإنها تقوم بإفراغ حمولتها بمساعدة شغالات أخريات والتى تقوم بقضم البروبوليس ودفعه وتمزيقه إلى قطع صغيرة، وعندئذ تضغطه وتكبسه بقوة فى مكانه وعند تداول البروبوليس ووضعه فى مكانه فإن النحل الملامس قد يقوم بخلط شمع النحل مع البروبوليس بنسبة 40- 60 % شمع. وتتحرر النحلة من حمولتها من البروبوليس فى خلال ساعة أو عدة ساعات حيث يعتمد ذلك على استخدام البروبوليس فى الخلية، وعندما تتحرر من حمولتها فإنها تقوم بالسروح فى الحال بعمل حمولة أخر ى. ويتم جمع البروبوليس فى الأيام الدافئة فقط، والنحلة الجامعة للبروبوليس تظل ملتزمة بهذا العمل،

ولكن أعدادها قليلة فى كل طائفة، وفى وقت ندرة الرحيق فإن النحل الجامع للبروبوليس يتحول إلى نحل جامع للرحيق ثم يصبح مرة ثانية جامع للبروبوليس.

والنحل الجامع للبروبوليس عند إحضاره لحمولته داخل الخلية يؤدى رقصة لمحاولة تجنيد آخرين للقيام بذلك ولكن بعض النحل فقط يتبع النحلة الراقصة طواعية ولكنه غير مجند لذلك.[17]

I.6.2.الخواص الفيزيائية والكيميائية (الظاهرية):

البروبوليس يظهر على شكل مادة مواصفاتها ما يلي [18]:

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

I.7.2. طرق استخدام البروبليس:

أ- استخدام داخلي يتم تناوله عن طريق الفم بعد تقطيعه إلى قطع صغيرة أو بتناوله على هيئة محلول في الكحول الأثيلي.

ب- استخدام خارجي لتعقيم الجروح ومعالجة القروح والالتهابات الجلدية وللحروق ومعالجة الإصابة بالفطريات الجلدية، ويتم استخدامه على هيئة محلول مذاب في الكحول الطبي عيار 95 أو 96 ويذاب بالطريقة التالية : للحصول على محلول تركيزه 30% يقطع 30

جرام من العكبر إلى قطع صغيرة وينقع في كمية من الكحول الطبي حجمها 100 مل لمدة 4-5 أيام في مكان مظلم . بعد إنتهاء هذه الفترة يصفى هذا المحلول ويوضع في قارورة قاتمة اللون وتقفل بإحكام [17].

وبشكل عام فإن النحالون لا يرغبون فى مادة البروبوليس لما يلى:

- ✓ تلتصق بالأيدى والملابس فى الطقس الحار.
- ✓ تعتبر ملوث طبيعى لشمع النحل.
- ✓ عملية إزالتها من قطاعات العسل الشمعية لإعدادها للتسويق تأخذ وقت وجهد.
- ✓ تسبب صعوبة فى فصل البراويز عن بعضها.

I.8.2. فوائد البروبوليس:

يستخدم العكبر بنجاح لعلاج الجروح والغرغرينا. كما يعالج بعض الأمراض الفطرية وكمضاد للبكتريا ومانع للنزيف وقد جرب العكبر في المستشفيات الروسية وثبت انه عامل مطهر ويساعد في تكوين الانسجة واللحم الجديد. كما استخدم في مستشفيات بولندا لعلاج الجروح الملوثة بميكروب سيدوموناس. كما استعمل في علاج آلام المفاصل.

- ✓ له تأثير منبه لإفرازات الهرمونات الأنثوية.
- ✓ له تأثير مدر للبول.
- ✓ له تأثير في خفض ضغط الدم المرتفع.
- ✓ يساعد على زيادة إدرار العصارة الصفراوية.
- ✓ يساعد على علاج التسلخات الجلدية وعلاج الجروح والحروق.
- ✓ ووجد أيضا أن له تأثير على تثبيط نمو الخلايا السرطانية في قولون الجرذان (الفئران)والقضاء عليها ... حيث أن مادة صمغ النحل تساعد على تعزيز قدرات جهاز المناعة بشكل عام والخلايا الليمفاوية بشكل خاص وتحثها على إفراز العامل المضاد والذي يقضي على الخلايا المصابة بالسرطان [16].
- ✓ مضاد حيوي طبيعي واسع المجال لاحتوائه على جالانين، حامض كافيك.
- ✓ ذو قدرة فائقة على قتل كثير من انواع الفطريات و البكتيريا خاصة السبحية و العنقودية و بيوسيانس وكولاى و ميكروب التيفوس لاحتوائه على حمض فريوليك، حمض السينامك.
- ✓ مضاد للامراض الفطرية و الفيروسية لاحتوائه على فلافونات، فلافونيدات.
- ✓ يدخل في تركيب المطهرات بالعمليات الجراحية.

- ✓ يستخدم في علاج القرح و الجروح و القطوع و التسلخات و الحروق.
- ✓ مفيد لالتهابات المفاصل و الحمى الروماتيزمية.
- ✓ مقاومة بعض امراض الجلد كالسنط و يمنع تكون سرطان الجلد لوجود حمض الكافيك به.
- ✓ علاج امراض الفم و الاذن و الحنجرة و الانفلوانزا.
- ✓ علاج بعض امراض المعدة و قرحة الاثنى عشر و القولون و مقاوم لسرطان القولون (يوقف انتشاره) و يقي منه.
- ✓ ثبت أنه علاج ناجح للاورام الخبيثة و الجروح و الحروق.
- ✓ علاج ناجح لأمراض الغدة الدرقية.
- ✓ يعتبر البروبوليس مانع للنزيف و مطهر للفم و يقلل من انتشار الايدز[2] .
- ✓ يستخدم في علاج الاكزيما المزمنة.
- ✓ يساعد على تكوين الانسجة و سرعة التئام الجروح.
- ✓ علاج التاهبات الجهاز العضلي المفصلي.
- ✓ علاج الحروق الملوثة بميكروب سيدوموناس شديد المقاومة.
- ✓ قتل الخلايا السرطانية و وقف نشاطها لاحتوائه على فلافونات، حمض الكافيك، سيلرودان، ارتيبلين [2].

3.I. حبوب اللقاح:

الشكل (I.4) : حبوب اللقاح

I .1.3 تعريف:

تعد حبوب اللقاح أو (غبار الطلع) هي أهم مادة ينتجها النحل وهو عبارة عن لقاح الأزهار أو البودرة الموجودة في الزهور،هذه البودرة تعلق في الشعر الذي في جسم النحلة وكما يوجد في أرجل النحلة الخلفية جيوب تسمى (سلة اللقاح)، تقوم النحلة بتجمع بها هذا الأخير ثم يستخرج من الخلية، وتعد حبوب اللقاح التي يجمعها النحل المصدر الرئيسي لأهم المكونات الغذائية والعلاجية فيما حبوب اللقاح التي يجمعها النحل المصدر الرئيسي لأهم المكونات الغذائية والعلاجية فيما يخرج من بطون النحل وقد ثبت حديثا إن حبوب اللقاح التي يجمعها النحل كغذاء مركز الفيتامينات والأحماض الامينية والأملاح المعدنية ثم استعملت كعلاج لكثير من الأمراض[11].

2.3. I تركيب حبوب اللقاح:

لا يزال التركيب الكيميائي والبيولوجي لحبوب اللقاح قيد البحث والدراسة، ولكننا نستطيع أن نحدد علمياً محتويات حبوب اللقاح التي تجلبها النحلة إلى الخلية، و تختلف هذه المكونات باختلاف المصدر النباتي الذي تنتمي إليه الحبوب، لذلك تختلف ألوان حبوب اللقاح من زهرة لأخرى [11]، وتتركب حبوب اللقاح من المكونات الآتية:

الجدول (2.I): مكونات حبوب اللقاح [24،25].

الكربوهيدرات (فركتوز – جلوكوز– سكروز- ألياف)	55 -13
ألياف خام	20 - 0,3
بروتين	40 - 10
دهون	13-1

1- الماء:

بنسبة تتراوح بين 10- 12% وذلك بالنسبة للحبوب الطازج4% وذلك بالنسبة للمجففة (وتمثل 5%أقصى حد ممكن) وتجفف حبوب اللقاح بتطلب معدات متخصصة والتي يراعى إن تصل فيها درجة الحرارةالى40 درجة مئوية وهى الدرجة الموازية لحرارة الخلية، الموازية لحرارة الخلية، وذلك حفظاً على عدم إتلاف بعض المكونات الحيوية التي تتأثر بالحرارة [11].

2- السكريات: وتمثل 35%.

3- الدهون: وتمثل 5%.

4- البروتينات:

وتمثل 25% (مع وجود نسبة كبيرة من الأحماض الأمينية). ومما هو جدير بالذكر فإن حبوب اللقاح والغذاء الملكي هي من المواد الطبيعية الغنية بالأحماض الأمينية، وهذا ما يجعل لهما خواصاً علاجية مؤثرة سواء بطريقة مباشرة أو غير مباشرة [11].

5- الفيتامينات:

تحتوى حبوب اللقاح على الفيتامينات الآتية [24،25]:

الجدول(3.I): الفيتامينات في حبوب اللقاح

Ascorbic acid	56 -7
B-Carotin(provitamin A)	20 - 1
(vitamin E) Tocopherol	32 - 4
Niacin(B3)	11 -4
Pyridoxin(B6)	0.7 - 0.2
Thiamin(B1)	2 - 0.6
Riboflavin(B2)	2 - 0.5
Folic Acid	1- 0.3
Biotin(H)	0.07 - 0.05

5- المعادن:

تحتوى حبوب اللقاح على عدد كبير من المعادن الضرورية، ولكل معدن من هذه المعادن دور رئيسي وأساسى في التفاعلات العديدة والتي تدخل في عمليات الأيض الغذائي للخلية.ومن بين هذه المعادن: بوتاسيوم- صوديوم- كالسيوم- مغنزيوم - وفسفور - كبريت- كلور[11].

جدول (4.I) : المعادن في حبوب اللقاح [24،25]:

Potassium (k)	2000 – 400
Phosphor (P)	600 – 80
Calcium (Ca)	300 – 20
Magnesium(	300 – 20

Mg)	
Zink(Zn)	25 – 3
Manganese(Mn)	11 – 2
Iron(Fe)	17 – 1.1
Copper(Cu)	1.6 – 0.2
Selenium (Se)	0.005

7- الإنزيمات والخمائر:

تحتوي حبوب اللقاح علي عدد كبير من الإنزيمات والخمائر التي تستخدم كعوامل مساعدة في التفاعلات الكيماوية وخصوصاً الاميليز والانفرتاز و الفوسفاتيز [19].

8- بعض العناصر الأخرى:

مثل مادة الروتين التي تدخل في تركيب الشعيرات الدموية وتزيد من قوة التصاق خلاياها ببعضها البعض، وفى حالة نقص هذه المادة فان الثغرات الموجودة بين الخلايا تصبح واسعة مما يزيد ارتشاح السوائل منها، وهو ما يعرف بالارتشاح المائى (Odema) [11].

I .3.3 خصائص حبوب اللقاح:

الشكل (I.5): عملية جني حبوب اللقاح من ازهار النباتات [17]

✓ **السعرات الحرارية:**

تمنح حبوب اللقاح للجسم ما يعادل 270 من السعرات الحرارية لكل جرام من حبوب اللقاح (كمية تقريبية). تحمل حبوب اللقاح العديد من المواد الضرورية للحياة، وهى غنية بهذه المواد والتي تتركز وظائفها علي كثير من أجهزة الجسم ووظائفها الضرورية، مثل:

- **الجهاز الهضمي:** تعمل هذه المواد علي فتح الشهية مع حفظ الوزن [17].

- **الجهاز العصبي والنفسي:** تعمل هذه المواد علي تنظيم التفاعلات التي تحدث في هذا الجهاز مع العمل علي إحداث النشوة والمحافظة علي المزاج ويكون ذلك مصحوباً بزيادة في القدرة الذهنية[17].

✓ **التمثيل الغذائي:**

تعمل هذه المواد الموجودة في حبوب الطلع علي عمل عدة حركات تنظيمية في العديد من مستويات التمثيل الغذائي في مراحل مختلفة من العمر مثل فترة النمو، والمراهقة والشيخوخة... الخ [17].

I .4.3 تخزين النحل لحبوب اللقاح:

تدخل الشغالة إلى الخلية فتفرغ حملها في حجرات النخاريب (التجاويف السداسية لشمع العسل) المحضرة حول عش الحاضنة. بينما تتقدم فرقة متخصصة من نحل الداخل فتقوم برص هذه الكرات بإدخال رأسها في النخاريب في ضربات متتالية حتى تمتلئ وعندها تضع فوقها قليلا من العسل لتمنع الهواء من الوصول إليها وإفسادها. وهنا وبسبب غنى حبوب اللقاح والعسل بالخمائر فان تغيرات كيميائية هامة جدا تبدأ في التفاعل فيها بحيث يتحول جزء من السكر إلى حمض اللبن (أسيد اللكتيك) الذي يحمي حبوب الطلع من الفساد وبنهاية هذا التحول يصير الطلع ما نسميه خبز النحل الذي يختلف في مكوناته عن العسل والطلع. ومن هنا يمكننا التأكيد أن الملكة تتوقف عن وضع البيض فور نفاد خبز النحل من الخلية. وبالطبع تنتفي أيضا الحاجة لبناء الأساسات الشمعية. لهذا السبب ننصح النحالين بإعطاء نحلهم بديلا عن حبوب اللقاح كلما انفقدت هذه المادة من الخلايا[11].

I .5.3 طرق استخدام حبوب اللقاح:

تستخدم حبوب اللقاح لطرق عدة منها:

- أكلها طازجة مع مراعاة مضغها جيدا قبل بلعها بعد تحليل العسل .
- إضافة حبوب اللقاح على أي مشروب مثل اللبن أو الحلبة وشربه صباحا أو مساءا.
- إضافة حبوب اللقاح مع ماء ساخن وشربها.
- إضافتها على العسل والغذاء الملكي والبر وبوليس ويؤخذ من المخلوط ملعقة صباحا وأخرى مساءا وهذا أفضل. [11]

I .6.3 فوائد حبوب اللقاح:

لحبوب اللقاح القدرة على حل كثير من المشاكل و الاضطرابات المرضية وكذلك علاج كثير من الأمراض التي تم تشخيصها، بالإضافة إلى أن لها إمكانية المحافظة على الصحة الكاملة والعافية التامة بحيث:

✓ توفر للجسم بعض العناصر المفقودة.

- ✓ تساعد علي تنظيم بعض الوظائف العضوية التي قد تكون ناقصة أو أصابها الارتباك والاضطراب.
- ✓ تنبه وتقوى الطاقة الحية والحيوية بصفة عامة سواء من الناحية الطبيعية أو النفسية.
- ✓ مقوى ومنبه مع توفير النشوة.
- ✓ تحافظ علي التوازن الوظيفي بصفة منتظمة أو متناسقة.
- ✓ تقوم بدور مضاد للسموم عامة علي كافة أجهزة الجسم.
- ✓ تحسين القدرة على الإنجاب ومفيد جدا لحالات العقم عند النساء والقضاء على الإجهاد وإزالة جميع الأعراض أثناء فترة الدورة الشهرية.
- ✓ تقوية الكبد وحجز السميات ومنع ترسب الدهون بالكبد وحماية الكبد من التلف.
- ✓ منع التوتر العصبي وأمراض البروستاتا.
- ✓ يقوي أجسام الأطفال والشباب والكبار ويمدهم بالفيتامينات والإنزيمات والعناصر المعدنية الهامة.
- ✓ علاج البواسير وضعف الأوردة والشعيرات الدموية.
- ✓ إعادة بناء وتقوية جهاز المناعة . [11،20،21]

المراجع:

[1]. البرنامج التدريبي في مجال انتاج و استخدام منتجات النحل ،المركز القومي للبحوث 2003 ـ 2004، مصر .

[11]. عبد الباسط محمد السيد، موسوعة النحل، الطبع الأولى 2011، مصر.

[14]. ربيعي عبد الكريم،المساهمة في دراسة الفعالية المضادة للاكسدة للمستخلصات بروبوليس جنوب الجزائر بالطرق الكيميائية والكهروكيميائية ، مذكرة ماجستير، جامعة قاصدي مرباح ورقلة، 2007.

[15]. د.نزار حداد، م.عمر العدوان،العكبر (البروبوليس)،المركز الوطني للبحث والارشاد الزراعي مديرية بحوث النحل.

[19]. د.صبحي ابراهيم قاسم احمد ، النحلة طبيبتنا ، ايداع برقم 19815، (2004).

[20]. مجلة منتوجات النحل علمية فصلية تصدرها مدينة الملك عبد العزيز للعلوم والتقنية، السنة19،العدد 74 ،ماي 2005.

[21]. حسام ابوشعرة ،شمع النحل، مجلة النحلة السعودية،03-10-2011.

[22]. مجلة النحل،جامعة الملك سعود،العدد الثاني يوليو 2011 ص 35،16،6،5.

المراجع الاجنبية:

[2].Shakespeare, King Henry The Propolis Book,Muehlethurnen, Switzerland in May 2011.

[3].V.Bankova, S. L. D.Castro , M. C. Marcucci,. Apidologie, 31 (2000) 3–15.R. Farre, I. Frasquet, A. Sánchez,. Ars Pharmaceutica, 45 (2004) 21-43.

[4]. R. Farre, I. Frasquet, A. Sánchez,. Ars Pharmaceutica, 45 (2004) 21-43.

[5]. M. Tamas, J. Martinesku, F. Jonesku, Stud. Cercet. Biochim.22 (1979)207.

[6]. A. H.Banskota, , Y.Tezuka, , I. K.Adnyana, , E.Ishii, , K.Midorikawa, K.Matsushige, Phytomedicine 8 (2001)16–23.

[7]. M. C.Marcucci,. Apidologie 26(1995) 83–99.

[8]. S.Castaldo,F. Capasso, Propolis, an old remedy used in modern medicine. Fitoterapia, 73(2001)S1–S6.

[9]. N. Ohta, G. Ruvata, H. Akahon and T. Watanabe, Agr.Biol.Chem. 43 (1979) 1415.

[10]. D. Strack and J. Krause, J. Chromatogr.,156 (1978)359.

[12]. J. Fisher and T. Wheatan, J. Agr.Food Chem.,24 (1976) 898.

[13]. L. Wulf and C. Nagel, J. Chromatogr, 116 (1976) 271.

[16]. kenanaonline.net / users/ ragabalasuotie/ topics/ 80004, 23:45,*1 Mars 2013*.

[17]. *http://www.elnadabee.com/Beeproducts/Beeproducts.htm,10:05, 21Mars2013*.

[18] .S. Nikolov, E. Georgieva, V. Vasilev, S. Todorov and S. Drianska, in Proceedings of Bucharest, 1976, p. 235.

[23]. M .P.POPOVA,V . S.Bogdanov, chemical charactristics of poplar type propolise of different giographic origin , Apidologie,31,306,(2007)

[24]. CAMPOS, M. FIRGERIO, C. LOPES, J. BOGDANOV, S (2010) What is the future of Bee-Pollen. JAAS 2: 131- 144.

[25]. CAMPOS, MG. R. BOGDANOV, S. ALMEIDA-MURADIAN, L B. SZCZESNA,T. MANCEBO, Y. FRIGERIO, C. FERREIRA, F (2008) ,Pollen composition and standardisation of analytical methods, Journal of Apicultural Research 47 (2):154-161.

الفصل الثاني:

المركبات الفينولية والفعالية المضادة للأكسدة

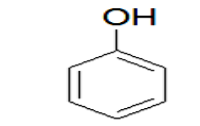
II المركبات الفينولية والفعالية المضادة للأكسدة:

1.II. تعريف المركبات الفينولية :

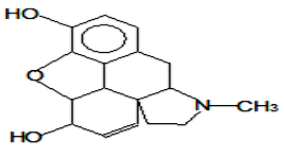
تشكل المركبات الفينولية المستخرجة من النباتات حيزا كبيرا في حقل المنتجات الطبيعية نظرا لكثرة عددها ولتباين هياكلها البنائية، الأمر الذي يستدعي دراستها اعتمادا على مراجع متخصصة على هيئة مجموعات وفقا لهذه الهياكل البنائية **[1]** .

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

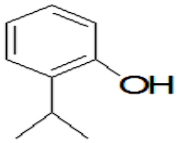
مشتق غير آزوتي حاوي على حلقة بنزين أو أكثر تحمل مجموعة هيدروكسل حرة أو مرتبطة بوظيفة أخرى، تكونت حلقاتها العطرية إما من حمض شيكيميك أو عديد الأسيتات**[2].**



Phynol simple



Morphine



Thymol

الشكل($_a$1.II):نموذجين لمركبين غير فينوليين الشكل($_b$1.II):نموذج لفينول بسيط

2.II. اقسام المركبات الفينولية:

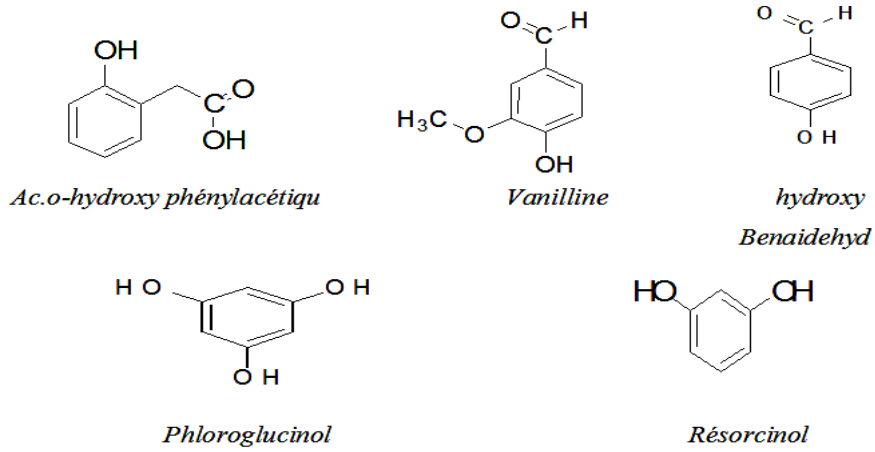
يمكن تقسيم المركبات الفينولية الطبيعية تبعا لتواجدها وتعقيداتها و حسب *Harborne* و *simmonds* (1964) إلى :

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

1.2.II. عائلة المركبات الفينولية قليلة الانتشار:

- **المركبات الفينولية من الشكل C_6 , C_6-C_1 , C_6-C_2:**

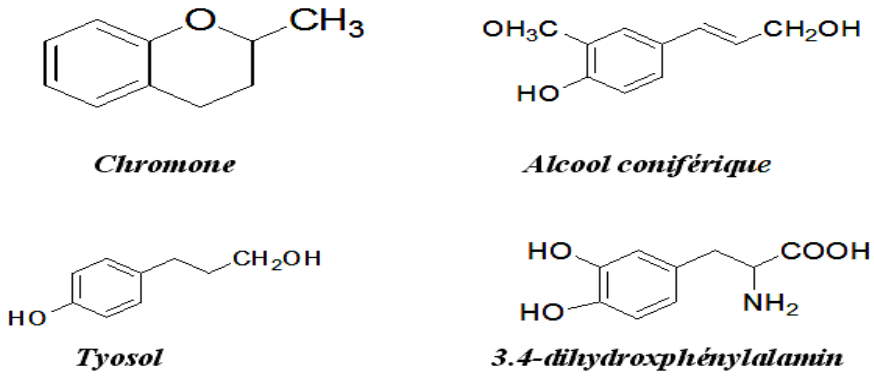
وهي مركبات ذات هياكل بسيطة قليلة الانتشار في الطبيعة الشكل **(2.II)**، وتعد في معظم الأحيان مكونات للزيوت الطيارة وهي في الغالب عبارة عن كجولات ،ألدهيدات ،كيتونات **[2]**.



الشكل: (2.II) المركبات الفينولية من الشكل C_6-C_2, C_6-C_1, C_6

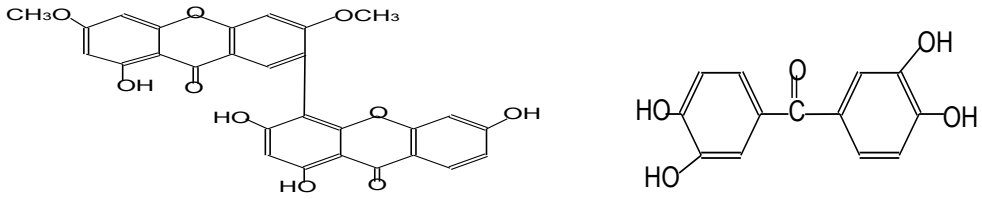
- **المركبات الفينولية من الشكل C_6-C_4 , C_6-C_3 :**

تعد أكثر تواجد من سابقاتها وأكثر أهمية وتعتبر كذلك زيوت طيارة **[2]**، بعض الهياكل موضحة في الشكل**(3.II)**.

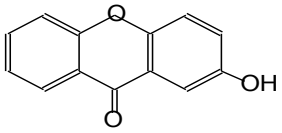


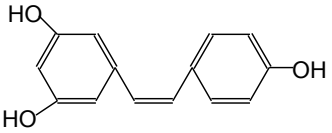
الشكل(3.II): نماذج للمركبات الفينولية من الشكل C_6-C_4 , C_6-C_3

- **المركبات االفينولية من الشكل : C_6-C_1-C_6 , C_6-C_2-C_6 ، ثنائي الفلافونيل :**



Genkgétine ***Maclurine***





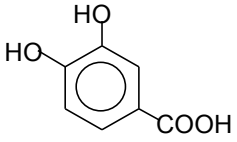
Resvératro ***l Euxanthono***

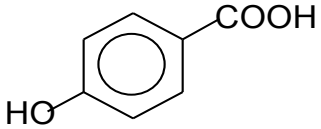
الشكل(4.II): بعض النماذج للفيونولات من الشكل: C_6-C_1-C_6 , C_6-C_2-C_6، ثنائي الفلافونيل.

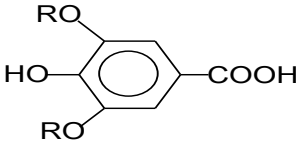
2.2.II.المركبات الفينولية واسعة الانتشار:

- **أحماض البنزويك و السينامیك:**

نوضح في الشكلين**(5.II)** **(6.II)** مختلف أقسام هذه المركبات حيث أن أحماض السينامیك الأربعة تتواجد في النباتات بحيث لا يخلو العنصر النباتي من إحداها على الأقل **[2]:**



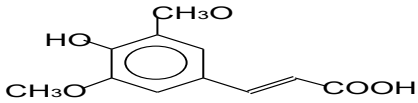


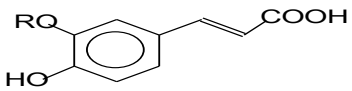


R=H Ac ***Ac-protocatéchique*** ***Ac -hydroxy .gallique***

R=CH_3 Ac .syringiqu

الشكل(5.II): نماذج لأحماض البنزويك





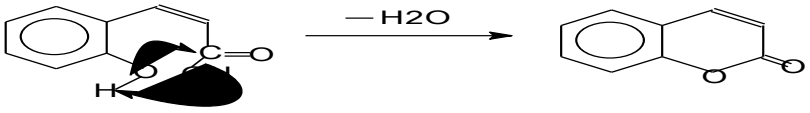
Ac.sinapique ***Ac.ferullque***

الشكل(6.II): أمثلة لأحماض السينامیك.

- **الكومارينات**:

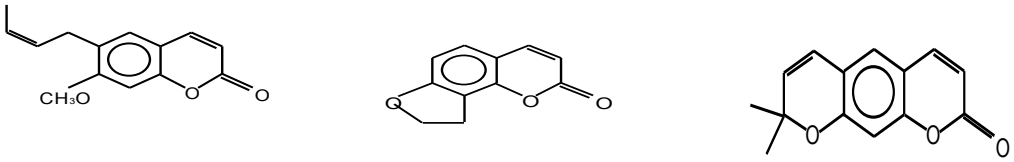
اشتقت هده التسمية من النبات الذي فصلت منه أول مرة و هو Dipterix odorata willd من قبل الباحث Vogel عام 1820، إذ تتشكل الكومارينات أساسا من العنصر ذي البنية C6-C3 إذ تمثل السلسلة من حلقة أوكسجينية غير متجانسة. ويمكن إلحاق الكومارينات بأحماض السينامیك إذ تتحلل هذه الأخيرة بسهولة عند احتوائها على هيدروكسيل في الموقع ortho لتعطي كومارينات.

تتشكل من حلقتين سداسيتين إحداهما عطرية والأخرى مغايرة شكلها العام ذو البنية C_6-C_3 **[5]** وشكلها العام وكيف تتكون موضح في الشكل ادناه:



Ac.o-hydroxy cinnamique ***Coumarine***

الشكل(7.II): تشكل الكومارينات

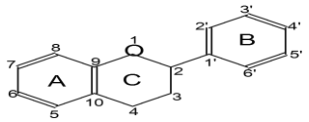


Subérosine ***Angelicine*** ***Xanthletine***

الشكل(8.II): شكل بعض الكومارينات

- **الفلافونويدات** :

تعريف: كلمة الفلافونويدات مشتقة من اللفظ اللاتيني (Flavous) التي تعني اللون الأصفر وهي عبارة عن صبغات ملونة تنتشر في معظم الأصناف النباتية (إلا أن وجودها قليل في الطحالب، السرخس) خاصة عند كاسيات البذور تتمركز بصفة خاصة في الجزء الهوائي من النبات على شكل مركبات ذات أساس سكري (وجود السكر في الجزيئة يكسبها القدرة على الإذابة في الماء) أو على شكل مركبات حرة في الفجوات والسيتوبلازما والأغشية الليفية، تم استخراج أكثر من 4000 فلافانويد طبيعي **[6،7،8]**:



الشكل(9.II): الهيكل الأساسي للفلافونويدات

خواص والفعالية البيولوجية للفلافونيدات: بما أن الفلافونويدات مركبات هيدروكسيلية فانها لابد ان تتصف بخواص وصفات الفينولات ، فهي مركبات ذات صفة حمضية ضعيفة ذوابة في القواعد القوية مثل هيدروكسيد الصوديوم وتتصف الفلافونيدات التي تحمل عددا كبيرا من مجموعات الهيدروكسيل الحرة او التي تحتوي على وحدات سكر بالصفة القطبية ، وعليه فهي ذوابة في المذيبات القطبية مثل الميثانول ،الايثانول وثنائي ميثيل سلفوكسيد والاسيتون والماء . ووجود بقية السكر في جزئ المركب يجعله اكثر ذوبانا في الماء اما الفلافونويدات الاقل قطبية مثل الايزوفلافونات وكذلك الفلافونات التي تحمل عددا من مجموعات الميثوكسيل فإنها تذوب في لكلوروفورم او الايثر [9].

تمتلك الفلافونويدات عدة خصائص فعالة ، من بينها الخصائص التالية:

- ✓ مضادات للاكسدة
- ✓ مضادات للالتهاب
- ✓ مضادات للفيروسات
- ✓ مضادات لتسمم الكبد
- ✓ مضادات للبكتيريا

II. 3. اهمية الفينولات و الفلافونيدات :

1.3.II. اهمية الفينولات: بالرغم مما تقدمه المركبات المستخلصة من النباتات من فوائد عظيمة للإنسان، فإن دورها للنبات نفسه لم يكن معروفا، فكثفت الأبحاث على زراعة الأنسجة النباتية داخليا(التجارب التي تحدث على النبات وهو يقوم بجميع وظائفه) وخارجيا (التجارب التي تتم داخل أنابيب الاختبار) أدت إلى معرفة الدور الفسيولوجي لمنتجات الأيض الثانوي[11]، فهي تؤمن العيش للنبات في ظروف حياته القاسية. يكمن دور الفينولات في مراقبة نمو تطور النباتات بطريقة مباشرة أو غير مباشرة وذلك بتشكيلها معقدات مع هرمون النمو وقد لوحظ أيضا أن الفينولات تلعب دورا في وقاية النباتات من الأمراض التي تسببها البكتيريا والفطريات فهي مبيدات للحشرات أو مضادات حيوية، فبعض النباتات تفرز مركبات فينولية على مستوى الأوراق والجذور كمواد سامة ضد نمو النباتات الطفيلية [12].

أ- في المجال الاقتصادي:

لها أهمية كبيرة في الصناعات الغذائية حيث تستعمل كمضادات للتأكسد ومثبطات للأنزيمات كما يتم استعمالها في صناعة مواد التجميل حيث تحمي البشرة الخارجية من الأشعة فوق البنفسجية [12،13].

ب- **في المجال الطبي:**

تملك خصائص علاجية متنوعة إذ تؤدي دورا كبيرا في ميدان الطب والصيدلة لما لها من تأثيرات على الكائنات الحية عامة[14]، وعلى الإنسان خاصة فهي تحمي الأوعية الدموية، مضادة للالتهابات منها مثبطة ومنها محفز للأنزيمات، مضادة للأورام .تحتوي الفينولات على المجموعات الهيدروكسيلية (OH) فكلما كثر وجودها في المركب زادت في نشاطه المضاد (المقاومة للأورام)، تعد مخالب (مفخخة) للجذور الحرة فهي تمنح الهيدروجين ليوقف عملية انتشار الجذور، تستعمل في علاج الأمراض الجلدية عامة والبهاق خاصة، توسع الحالب في حالات الحصى الموجود في الكلى، ونبين في الجدول **(1.II)** بعض المركبات الفينولية التي تستعمل لعلاج العديد من الأمراض :

الجدول (1.II) : بعض المركبات الفينولية المستعملة في الطب و الصيدلة [14]

المركب الفينولي	الأمراض المعالجة
• الكومارنات	• حماية الأوعية الدموية • مضاد للأمراض الجلدية (البهاق)
• الفلافونيدات	• مضاد للالتهاب • مضاد للسرطان • يخفض ارتفاع الدم • مدر للبول • مضاد للأكسدة • تمنع تخثر الدم
• التانينات المتراكمة و متحللة	• مضادات للأكسدة
• الأحماض الفينولية	• مضاد البكتيريا • مضاد للطحالب. • مضاد للأكسدة
• Proanthocyanidines	• تمتن العظام • مضاد للسرطان • مضاد للالتهابات

2.3.II. اهمية الفلافانويدات: الدراسات المكثفة في المجال الطبي أظهرت الفعاليات المختلفة منها ما هي مضادة للسرطان[15]. و مضادة للفيروسات، حيث تعمل على تقوية الجهاز المناعي وزيادة في النشاط المضاد للورم، هذه الميزات العلاجية أعطتها أهمية بالغة في الصناعة الصيدلانية و الجدول (2.II) يوضح بعض المركبات الفينولية المستعملة في الصناعة الدوائية.

عموما الفلافونويدات هي مركبات غير سامة و متقبلة لدى الإنسان، إن كمية 1غ من المركبات الفلافونيدية المختلطة كافية من الناحية الصيدلانية لتفي احتياجات الأنسجة من هذه المواد وعدم الوقوع في الأمراض [16].

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

اسم الفلافونيـــد	الأمراض المعـــالجة
Cirsiliol	ضد الإسهال ،مساعد للهضم
Nepitrine	ضد الالتهاب، ضد الروماتيزم
8-glycoside hypolatine	ضد الالتهاب، ضد القرحة
Dimethyl ether apigenine fesetine	مضاد للالتهاب
Khellin(dimethyloxy-methyl- furano-chromone)	ضد الحساسية
8-methoxycirsisilineol	ضد التشنج، نافع للمعدة
Baicaleine	مضاد للتعفن
Cirsimaritine	مضاد للحك
Nepetine , Eupatorine, Eupatiline , Jaceosidine, Hispidulin 5.7.4 trihydroxy-6- methoxy flavones	معالج للأمراض الخبيثة (السرطان)
3-Glucosidekaempferol *3-Rutinosidekaempferol*	معالج لأزمة البواسير معالج الاضطرابات العرقية القلبية
Morine	معالج شلل الأطفال الفيروسي
Quercetine	مضاد للملا ريا
Rutinoside-7-Hesperetin	معالج الأمراض العرقية النخاعية معالجة لارتفاع ضغط الدم
3-Rhamnosidekeampferol *3-Glucosidekaempferol*	فعال في التخدير

G-glycosideflavonoide	معالج لأمراض الكلى

4.II.الفعالية المضادة للاكسدة:

1.4.II.الجذور الحرة :

1.1.4.II.تعريف:

الجذور الحرة هي أصناف كيميائية ذرية أو جزيئية متعادلة أو مشحونة بشحنة سالبة أو موجبة، تحتوي في تركيبها الالكتروني على إلكترون منفرد (غير متزاوج) أو أكثر،ويكون معظمها شديد الفعالية (تتفاعل بسرعة) مع مركبات أخرى محاولة اقتناص ما ينقصها من الكترونات لتصل إلى الثبات الكيميائي ، تتولد هذه الأصناف خلال التفاعلات الكيميائية كمركبات وسيطية شديدة الفعالية وتنتهي بنهايتها ،وتتكون هذه الأصناف خاصة بالتفاعلات التسلسلية والتفاعلات المتعاقبة وبعض التفاعلات الأخرى مثل البلمرة والتفاعلات الضوئية وتلك المحثة بتسليط الأشعة الكهرومغناطيسية والدقائق الإشعاعية الأخرى[18].

الجذور الحرة أنواع منها تلك التي تحتوي على إلكترون منفرد واحد ومتعادلة الشحنة مثل ذرات الهيدروجين والنيتروجين والفلور والكلور والبروم واليود وجذور المثيل $(CH_3)^{\cdot}$والإيثيل $(C_2H_5)^{\cdot}$ والفينيل $(C_6H_5)^{\cdot}$ والهيدروكسيل $(OH)^{\cdot}$ والبيروكسيد $(HOO)^{\cdot}$ ومنها التي تحتوي على الكترونين منفردين أو أكثر (غير مزدوجة) ومتعادلة الشحنة مثل ذرة الأكسجين(:O:) وجذور $(NH)^{\cdot\cdot}$ وجذور الميثيلين $(CH_2)^{\cdot\cdot}$ حيث تدعى هذه الجذور بالجذور الثنائية(diradicals) وتكون هذه الجذور أشد فعالية وأقل عمرا من جذور النوع السابق، أما الجذور الحرة الموجبة والسالبة الشحنة فهي جذور شديدة الفعالية وذات أعمار قصيرة جدا [19].

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

2.1.4.II.أنواع الجذور الحرة حسب استقرارها :

تقسم الجذور الحرة بصورة عامة من حيث استقرارها الى نوعين:

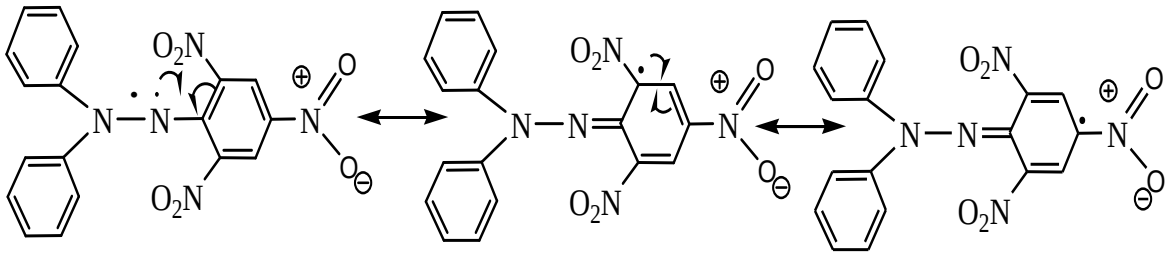
- **الجذور التي لها أعمار قصيرة جدا:**

أي غير مستقرة في الظروف الاعتيادية ،يشمل هذا النوع الجذور الحرة ذات العناصر مثل ذرا ت الهيدروجين والنيتروجين و الفلور و الكلور و البروم واليود والجذور التي لها وزن جزيئي صغير بصورة عامة مثل المثيل $(CH_3)^{\cdot}$ و الإيثيل $(C_2H_5)^{\cdot}$ و الفينيل $(C_6H_5)^{\cdot}$ و الهيدروكسيل $(OH)^{\cdot}$ ، يتراوح أعمار حياة هذه الجذور من رتبة الميكروثانية وأقل ،وتصل حتى البيكوثانية (10^{-12} ثانية) [19].

- **الجذور الحرة التي لها أعمار طويلة**:

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

ونستطيع القول بأن معظم الجذور الأروماتية التي تشتمل على تراكيب رنينية متعددة في تركيبها الجزيئي تكون مستقرة في أغلب الأحيان .ويعزى استقرار هذا النوع من الجذور لعدم تمركز الإلكترون المنفرد بموقع معين في تركيب الجذر،وخير مثال على هذه الحالة عدم تمركز الإلكترون المنفرد بجذر (DPPH) [19] شكل (10.II).



شكل (10.II): يوضح التراكيب الرنينية في جزيء DPPH

3.1.4.II.فعالية الجذور الحرة:

معظم الجذور الحرة على درجة عالية من الفعالية وعادة لا يمكن فصلها، وفي بعض الأحيان لابد من استخدام طرق غير مباشرة للكشف عن أحد الجذور،وطاقات التنشيط بين جذرين حرين ضئيلة للغاية تقرب من الصفر غالبا و مع ذلك فالمعدل الحقيقي للتفاعل يعتمد على سرعة تقابل الوحدتين مع بعضهما البعض.ومثل هذه التفاعلات توصف بأنها محكومة بالانتشار وتنطوي خطوة الإيقاف في كثير من التفاعلات المتسلسلة على هذا الطراز من الاتحاد بين الجذور السريعة [18،19].

4.1.4.II.متابعة حركية الجذور الحرة:

إن الجذور الحرة إما أن تكون ذات أعمار طويلة أو قصيرة، القصيرة منها لا يمكن متابعة حركية تفاعلاتها إلا بالطرق الطيفية السريعة مثل أطياف الكتلة وأطياف الرنين النووي المغناطيسي، أما الجذور المستقرة نسبيا فيمكن متابعة حركية تفاعلاتها بالطرق التقليدية مثل قياس التغير بالتوصيلة الكهربائية بدلالة الزمن، أو التغير بالتركيز المولاري بدلالة الزمن، أو التغير بحجم الغاز عن طريق التسحيح بالحامض أو القاعدة ولكن أدق هذه الطرق هي قياس

تغير كثافة الضوء الممتص بدلالة الزمن بواسطة أجهزة قياس أطياف الأشعة فوق البنفسجية – المرئية (UV-V) شرط أن يمتص الجذر الحر الضوء بمنطقة تختلف عن منطقة امتصاص المادة الناتجة فمثلا يمتص الجذر ثلاثي فينيل المثيل ($Ph_3\dot{C}$) الضوء عند 345nm وعند 510nm بينما يمتص ثلاثي فينيل ميثان (Ph_3CH) الضوء عند 262nm فقط [19].

5.1.4.II.تفاعلات الأكسدة في النظام البيولوجي:

بلا شك تعتبر التفاعلات الجذرية المساهم الأول في نمو الإنسان والحفاظ عليه[18]، وهذا لما تقوم به هذه التفاعلات من أدوار مهمة في العملية البيولوجية [21] حيث أن الخلايا تحتوي على الجذور الحرة لاسيما في مرحلة التصنيع الحيوي للمركبات الفعالة أو في عمليات الهدم العادية للمركبات الفعالة (bioactive) [18] .

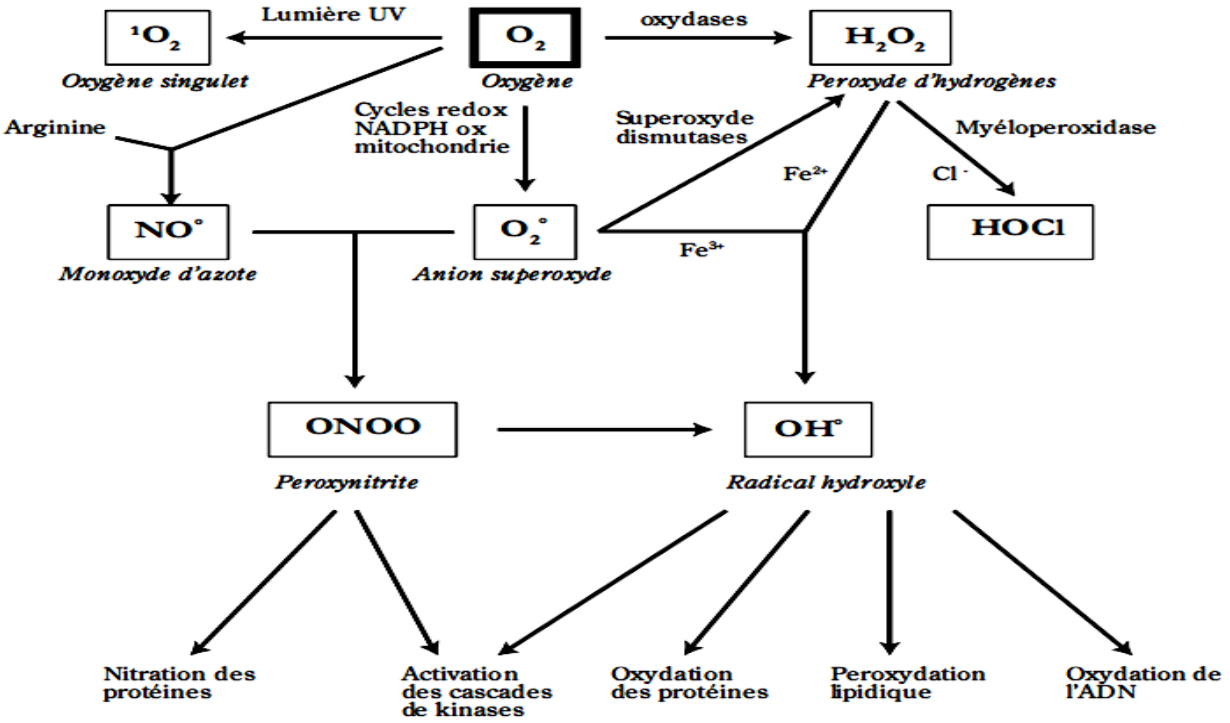
الأكسجين هو العنصر الأساسي للخلايا التي تتم فيها عملية الإحراق وهي عبارة عن تفاعل بين مركب عضوي و أكسجين الهواء، وأهم نواتج هذا التفاعل هي الطاقة التي تدخل في تصنيع العديد من المركبات منها المواد الخلوية، بالإضافة إلى القيام بنشاطات وظيفية معقدة مثل الحركة، النمو، الافرازات والامتصاص[18].

لكن إذا تمت هذه التفاعلات بطريقة عشوائية وغير مسيطر عليها فإنها تتسبب في تمزيق أغشية البلازما للخلايا وتغيير وظائفها، كما قد تؤدي إلى طفرات جينية وربما إلى موت الخلايا. كما تؤدي الجذور الحرة إلى إتلاف الأغشية الحيوية الأخرى كأغشية الميتوكوندريا، وتؤثر على الدهون غير المشبعة كالدهون الفوسفاتية وتؤدي إلى تصلب الأغشية، ونقص نشاط الارتباط الإنزيمي بها كنقص نشاط مضخات الصوديوم (Sodium Pumps) . كما تؤثر الجذور الحرة كذلك على نشاط المستقبلات الغشائية وعلى نفاذية الأغشية أو ربما تؤدي إلى السرطان من خلال تدميرها (ADN)، أو إلى أمراض أخرى كأمراض القلب والتهاب المفاصل. ويعزي كثير من العلماء الشيخوخة وأمراض ضمور الخلايا إلى نشاط الجذور الحرة، من بين الأنواع الجذرية القابلة للتصنيع في الخلايا نميز مجموعة من المكونات والتي تلعب دورا خاصا في علم الخلايا والتي تدعى بالجذور الأولية مع مكونات بيوكيميائية في الخلية [18].

مثلا:

سلاسل نقل الإلكترود بروكسيد (Electrode peroxide) ونظام السيتوكروم (cytochrome) هذه الجذور تكون مسؤولة عن فساد (ADN) للخلايا المسنة، والتي هي أساس منشأ بعض الأمراض الشكل (11.II) مثل: السرطان، مرض الشلل الاهتزازي، مرض التصلب العضلي[22].

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



الشكل (11.II): رسم تخطيطي يوضح مصدر مختلف الجذور الحرة المؤكسدة وأنماط تفاعلات الأكسجين المطبقة بيولوجيا [23]

2.4.II. مضادات الأكسدة:

1.2.4.II. تعريف:

هي مجموعة من العناصر والمركبات الموجودة بصورة طبيعية في معظم الخضروات والفاكهة ومعظم الأعشاب الطبية، والمواد ذات المصدر الطبيعي حيث جرى التعرف على تركيب وآلية عمل عدد قليل منها [18]، وتعمل مضادات الأكسدة بالدرجة الأولى كمانحات للهيدروجين أو مستقبلات للجذور الحرة وعليه فإن الدور الأساسي لمضادات الأكسدة هو كسر تفاعل السلسلة للأكسدة الذاتية و ذلك بالتفاعل مع جذور الهيدروبيروكسيدات، ويمكن تقسيم مضادات الأكسدة الى قسمين: طبيعية ومصنعة[18،19].

2.2.4.II. تصنيف مضادات الأكسدة:

- **مضادات الأكسدة الطبيعية:**

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

أ- البيتاكاروتين: هي واحدة من حوالي 400 من الكاروتينات وهي عبارة عن صبغة صفراء أو حمراء طبيعية توجد في بعض الأطعمة النباتية، وتتحول داخل جسم الإنسان إلى فيتامين A ويعتمد الامتصاص على كمية الفيتامين التي يحتاجها الجسم والباقي يخزن بصورة بيتاكاروتين في الكبد وأنسجة الجسم الدهنية المختلفة.ومن أهم مصادره النباتية الجزر والبطاطا الحلوة والخضروات الداكنة والفواكه الصفراء والبرتقالية مثل المشمش والمانجو[24].

أ- **فيتامين(C):** يساعد هذا الفيتامين على امتصاص الحديد الضروري لتكوين كريات الدم الحمراء ويدخل ضمن تكوين بعض الأنزيمات ويعتبر عامل مساعد لحفظ الخلايا ويساعد في الوقاية من الأمراض ومن أهم مصادره الحمضيات والخضروات الطازجة[24].

ب- **الزنــك (Zn):** من العناصر المعدنية الضرورية لجسم الإنسان ويدخل الزنك في تركيب كثير من الإنزيمات الضرورية للتمثيل الغذائي للبروتينات والكربوهيدرات والدهون وهو يدخل ضمن مركبات وجدار خلايا الجسم، كما أن نقص الزنك ضمن الطعام المتناول يؤدي الى قصور في النمو[24].

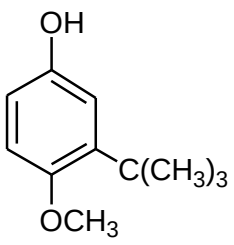
ت- **السيلنيوم (Sn):** يعتبر من العناصر المعدنية التي يحتاج إليها جسم الإنسان بكميات ضئيلة، ومن أهم فوائده المعروفة حتى الآن أنه يدخل في تركيب أنزيم Glutathione peroxydase وفائدة هذا الأنزيم أنه مع فيتامين (E) يكونان مضادات أكسدة دفاعية تقلل من الإصابة من الأمراض كالسرطان وتقلل فعالية المواد السامة والضارة في الجسم[24].

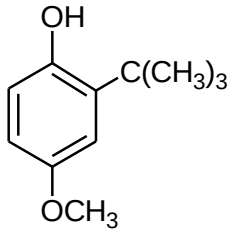
وتمتلك مضادات الأكسدة الطبيعية خواص مضاد أكسدة ضعيف نسبيا.وكنتيجة لذلك، تم استنباط مضادات أكسدة اصطناعية لاستعمالها في الأغذية[25].

- **مضادات الأكسدة الاصطناعية:**

1) BHA : (Buthyl hydroxyl anizole) لا يوجد هذا المركب في الطبيعة ولكنه يصنع بطريقة Butylation للمركب parамethoxyphenol ، ولـ BHA صيغتين ،ولكليهما رائحة الفينول ويذوبان بشكل جيد في الدهون ومن أهم خواص هذين المركبين هو قدرتهما على المحافظة على قابليتهما كمواد مضادة للأكسدة في الغذاء أثناء التسخين كالقلي مثلا[26]، وفي بعض الدول يسمح بإضافته بتركيز لا يزيد عن 200 ppm [18]

وله الصيغ التالية:

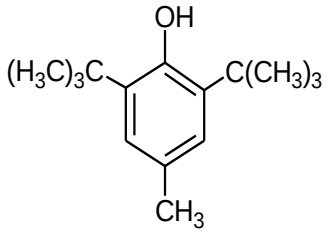




3-tert-butyl- 4-methoxyphen 2-tert-butyl- 4-methoxyphenol

شكل (12.II) : يوضح بنيةBHA

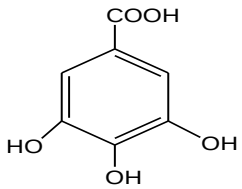
2) BHT : يعتبر مركب BHT من مضادات الأكسدة التي (Buthyl hydroxy toluéne) تصنع تجاريا لاستعماله في المنتجات البترولية والمطاط واستعمل بعد ذلك في منتجات الأغذية، المركب النقي ذو لون أبيض وهو مادة متبلورة عديم الرائحة، لا يذوب في الماء لكنه يذوب في المذيبات العضوية والدهون[26].في بعض الدول يسمح بإضافته بتركيز لا يزيد عن 200 ppmللاغذية [27] وفيما يلي صيغته:



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

شكل (13.II): يوضح بنيةBHT

3)حمض الغاليك Ac.gallique والغالات Gallates: يذوب حمض الغاليك في الماء ولكنه قليل الذوبان في الزيوت



3,4,5-trihydroxy benzoic acid

شكل (14.II): يوضح بنية لـ(GA)

ولأجل السماح باستعمال هذه المواد في الأغذية، يجب أن تكون ذات درجة سمية ضعيفة وأن تكون فعالة بتراكيز منخفضة [25].

آلية عمل المواد المضادة للأكسدة [18]:

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

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

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

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

- **تكوين معقد:**

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

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

حيث AH_2 : مركب مضاد للاكسدة.

3.2.4.II.مصادر مضادات الأكسدة:

لا شك أن جميع الأغذية النباتية من خضروات وثمار وفاكهة ومعظم الأعشاب الطبية تحتوي على نوع أو أكثر من مضادات الأكسدة، ولكن بكميات متفاوتة وقد يقوم مضاد أكسدة معين بعدة وظائف، وقد تشترك عدة مضادات أكسدة أخرى بمهمة واحدة.ولا يخفى على أحد أن كل شعب عرف بفطرته تارة، وبخبرته تارة أخرى عددا من الأغذية التي تتميز بقدرتها على تقوية الجسم وحفظ الشباب ومداواة الأمراض، فعلى سبيل المثال استعمل الناس زيت الزيتون لمعالجة التسمم الناتج عن تناول الأغذية الفاسدة أو الناتج عن عضة الأفعى.واكتشفوا قدرة الرمان والزبيب على منح الجسم القوة والحيوية وإكساب الوجه نضارة وجمالا، وهناك قائمة طويلة من الأطعمة التي عرفها الناس منذ القدم واكتشفوا قيمتها واستعمالاتها الطبية[18].

4.2.4.II.الحالات المرضية ذات العلاقة بالمواد المؤكسدة:

عندما يزيد تعرض دفاعات الجسم إلى العوامل المؤكسدة وتصبح غير قادرة على معادلتها يطلق على هذه الحالة الإجهاد التأكسدي ، وهي عبارة عن حالة من عدم التوازن بين العوامل المحثة للتأكسد (العوامل المؤكسدة) والعوامل المضادة للأكسدة انظر الجدول (9.II). وفي الحالة الطبيعية ، تكون العوامل المؤكسدة مثبطة بتأثير الدفاعات ضد الأكسدة ، أما في حالة إنتاج المواد المؤكسدة أو النقص في النظام الدفاعي فيمكن أن يختل هذا الاتزان ، مسبباً إجهاداً تأكسدياً و هذا ما يؤدي الى ظهور أمراض عديدة مثل أمراض القلب والأوعية الدموية والسرطان والشيخوخة وغيرها[23].

الجدول (3.II) : بعض مصادر العوامل المؤكسدة و العوامل المضادة للأكسدة

العوامل المؤكسدة	العوامل المضادة للاكسدة

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

5.II. طرق تقدير اجمالي فعالية المواد المضادة للأكسدة :

الفعالية المضادة للأكسدة (TAC) هي اختبار تقدير العلاقة بين مضادات الأكسدة الغذائية والأمراض الناجمة عن الأكسدة ،هذا ما أكدته البيانات التي تم الحصول عليها من الدراسة الحديثة [34]، وقد وضعت في الآونة الأخيرة العديد من الطرق التحليلية لقياس قدرة مضادات الأكسدة الكلية من المواد الغذائية والمشروبات ،هذه الطرق تختلف في آلية توليد مختلف انواع الجذور و الجزيئات المستهدفة وهي الطرق التي يتم بها قياس المنتجات المدروسة [32،33،35،36].

هناك العديد من الطرق التحليلية المختلفة [37] لتقييم القدرة المضادة للأكسدة سنذكر اهمها فيما يلي:

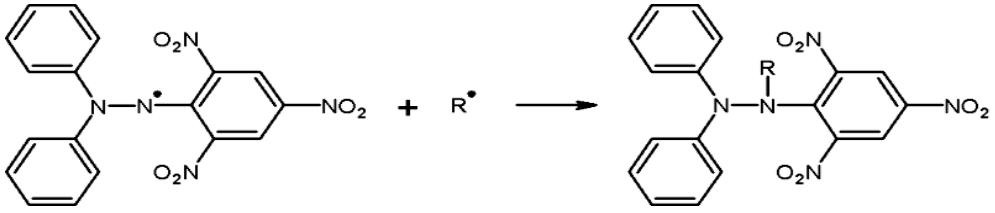
1.5.II.التقنيات الطيفية La spectrométrie:

ان التقنيات الطيفية تعتمد على التفاعلات الجذرية ، تفاعل الجذر مع الكاتيون ،أو المعقدات مع جزيء مضادات الأكسدة ، التي لها القدرة على منح ذرة هيدروجين[37، 38] ومن اهمها :

1. اختبار *DPPH* :

هو اختبار مضاد للجذور الحرة و قد سبق تعريفه قبل 50 سنة ماضية من طرف العالم "بولواز" سنة 1958 ولقد إعتمد في ذلك على توضيح بعض الحسابات الخاصة بمضادات الأكسدة**[30].**

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



الشكل (15.I): معادلة تثبيط جذر DPPH في وجود مضادات الجذور

هذا الاختبار يعتمد على تثبيط الجذور الحرة حيث يترك 30 دقيقة مباشرة مع المستخلصات المضادة للجذور، مع العلم أن الجذر (DPPH) مستقر نسبيا يتفاعل مع جزيئة مضادة للجذور ليتحول إلى (DPPH-H) مع نقصان الامتصاصية عند طول الموجة الأعظمية $\lambda_{max} = 517nm$ [44].

إن قدرة مضادات الجذور الحرة تحدد بعبارة كمية حسابية بدلالة تركيز المحلول لتثبيط 50% من الجذور الحرة ، النتيجة نعبر عنها ب IC_{50} و هي معرفة بتركيز المحلول بوحدة (g/l) بالنسبة للمستخلصات الخام أوبـ (mM) للمركبات النقية معلومة الكتلة المولية لتثبيط 50% من جذور (DPPH)، و تحسب انطلاقا من منحنيات التغير في نسب التثبيط المئوي% بدلالة تركيز المحلول، كلما كانت قيمة IC_{50} صغيرة كانت فعالية المضادات الجذرية كبيرة[32،33].

هذا الاختبار مستعمل بكثرة نظرا للخصائص التي يتميز بها: سريعة، سهلة، غير مكلفة [44] كما استخدم هذا الجذر بصورة شائعة كمادة كاسحة للجذور، يتحد جذر (DPPH) على الفور مع جميع أنواع الجذور الحرة أو مضادات الجذور الحرة مكونا نواتج أخف لونا بكثير من لون الجذر لمتابعة حركية هذا التفاعل نستعمل جهاز (UV-Vis).

في اختبار(DPPH) نلاحظ تغيرات مختلفة لمضادات الأكسدة تبعا لطبيعتها، من بينها الحركية السريعة، المتوسطة أو البطيئة وفقا للزمن اللازم للوصول إلى نتيجة، و قدرة مضاد الجذور تحسب انطلاقا من نسبة (DPPH) المتبقية في نهاية الوقت المحدد للتفاعل [44].

2. اختبار *ABTS*:

يتم تشكيل الكاتيون الجذري ($ABTS^{\bullet +}$) الذي يمتص عند *743nm* (إعطاء لون أخضر مزرق) لفقدان الإلكترون من ذرة النيتروجين لـ ABTS .

ABTS *(2,2'-azino-bis (3- ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid))* في وجود *Trolox* (أو مضادات أخرى للأكسدة قادرة على منح الهيدروجين) ، ذرة النيتروجين تخمد ذرة الهيدروجين ،مما يعمل على اختفاء اللون في المحلول [40].

يمكن أكسدة ABTS بواسطة فوق سولفات البوتاسيوم (*potassium persulphate*) [28، 39] ،أو ثاني أكسيد المنغنيز [41] ، لتشكل الكاتيون الجذري ($ABTS^{\bullet+}$) الذي يمتص عند 743*nm* التي تم رصدها في وجود *Trolox* [28،41،42] ،الذي تم اختياره كمرجع قياسي. تم تطبيق الطريقة الطيفية بالاعتماد على تناقص في الامتصاصية من ABTS الكاتيون الجذري لتحديد محتوى المواد المضادة للأكسدة في خلاصة الفواكه الجافة [39]، والفواكه الطازجة و المستخلصات النباتية والمشروبات ، والشاي والقهوة [28].

3. اختبار *FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)*:

FRAP طريقة تعتمد على تخفيض المواد المضادة للأكسدة ، بالمعقد الحديدي أيون TPTZ

(2,4,6-tri(2-pyridyl)- 1,3,5-triazine) حيث يمتص Fe^{2+} فيتشكل اللون الأزرق البحري الشديد ، يمكن قياس الامتصاصية لاختبار كمية الحديد التي انخفضت ويمكن ربطها مع كمية من المواد المضادة للأكسدة [28،39،42]، واستخدم الترولكس [28] *Trolox* أو حمض الاسكوربيك [39] كمركبات قياسية .

4. طريقة *HORAC* (*Oxygen Radical Absorption Capacity*):

هذه التقنية تعتمد على قياس فعالية المواد المضادة للأكسدة من معدن مخلبي ،وتستخدم هذه الطريقة معقد Co(II) لتقيم قدرة الحماية ضد تشكيل جذر الهيدروكسيل ،يضاف خليط فينتون (Co(II) +H_2O_2) لتوليد جذور الهيدروكسيل ثم يقاس الضوء الأولي، بعد ذلك تأخذ القراءات كل دقيقة بعد الاهتزاز ، ويستخدم محلول حمض الغاليك لرسم المنحنى القياسي[20، 66] .

5. طريقة *TRAP* (*Total Peroxyl Radical trapping Antioxidant*) :

تم استخدام (CL) (*luminol-enhanced chemiluminescence*) لتتبع التفاعلات التي تشتمل على بيروكسيل جذري ، CL يعمل الى إنتاج جذور *luminal* المستمدة من التحلل الحراري

لـ*AAPH (2,2'-azobis-2-amidino-propane)* ،و يتم تحديد قيمة *TRAP* من خلال تحديد الفترة الزمنية التي تخمد فيها العينة وذلك بسبب وجود المواد المضادة للأكسدة[43، 67].

6. طريقة تثبيط بيروكسيد الدهون (*The lipid peroxidation inhibition*):

ان طريقة تثبيط دهن بيروكسيد تعتمد على نظام فينتون *($Co(II) + H_2O_2$)* ،و إنتاج دهن بيروكسيد (مثل الأحماض الدهنية).

يعتبر حمض *α-linolenic* كنموذج للمادة الخاضعة للأكسدة ،حيث يخلط مع العينة المراد تحليلها ،و مزيج فينتون ،للحصول على بيروكسيد الدهون ،بعد نهاية الحماية ،يتم قياس تركيز المواد الحمضية المتفاعلة *(TBARS)* ، وتقارن بفهرس بيروكسيد الدهون [45،43].

7. طريقة *PFRAP* (*Potassium Ferricyanide Reducing Power*):

ترتبط زيادة الامتصاصية بنقصان فعالية المواد المضادة للأكسدة ،تتفاعل هذه المركبات بواسطة القدرة المضادة للأكسدة مع فيري سيانيد البوتاسيوم ، لتشكيل البوتاسيوم فيروسيانيد ،هذا الأخير يتفاعل مع ثلاثي كلوريد الحديديك ،فيتشكل حديديك فيروسيانيد ،وهو معقد ازرق اللون ،مع ظهور امتصاصية كحد أقصى في *nm* 700 [47،46] .

8. طريقة *CUPRAC* (*Cupric Reducing Antioxidant Power*) :

يتم خلط قياسي المواد المضادة للأكسدة المستخلص مع $CuSO_4$ و*neocuproine* بعد *30mn* ، يتم قياس الامتصاصية عند طول موجي *450nm* ،اثناء عملية التحليل يتم اختزال النحاس Cu(II) الى Cu(I) بواسطة فعل *electrondonating* (المواد المضادة للأكسدة) ، يتم التعبير عن النتائج بـ (*mg*) من *Trolox* للتر الواحد من المستخلص [48،47].

II.2.5. الكروماتوغرافي *chromatography* :

طبقت في الكثير من الدراسات في فصل المواد المضادة للأكسدة ،و تقديراجمالي الفعالية المضادة للأكسدة بالإعتماد على تقنيات طيفية او كهروكيميائية.

1. الكروماتوغرافيا الغازية *Gas chromatography*:

الكروماتوغرافيا الغازية (GC) هي نوع شائع من الكروماتوغرافيا تستخدم لفصل وتحليل المركبات التي يمكن أن تتبخر دون التحلل ،يتم تطبيق عملية فصل المركبات في خليط ما بين الطور الثابت السائل و الطور المتحرك الغاز ،الطور المتحرك عادة يكون عبارة عن غاز خامل مثل الهيليوم أو غاز لا يتفاعل مثل النيتروجين ،و الطور الثابت عبارة عن طبقة مجهرية من البوليمير السائل توضع على حامل متين (معدن خامل) ،تحديد توزع المادة بين الطور المتحرك و الطور الثابت و زمن احتباسها في هذا الاخير هو ما يعطي GC فائدتها التحليلية ،وتعتمد على استخدام العديد من الكواشف و الأكثر شيوعا هو كاشف تأين اللهب (*FID*).

2. الكروماتوغرافيا السائلة ذات الكفاءة العالية *High Performance Liquid Chromatography*:

تستخدم لطريقة الكروماتوغرافيا السائلة ذات الكفاءة العالية (*HPLC*) عادة أنواع مختلفة من الاطوار الثابتة ،ومضخة تمرر الطور المتحرك ويتم تحليل المركب عبر العمود ، تم تطبيقها كطريقة لتحديد مكونات مضادات الأكسدة [52] ،بعد الفصل بين عينات المركب على عمود HPLC ، توجه الى الكاشف PDA (*photodiode array*) ومن ثم يخلط مع محلول الكاتيون الجذري ($ABTS^{\bullet +}$) ويتم الكشف بالأشعة فوق البنفسجية عند الامتصاصية $720nm$.

محلول الكاتيون ABTS له لون أزرق ، وإخماد أي نتائج جذرية له تظهر في نقصان اللون الازرق وتظهر في نقص القمة المتحصل عليها من HPLC ،و من تحديد قيم القمم نحدد الفعالية المضادات للأكسدة الكلية ،ويعتمد الترولوكس (*Trolox*) كمركب قياسي [52] .

- **مزايا و عيوب طرق التحليل:**

من المزايا و أوجه الاختلاف في طرق تقدير الفعالية المضادة للأكسدة التي حددت في مختبرات التحليل [58،57]، حيث يتم اختيار هذه الطرق حسب وصفها لطبيعة ووظيفة العينة.

- التقنيات الطيفية بسيطة وسريعة وتحتاج فقط لجهاز الاشعة فوق البنفسجية (*UV-Vis*) لتقدير الفعالية المضادة للأكسدة ،و مع ذلك فإنه يصعب اخذ كل قيم القياس في الحساب في بعض طرقها ،ولا يمكن فحص بعض المركبات المتواجدة في مضادات الأكسدة مثل الثيولات في طريقة (*FRAP*) كما ان قياسها سريع جدا (6-4*mn*) بينما تحتاج بعض المركبات مثل الفينولات لمدة اطول ليتم التفاعل (30*mn*) ،ومنها التي تحتاج الى(60*mn*) ،وبعضها لديه حساسية لدرجة الحرارة و بالتالي التحكم في درجة الحرارة أمر ضروري ، اذن تعتبر هذه الطريقة بسيطة فيما يتعلق ببساطة ادوات تحليلها إلا انها تفتقد للدقة والاختلاف في نتائجها .

بينما طرق الكرماتوغرافيا تعتبر تحاليلها غاية في الدقة إلا ان تركيب اجهزة تحليلها معقد للغاية ،ومنها الذي لا يقدر فعالية كل المركبات حيث أن الكرماتوغرافيا الغازية (GC) لا تحلل إلا المركبات القابلة للتطاير ،و لكل مركب طور ثابت و متحرك خاص به ، ومنه نجد صعوبة في اختيار الاطوار .

ظهرت طرق اخرى حديثة حساسة ، ومجالات حدود الكشف فيها ضعيفة و تتطلب كميات ضئيلة من المواد مما يخفف من آثارها الخطرة ،وقد ساهمت سهولة تطبيقاتها وما تميزت به من الدقة و المصداقية و انخفاض أسعار تجهيزاتها في انتشارها وسعة تطبيقاتها وبشكل سريع في شتى المجالات التكنولوجية [62،60]

3.5.II. تقنيات التحليل الكهروكيميائي:

التقنيات الكهروكيميائية ايضا طبقت في تحديد الفعالية المضادة للأكسدة حيث استخدمت التقنية الامبيرومترية و البيامبيرومترية و التقنيات الفولتامترية وهي تعتبر من احسن الطرق لما

تميزت به من مصداقية ودقة في العمل وتم استخدام تقنية الفولتامتري الحلقي و الفولتامتري الموجة المربعة والفولتامتري النبض التفاضلي في التحليل المنجز وهي الأكثر استخداما على نطاق واسع.

1. الطريقة الامبيرومترية *Amperometric*:

تعتمد الطريقة الامبيرومترية على قياس شدة التيار الذي يتدفق بين قطب العمل والقطب المرجعي ،و بتطبيق قيمة جهد ثابتة ينشا تيار الأكسدة و الارجاع الناتج من تحليل المادة الفعالة ، يتم الحفاظ على قيمة الجهد التي تتعلق بالقطب المرجعي [53،54] .

في الطريقة الامبيرومترية تقدير فعالية المواد المضادة للأكسدة يعتمد اساسا على ارجاع $DPPH^{\bullet}$(*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) بقطب الكربون الزجاجي [55].

تتمكن الطريقة المطبقة من تقدير فعالية مضادات الأكسدة لمركبات مضادة للأكسدة نقية قابل للذوبان في الماء أو الايثانول ، حيث تم دراسة عينات عدة من المشروبات والشاي و تم الحصول على علاقة جيدة من النتائج بمقارنتها مع *Trolox*، و ($R^2 = 0.9993$) بين الطريقة الامبيرومترية المقترحة والطريقة الكلاسيكية الطيفية [55].

2. طريقة بيأمبيرومتري *Biamperometric* :

تعتمد الطريقة البيأمبيرومتري على قياس التيار المار بين أقطاب متطابقة تعمل على استقطاب فرق جهد صغير ،ومغمورة في محلول يحتوي على زوج الأكسدة و الارجاع يكون التفاعل عكوس ،بيأمبيرومتري الغير مباشر يعتمد على تفاعل تحليل زوج الأكسدة ، حيث تعتمد على شكل المؤكسد أو انخفاض زوج الأكسدة وتحليله ،Fe^{3+}/Fe^{2+}, I_2/I^-, $Fe(CN)_6^{-3}/Fe(CN)_6^{-4}$ عبارة عن ازواج اكسدة تستخدم في قياس البيأمبيرومتري [56].

3. التقنيات الفولتامترية:

التقنيات الفولتامترية هي تقنية تعتمد على قياس التيار عند غمس قطبين دليل و مرجع في محلول حامل للعينة ،و تتم زيادة جهد قطب الدليل تدريجيا بتطبيق جهد خارجي على خلية التحليل ،نجد انه عندما يصل الجهد إلى جهد التفكك للأيون المراد تحليله فانه ينشأ تيار الانتشار نتيجة الأكسدة و الارجاع للمادة المراد تحليلها [59]. يستند مبدأ الطريقة عامة على قياس تيار الانتشار المار في خلية التحليل التي تحتوي على قطب دليل صغير جدا ذو مساحة سطحية لا تتجاوز بضعة مليمترات مربعة وذلك لكي يستقطب بسهولة ،ويمكن استخدام إحدى الأقطاب الصلبة ،مثل قطب البلاتين أو الكربون الزجاجي او القطب الزئبقي المتساقط كقطب دليل،أما القطب المرجعي غالبا ما يكون قطب الفضة/كلوريد الفضة (Ag/AgCl) والقطب المساعد عبارة عن قطب الكالوميل المشبع بحيث لا يستقطب أثناء التحليل ويطلق على هذه الطرق عامة

بالطرق الفولتامترية،أما عند استخدام القطب الزئبقي كقطب عمل فإنه يطلق عليها اسم الطرق البولاروغرافية،المنحنى الناتج بين الجهد المطبق مقابل تيار الانتشار يسمى فولتاموغرام أو بولاروغرام [64،61] .

التقنيات الفولتامترية متعددة الاستعمالات في مختلف مجالات البحث العلمي و خاصة في مجال الكيمياء الكهربائية و تفاعلاتها ،و كان استخدامها متعدد المجالات [62،60] مثل :

- البحث عن المواد المقاومة للصدأ (التآكل يكون نتيجة لسلسة من التفاعلات الكهربائية والكيميائية)
- إنتاج انواع جديدة من البطاريات التي يمكنها تخزين كميات كبيرة من الطاقة.
- و من أهم التطبيقات الفولتامترية هي التحليل الكمي لآثار المعادن مثل الذهب من أكسدة و ارجاع هذه المواد الكيميائية .
- استخدمت مؤخرا في تقدير فعالية المواد المضادة للأكسدة.

حركة الجزيئات في المحلول الحامل :

العمليات التي تسمح بحركة المركب الكيميائي قي المحلول هي في الأساس ثلاثة:

الحمل الحراري، و الهجرة، و الانتشار [59].

- **الحمل الحراري *Convection*:**

تتم حركة الجزيئات حراريا بمعزل عن عملية تفريغ الشحنة بسبب وجود درجة حرارة أو كثافة متغيرة (متدرجة) ،في هذه الحالة حركة جزيئات (المذيب أو المذاب) تتم مع الحركة الأكثر أو الأقل اضطرابا ، لكن لتصبح اقل اضطرابا يجب ان تكون طبقة المحلول القريبة من سطح قطب العمل بالتقريب ثابتة [59].

- **الهجرة *Migration*:**

الهجرة هي الحركة الناتجة من المجال الكهربائي الذي تولده قوى التجاذب بين القطب و أي شاردة لديها شحنة مضادة ،وأيضا ناتج بسبب قوى التنافر بين الشوارد التي تحمل نفس الشحنة على سطح القطب[59].

- **الإنتشار *Diffusion*:**

الإنتشار هو حركة تلقائية أو طبيعية للمركبات الكيميائية التي يحدث لها تغير في التركيز، الذي يعبر عن الحالة التي تكون فيها منطقة من المحلول أقل تركيز من الأخرى. خلال عملية تفريغ الشحنة،يصبح المحلول القريب من القطب أقل تركيز بالنسبة للمحلول البعيد عن القطب، ويصبح التركيز في الخلية غير منتظم، زيادة الفرق في التركيز يتطلب مركب فعال

كهربائيا آخر في المحلول غير المستقر.تتناسب سرعة الانتشار طرديًا مع الفرق في التركيز للمادة الفعالة كهربائيا في المحلول.

حسب الظواهر الثلاثة المذكورة ،الانتشار فقط يمكنه أن يتعلق بتركيز المادة الفعالة كهربائيا ، هذه الظاهرة هي المعتمدة في التحاليل الفولتامترية وهي ضرورية لتحديد الشروط المناسبة و لضمان أن المركب الفعال كهربائيا يمكن أن يتحرك بشكل جيد خلال عملية التحليل[59].

اقطاب العمل *Working electrodes*:

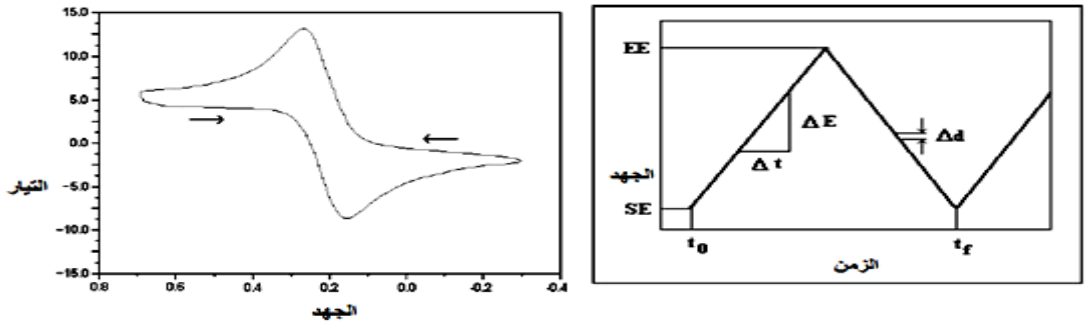
وهو عبارة عن اسطوانة قطرها بعض الملمترات ،تتم عليها تفاعلات الأكسدة والإرجاع [51]، وهو يؤثر على مجال مسح الجهد ويعتمد على نوع المذيبات ،و التركيب الكيميائي للقطب، و خصائص سطح القطب ،و المحلول الحامل ،و الحساسية من أدوات القياس [59].

واعتمادا على ظواهر الجهد المتغيرة بسبب التركيب الكيميائي للقطب نتأمل أهم الأقطاب :

- ✓ قطب الزئبق *Electrodes Mercurey*
- ✓ قطب البلاتين *Palatine electrodes*
- ✓ قطب الكربون الزجاجي *Carbon electrodes*

الفولتامتري الحلقي *Cyclic Voltammetry* :

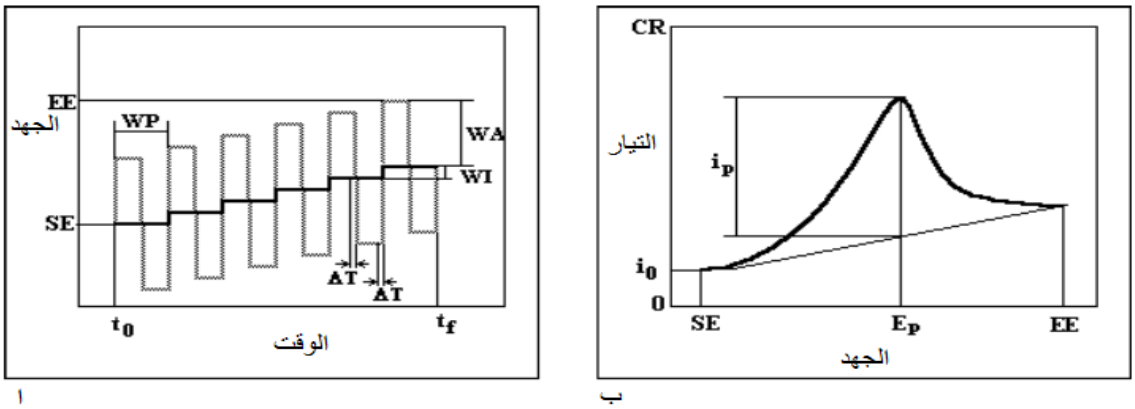
الفولتامتري الدوري هي طريقة من طرق القياس الكهروكيميائية [65] ،وهي تقنية مختصة لدراسة المادة المحللة كيفيا ولدراسة عكسية التفاعل الحاصل عند قطب العمل، حيث يتغير الجهد بشكل دوري [63] ، عندما يصل الجهد إلى قيمة ثابتة ، يتم قلب جهد قطب العمل في الاتجاه العكسي ، وهذا الانعكاس يمكن أن يحدث عدة مرات خلال تجربة واحدة و يتم رسم كثافة التيار مقابل الجهد المطبق لإعطاء فولتاموغرام دوري[65].



الشكل (16.I): الفولتامتري الحلقي

فولتا متري الموجة المربعة *Square Wave Voltammetry, SWV*

أثناء متابعة الجهد المطبق على القطب العامل تتحصل على موجة مربعة متماثلة حيث يقاس التيار في المرة الأولى عند نهاية النبضة الأمامية وفي المرة الثانية يقاس عند نهاية النبضة المعاكسة [3،4،10].

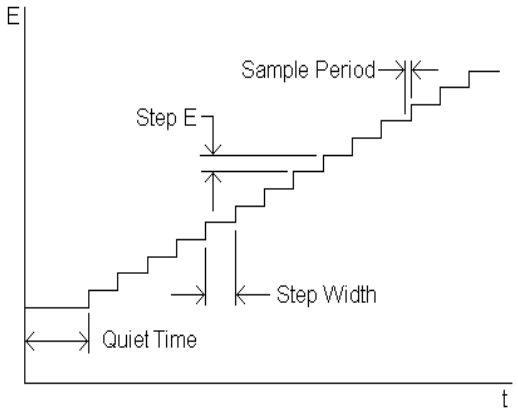


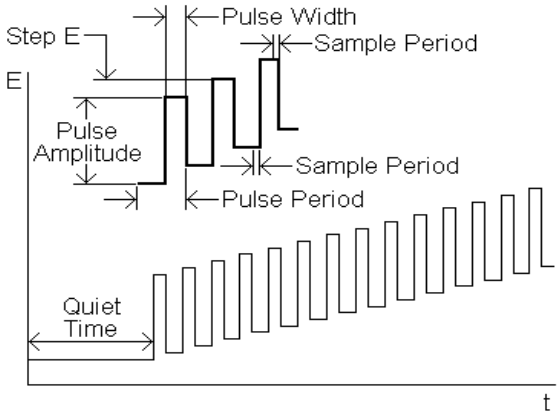
الشكل (17.I): الفولتامتري النبضي التفاضلي

الفولتامتري النبضي التفاضلي *Différentiel pulse voltamètre DPV:*

الفولتامتري النبضي التفاضلي هو تقنية من تقنيات التحليل الكهروكيميائي تعتمد على تقليص او الحد من تيار الشحن (السعة)، حيث يمكن اعتبار هاته ئالتقنية من مشتقات تقنية فولتامتري المسح الخطي، وتعتمد على تطبيق سلسلة من النبضات المنتظمة على الكمون خلال المسح الخطي، و يتم قياس التيار قبل كل تغير في الكمون، هذا المبدأ يمكننا من رسم التغير في فرق التيار (Δi) كدالة للكمون. اهم العوامل التي تتحكم في هذه التقنية:

- ✓ **مقدار علو النبض (Pulse amplitude):** و هو مقدرا ارتفاع كمون النبضة.
- ✓ **عرض النبض (Pulse width):** و هو زمن النبضة.
- ✓ **زمن العينة (Sample period):** و هو زمن نهاية النبضة الذي يقاس فيه التيار[3،4،10].





الشكل (18.I): الفولتامتري النبضي التفاضلي **الشكل (19.I): الفولتامتري النبضي**

المراجـــع:

[1]. ا.د. عبد الرؤوف محمد عبد الرحمان محمد ،ك .م.عبد الله بقشان،حبوب اللقاح و أهميتها ، العدد الثاني(2010).

[2]. ص. بن عشورة ' الفعالية المضادة للأكسدة – الزيوت الطيارة و المركبات الفينولية لـ Deverra.scoparia ، رسالة ماجستير جامعة قاصدي مرباح و رقلة ،(2007).

[17]- ا.د محمد عمر محمد عمر ،ك .م.عبد الله بقشان ، استخدام منتجات نحل العسل ، العدد الثاني عام(2011).

[19]- م. بوقوادة ،دراسة فيتوكيميائية للبيبيدات والفينولات في بعض أنواع نوى التمر المحلي، مذكرة ماجيستير، جامعة قاصدي مرباح ورقلة، 2008.

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

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

[24].د.بشرى البشير، التغذية والصحة ،الأدارة العامة للتغذية بوزارة الصحة السعوية2003.

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

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

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

المراجع الأجنبية:

[3] . wang ,Joseph, analytical electrochemestry ,secand edition, 2000Wiley vch.

[4] P. john wiley et son 2006 fondamentals of electrochemestry ,secand edition similtane in Canada.

[5] GAYON. RIBEREAU, (1968)- Les composés phénoluque des végteaux. Imp. Samie, Bordeoux, France.

[6].MIDLETONE., (1984)- The flavonoides trends pharmacol Science. Art. Sci5,335 ,338 JV.

[7]. M. PARIS et M. HURABIELLE,1986- Arébgé Matiére Médicale. Tome 1. Ed. Masson, Paris, p465.

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

[9]. ,j.Bacon D. Mabry,T .mear , j.A(1976).latino.Amer.quinn,7, 83

[10]. M. Christopher , A.Brett ,Ana Mria Oliver ia prette 1993 electrochimestry . New york.

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

[13]. J. Psotová, J. Zahálková, J. Hrbáč, V. Šimánek, J. Bartek. Biomed. Papers 145(2),81–83 (2001).

[14] . L.M. Magalhaes, M.A. Segundo, S. Reis, J.L.F.C. Lima. Anal. Chim. Acta. 613 (2008) 1-19.

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

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

[18].C.Enrique, P.Lester, Handbook of Antioxidants, 2eme ed, New York, Basel.Marcel Dekker, Inc. 2002.

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

[28]. N. Pellegrini, Serafini M, Colombi B, Del Rio D, Salvatore S, et al. (2003) Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. J Nutr 133: 2812–2819.

[29]. M. Serafini, R. Bellocco, A. Wolk and Ekstrom AM (2002) Total antioxidant potential of fruit and vegetables and risk of gastric cancer. Gastroenterology 123: 985-991.

[30]. F. Brighenti, S. Valtueña, N. Pellegrini, D. Ardigo, D. Del et al. Rio, (2005) Total antioxidant capacity of the diet is inversely and independently related to plasma concentration of high-sensitivity C-reactive protein in adult Italian subjects. Br J Nutr 93: 619-625.

[31]. N. Pellegrini, S. Serafini, Del Rio SD and M. Bianchi (2006) Total antioxidant capacity of spices, dried fruits, nuts, pulses, cereals and sweets consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. Mol Nutr Food Res 50: 1030–1038.

[32] . MF. Ramadan, LW. Kroh and JT .Moersel (2003) Radical scavenging activity of black cumin (L.Nigella sativa), coriander (L.Coriandrum sativum) and niger (abyssinica Cass.Guizotia) crude seed oils and oil fractions. J Agric Food Chem 51: 6961-6969.

[33]. MF. Ramadan and JT. Moersel (2007) Impact of enzymatic treatment on chemical composition, physicochemical properties and radical scavenging activity of goldenberry (L.Physalis peruviana) juice J Sci Food Agric 87: 452-460.

[34]. M. Serafini, R .Bellocco, A. Wolk and AM. Ekstrom (2002) Total antioxidant potential of fruit and vegetables and risk of gastric cancer. Gastroenterology 123: 985-999.

[35]. H. Wang, G. Cao and RL. Prior (1997) Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. J Agric Food Chem 45: 304-309.

[36]. Pellegrini N, P .Simonetti, C .Gardana, O. Brenna, F. Brighenti, et al. (2000) Polyphenol content and total antioxidant activity of vini novelli (young red wines). J Agric Food Chem 48: 732-735.

[37]. Giardi MT, G. Rea, B .Berra (2010) Bio Farms for Nutraceuticals: Functional Food and Safety Control by Biosensors. Landes Bioscience and Springer Science+Business Media.

[38] . PL. Chong, M. Olsher (2007) Fluorometric assay for detection of sterol oxidation in liposomal membranes. Methods Mol Biol 400: 145-158.

[39]. K. Thaipong, U. Boonprakob, K .Crosby, L. Cisneros-Zevallos and DH. Byrne (2006) Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. Journal of Food Composition and Analysis 19:669–675.

[40]. F. Marc, A. Davin, L. Deglène-Benbrahim, C. Ferrand, M .Baccaunaud, et al. (2004) Studies of several analytical methods for antioxidant potential evaluation in food. Med Sci 20: 458-463.

[41]. L.Su, JJ. Yin, D .Charles, K. Zhou, J. Moore, et al. (2007) Total phenolic contents, chelating capacities, and radical-scavenging properties of black peppercorn, nutmeg, rosehip, cinnamon and oregano leaf. Food Chem 100: 990–997.

[42]. MI. Gil, FA. Tomas-Barberan, B.Hess-Pierce and AA. Kader (2002) Antioxidant capacities, phenolic compounds, carotenoids and vitamin C contents of nectarine, peach and plum cultivars from California. J Agric Food Chem 50: 4976-4982.

[43]. P. Denev, M. Ciz, G. Ambrozova, A. Lojek, I. Yanakieva, et al. (2010) Solidphase extraction of berries' anthocyanins and evaluation of their antioxidative properties. Food Chem 123: 1055-1061.

[44] . L. Campanella, E. Martini, E .Rita and M. Tomassetti (2006) Antioxidant capacity of dry vegetal extracts checked by voltammetric method. J Food Agric Environ 4: 135-144.

[45]. H. Slavíková, A. Lojek, J. Hamar, M .Dušková, L .Kubala, et al. (1998). Total antioxidant capacity of serum increased in early but not in late period after intestinal ischemia in rats. Free Radic. Biol. Med 25: 9-18.

[46]. GK. Jayaprakasha, B. Girennavar and BS. Patil (2008) Radical scavenging activities of Rio Red grapefruits and Sour orange fruit extracts in different in vitro model systems. Bioresource Technol 99: 4484-4494.

[47]. J .Meng, Y. Fang, A. Zhang, S. Chen, T. Xu, et al. (2011) Phenolic content and antioxidant capacity of Chinese raisins produced in Xinjiang Province. Food Res Int.

[48]. R. Apak., K G. Guculu, M. Ozyurek and SE. Karademir (2004) Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric iron reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. J Agric Food Chem 52: 7970-7981.

[49] . KF.Magalhaes, ARL. Caires and SL .Oliveira (2011) Determination of Antioxidant Content in Biodiesel by Fluorescence Spectroscopy. Encontro de Fisica.

[50]. GK. Jayaprakasha, BS. Jena, PS. Negi, KK. Sakariah (2002) Evaluation of Antioxidant Activities and Antimutagenicity of Turmeric Oil: A Byproduct from Curcumin Production. Z Naturforsch 57c: 828-835.

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

[52]. A Stalmach, W. Mullen, C. Nagai, A .Crozier (2006) On-line HPLC analysis of the antioxidant activity of phenolic compounds in brewed, paper-filtered coffee. Braz J Plant Physiol 18: 253-262.

[53]. F Scheller and F .Schubert, (1992) Biosensors. Elsevier, Amsterdam.

[54]. R. Kellner, JM. Mermet, M. Otto and Widmer, (1998) Analytical Chemistry. Wiley– VCH Verlag, Weinheim

[55]. S. Milardovic, D. Ivekovic and BS .Grabaric (2006) A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical, Bioelectrochemistry 68: 175-180.

[56]. TP. Tougas, JM .Jannetti, WG. Collier (1985) Theoretical and experimental response of a biamperometric detector for flow injection analysis. Anal Chem 57: 1377-1381.

[57]. H Zieliński, D. Zielińska, H. Kostyra (2012) Antioxidant capacity of a new crispy type food products determined by updated analytical strategies. Food Chem 130: 1098-1104 .

[58]. E. Niki (2010) Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. Free Radical Biology and Medicine. 49: 503-515.

[59].AMEL.srl, Introduction to Modern Voltammetric and Polarographic Analisys Techniques , Pierpaolo Protti, IV. Edition,(2001)

[60]. J. C. Vire, J. M. Kauffmann and G. J. Patriarche, J. Pharm. Biomed. Anal, 7, 1323

[61]. D. E. Smith, in Electroanalytical Chemistry (A. J. Bard, Ed.), Vol. 1, Marcel.

[62].R. Kalvoda and M. Kopanica, Pure Appl. Ch,61,97(1987).

[63]. J.Barek, A. G. Fogg, A. Muck and J. Zima, Crit. Rev. Anal. Chem, 31, 291(2001)

[64]. R. Kalvoda, Fresenius J. Anal. Chem, 349, 565, (1994)

[65]. S. Chevion, MA .Roberts, M. Chevion (2000) The use of cyclic voltammetry for the evaluation of antioxidant capacity. Free Radic Biol Med 28: 860-870.

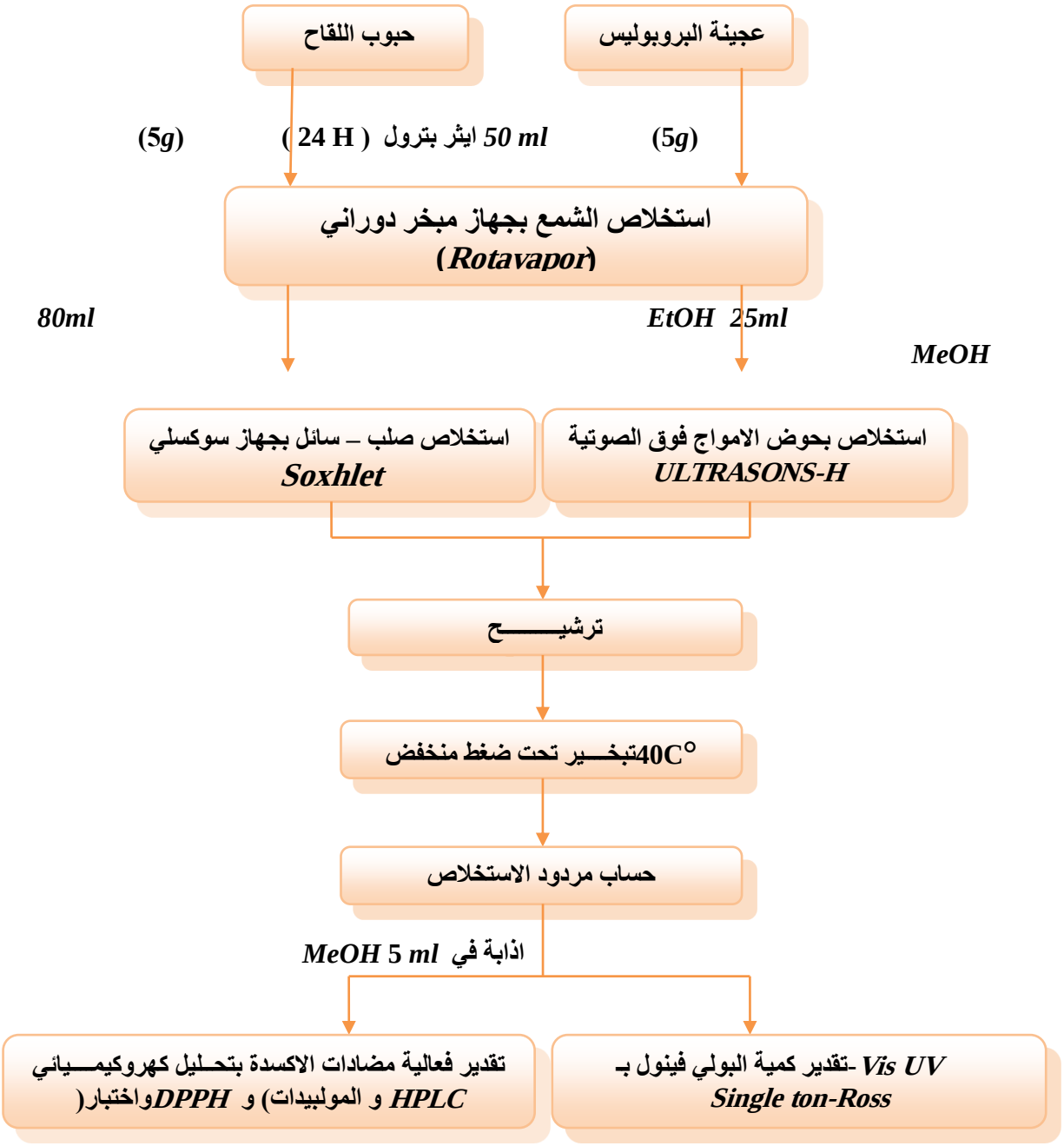
[66]. B .Ou, M. Hampsch-Woodill, J. Flanagan, EK. Deemer, RL .Prior, et al. (2002) Novel fluorimetric assay for hydroxyl radical prevention capacity using fluorescein as the probe. J Agric Food Chem 50(10): 2772-2777.

الفصل الثالث:

المواد و طرق العمل

III. المواد وطرق العمل:

تمت خطة العمل وفق المخطط التالي:



الشكل(1.III): يوضح طريقة استخلاص صلب – سائل لعينات البروبوليس و حبوب اللقاح.

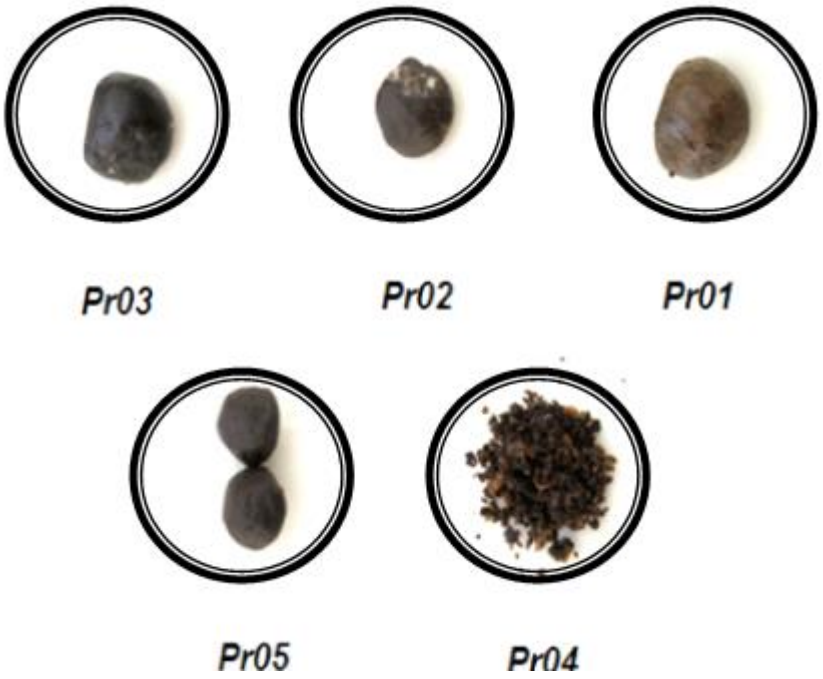
1.III. جني العينات :

تتوزع خلايا تربية النحل في اغلب مناطق الجزائر التي من خلالها يمكن استخراج البروبوليس و حبوب اللقاح، وقد تم الحصول على عينات البروبوليس وحبوب اللقاح من منطقة الوسط والشرق والجنوب والغرب لعام 2012، ويوضح تاريخ الحصول عليها ترميزها وصفاتها الفيزيائية في الجدول التالي :

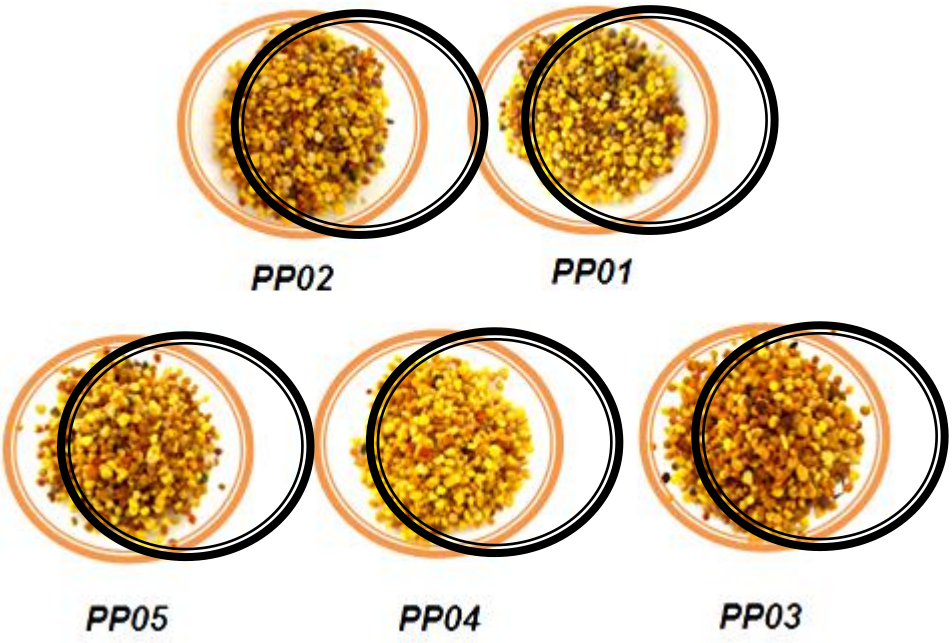
الجدول(1.III): تــاريخ الجني والصفات الفيزيائية لعينات البروبوليس وحبوب اللقاح المدروسة

	رمز العينة	المنــاطق	تاريخ الجني	اللـــون	طبيعة الرائحة	الطبيعـــــة
البروبوليـــــس	**Pr01**	تيزي وزو	2012	بني مخضر	عطرية خفيفة	ناعم الملمس، لين، متماسك، متوسط رطب
	Pr02	تغزوت الوادي	2012	بني	عطرية متوسطة	ناعم الملمس، لين، متماسك، متوسط الرطوبة
	Pr03	ميلة- جيجل	2012	بني داكن	عطرية قوية	لين الملمس، سهل العجن، رطب
	Pr04	تيبازة	2012	بني داكن	عطرية قوية	لين الملمس، سهل العجن متفتت رطب
	Pr05	تلمسان	2012	بني	عطرية خفيفة	ناعم الملمس، صعب العجن، متماسك، متوسط الرطوبة
حبـــــوب اللقـــــاح	**PP01**	تلمسان	2012	اصفر فاتح	عطرية خفيفة	صعب التفتت
	PP02	الجزائر	2012	اصفر	عطرية متوسطة	سهل التفتت
	PP03	البليدة	2012	اصفر غامق	عطرية قوية جدا	سهل التفتت

	PP04	تيبازة	2012	اصفر	عطرية متوسطة	سهل التفتت
	PP05	تيزيوزو بومرداس البليدة الجزائر	2012	اصفر غامق	عطرية قوية	صعب التفتت



الشكل (2.III): عينات البروبوليس المدروسة



الشكل (3.III): عينات حبوب اللقاح المدروسة

2.III. المواد والأجهزة المستعملة :

1.2.III. المواد الكيميائية المستخدمة:

- **الميثانول** ***(CH_3-OH)*** **،** ***(99%)*** ***إنتاج(Biochem Chemopharma)***
- **الايثانول المطلق** ***(C_2H_5OH)*** **،** ***(Ethanol Absolu)*** **إنتاج** ***(ALFA AESAR)***
- **ايثر بترول** ***(Absolu)*** **إنتاج** ***(ALFA AESAR)***
- **حمض الأسكوربيك** ***($C_6H_8O_6$)(acid ascorbic)*** **،** ***(99%)*** **إنتاج** ***(ALFA AESAR).***
- **حمض الغاليك** ***(C_6H_2COOH,H_2O)((OH)$_3$)(acid gallique)،(99%)*** **إنتاج** ***(PROLABO)***
- **الكرسيتين** ***($C_{15}H_{10}O_7$)(Quercetin dihydrate)،(97%)*** **إنتاج** ***(ALFA AESAR)***

- الروتين *(Rutin trihydrate)* $(C_{27}H_{30}O_{16})$، *(97%)* إنتاج *(ALFA AESAR)*
- الفـــولن *(Folin-Coiocaltew's Reagent)*، $(3H_2O,P_2O_5,13WO_3,5MoO_3,10H_2O)$، *(100%)*إنتاج *(PROLABO)*.
- حمض الاسيتيك *Acetic acid (100 %)* إنتاج *(ALFA AESAR)*
- حمض الكافييك *Cafic acid (99%)* إنتاج *(ALFA AESAR)*.
- حمض كلوروجينيك *Chlorogenic acid (97%)* إنتاج *(ALFA AESAR)*.
- الفانيلين *vannilin (99.5%)* إنتاج *(ALFA AESAR)*.
- كربونات الصوديوم (Na_2CO_3) .
- فوسفات الصوديوم *Phosphate sodium*
- حمض الكبريت *Acide sulfurique*
- مليبيدات الامنيوم *Molybdate ammonium*
- اسيتات الصوديوم $(3H_2O\text{-}CH_3COONa)$
- *DPPH (95%)* إنتاج *(ALFA AESAR)*

2.2.III. الاجهزة المستخدمة:

- **الميزان التحليلي نوع (*FA2004*) بدقة (*0.1mg*) صنع (*Shanghai Sunrise Instrument*).**
- **جهاز سوكسلي *Salvent extractor* نوع (SER 148) صنع (*VEP Scientifica*) الشكل(4.III)**
- **جهاز حوض الامواج فوق الصوتية *ULTRASONS-H* انتاج *(SELECTR)*.**
- **جهاز مبخر دوراني (*Rotavapor Buchi Heating bath B-490*).**
- **جهاز الاشعة فوق البنفسجية ـ المرئية *UV-spectro photometer* انتاج*(SHIMADZU)*.**
- **جهاز الكروماتوغرافيا السائلة ذات الكفاءة العالية نوع *(HPLC-RP-C18)* الشكل (8.III)**

← مرفق بمضختين *(Pompe A et Pompe B)* نوع *(LC 20 AL)* لنقل الطور المتحرك

تحت ضغط عال.

← مرفق ببرنامج تشغيل مبرمج في جهاز كمبيوتر متصل بالجهاز *(LC Solution)* .

← مرفق بعمود نوع (C-18) ، يبلغ طوله 125 ملم وقطرها الداخلي 4.6 ملم هذه الأعمدة تسمح فصل مركبات قطبية والتي هي قابلة للذوبان في الماء أو في محاليل مائية كحولية.

← مرفق بكاشف أحادي اللون (الأشعة فوق البنفسجية) نوع SPD-20A

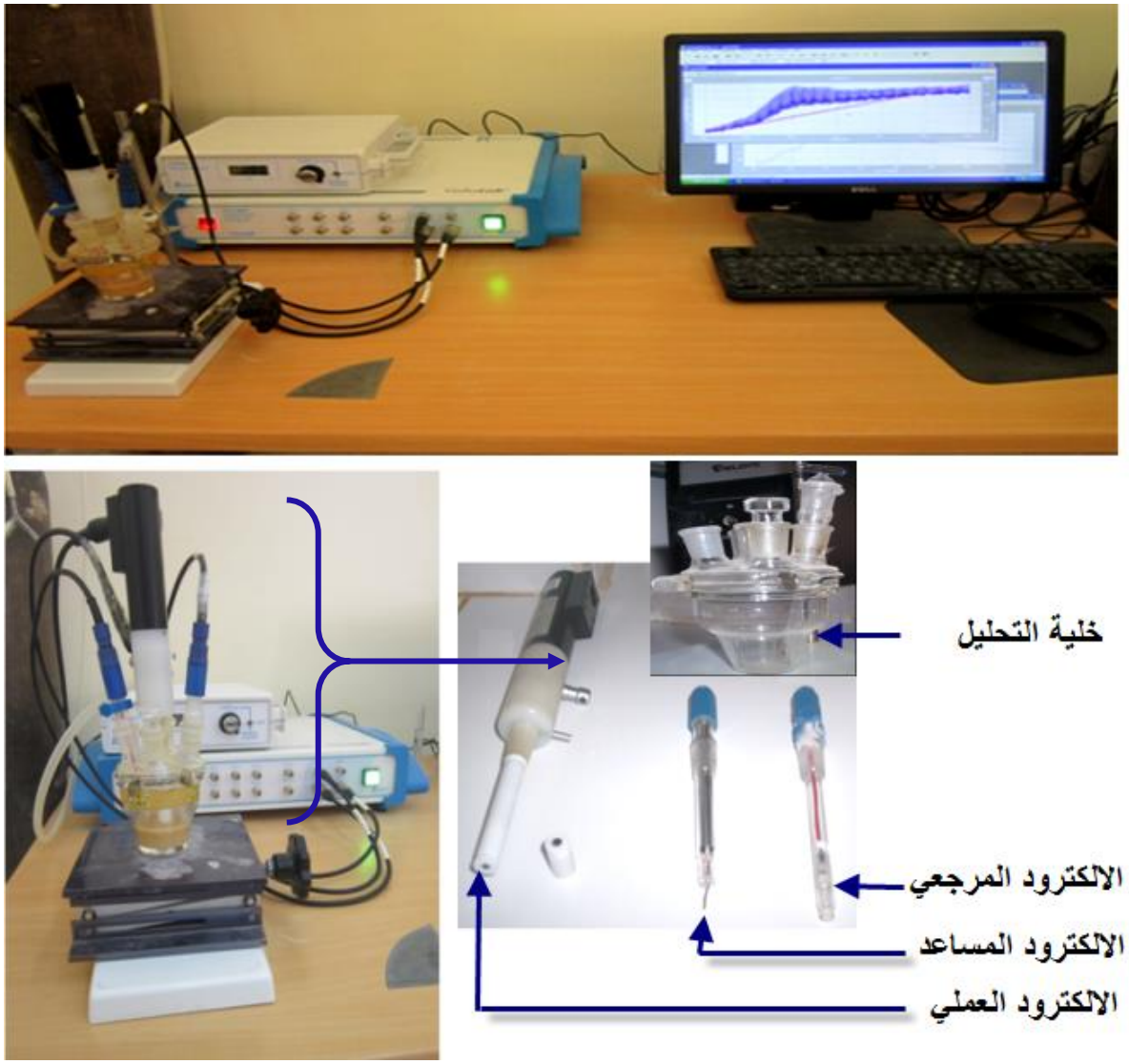
- **جهاز التحاليل الكهروكيميائية *(Voltalab) (PGZ 402Universal pulse Voltammetry)* صنع من طرف (*Radiometer Analytical*). الشكل (4.III)**

← مرفق ببرنامج تشغيل (*VoltaMaster 4*) مبرمج في جهاز كمبيوتر متصل بالجهاز.

← مرفق بخلية كهروكيميائية مصنوعة من الزجاج الشكل (4.III)

← مرفق بثلاث اقطاب الشكل (4.III)

- **قطب العمل : وهو عبارة عن اسطوانة من الكربون الزجاجي قطرها *3mm* ، يتم تنظيف هذا الأخير بعد كل عملية باستعمال ورق خاص «*ECSCILG,P54*» يحتوي على مادة كاشطة بعدها ينظّف بالماء المقطر ثم بالأسيتون ويجفف، صنع (*Radiometer Analytical SAS*) وهو القطب الذي تتم عليه تفاعلات الأكسدة والإرجاع.**
- **قطب مساعد: وهو عبارة عن سلك من البلاتين قطره *0.5cm* ، وظيفته إغلاق الدارة ، صنع (*Radiometer Analytical SAS*).**
- **قطب مرجعي :هو قطب الكالومال المشبع بكلوريد البوتاسيوم صنع (*Radiometer Analytical SAS*)**



الشكل (4.III): المكونات الاساسية لجهاز *PGZ 402* ,Voltalab (80).

3.III. تحضير العينات:

1.3. III. استخلاص العينات الجافة:

ان عملية استخلاص المركبات الفينولية من البروبوليس وحبوب اللقاح هي أهم خطوة في دراسته كمصدر للمواد الفعالة ، إذ اجريت الكثير من الدراسات حول أحسن الطرق المستخدمة لاستخلاص اكبر كمية من المواد الفعالة[1] ،و قد تنوعت هذه الطرق وفقا لطبيعة البروبوليس المدروس ،وقد تمت عملية استخلاص العينات بالطرق الاكثر استخداما و التي تستخلص اكبر مردود ، وقد اعتمدنا على طريقتين:

1.1.3.III. إستخلاص (صلب – سائل) بسوكسلي:

اخذنا وزنا قدره 5 g من كل عينة ووضع في جهاز سوكسلي الشكل (4.III) حيث تتم عملية الاستخلاص في *ml* 80 من الميثانول في درجة حرارة 65 م° عبر ثلاث مراحل:

- ✓ 1- غمس العينة: 30 د
- ✓ 2- غسل العينة: 90 د
- ✓ 3- استرجاع المذيب: 30 د

ثم تبخير الميثانول تحت التفريغ عند درجة حرارة 45C° بواسطة جهاز المبخر الدوار نتحصل على المستخلص الجاف ونقوم بحساب مردود الاستخلاص لكل عينة .

الشكل (5.III): جهاز سوكسلي (*Salvent extractor SER* 148)

2.1.3.III. استخلاص في حوض الأمواج فوق الصوتية *ULTRASONS-H*

اخذنا وزنا قدره 1*g* من كل عينة ونقوم بنقعها في 25ml من الايثانول وتوضع في حوض الأمواج فوق الصوتية الشكل **(5.III)** لمدة 30 د ونتركها منقوعة لمدة 24h ،ثم قمنا بعدها بعملية الترشيح و تبخير الايثانول تحت التفريغ عند درجة حرارة 45C° بواسطة جهاز التبخير الدوار فنحصل على الناتج الجاف ومن ثم قمنا بحساب مردود الاستخلاص .

الشكل (6.III) : يوضح عملية الاستخلاص في حوض الامواج فوق الصوتية

III .4. تقدير كمية البروتينات:

تمت عملية تقدير البروتينات في العينات وفقا لتجربة العالم لوري (Lowry) ، و ذلك بعد ان تمت عملية اس

أ- **تحضير المحاليل:** حيث تم تحضير اربع محاليل وهي:A- B- C- D

المحلول (A): أذبنا 1g من كربونات الصوديوم (Na_2CO_3) في 50ملل من NaOH (0.1N).

المحلول (B): حضرنا محلولين كبريتات النحاس ($0.5\%CuSO_4.5H_2O$) وسيترات الصوديوم 0.1%.

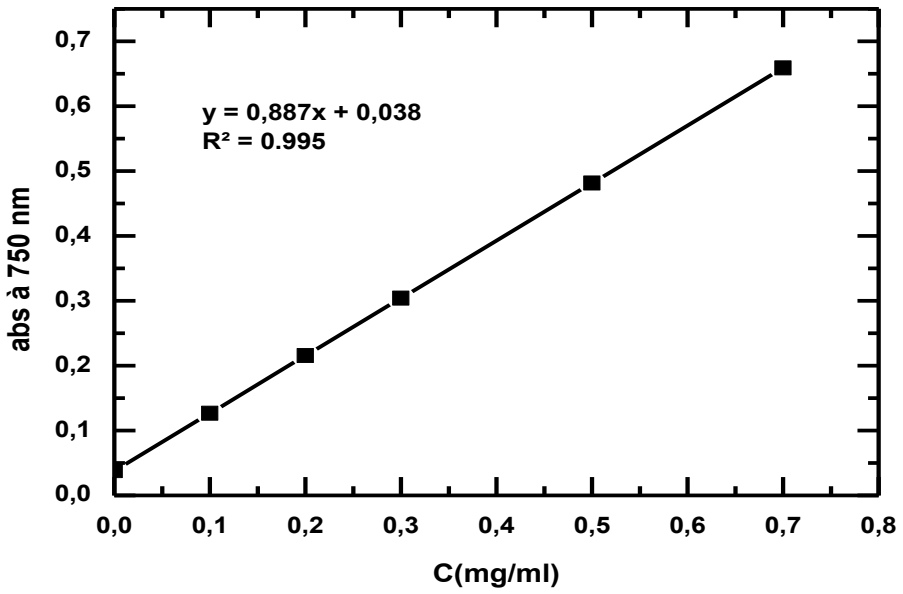
المحلول (C):أخذنا 2ml من كاشف الفولين (Réactif de Folin –ciocalteai) بتركيز (2N) وأضفنا له 2ملل من الماء المقطر.

المحلول (D):أخذنا 50 ml من المحلول (A) وأضفنا لها 1ml من المحلول (B).

ب- رسم المنحنى القياسي :

حضرنا تراكيز مختلفة من محلول الألبومين الممدد في الماء محصورة مابين (0 ،0.1، 0.2،0.3، 0.5، 0.7، 1) mg/ml و أخذنا من كل تركيز 200µL . و أضفنا له 2 ml من الحلول D 0.2 ملل من المحلول C وتمت القراءة في جهاز(UV-Visible) عند طول موجة 750nm.

ثم رسمنا المنحنى البياني لتغير الامتصاصية الضوئية (A) بدلالة التركيز (mg/ml) المنحنى **(1-III)**.



المنحنى (1.III): المنحنى القياسي لـ(albumin)

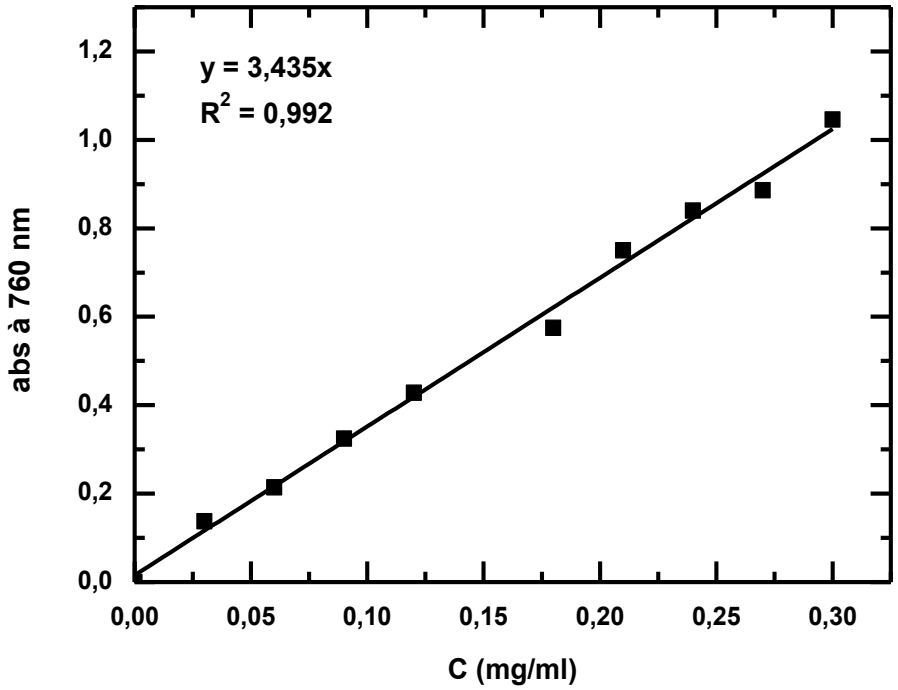
ت- تقدير كمية البروتينات في العينات :

أخذنا µ200l من محاليل في أنابيب وأضفنا لهم 2 ملل من المحلول (D) لكل عينة ،ووضعناهم في الخلاط الكهربائي من أجل التجانس وتركنا المحاليل في الظلام لمدة 10 دقائق وبعد ذلك أضفنا لها ml 0.2 من المحلول (C) وجعلناها في غرفة مظلمة لمدة 30 دقيقة وتمت قراءة الامتصاصية من خلال جهاز(UV-Visible) عند طول موجة λ_{max} = 750nm ونستخدم المنحنى القياسي لـ (albumin) المنحنى **(1-III)** لحساب تراكيز البروتينات في العينات المدروسة .

III .5. تقدير كمية الفينولات:

أ- رسم المنحنى القياسي:

تم تحضير تراكيز مختلفة من حمض الغاليك تكون محصورة بين 0.03 mg/ml و0.3mg/ml ونأخذ من كل محلول µl 100 ونضعها في أنبوب اختبار نضيف لها 0.5ml من كاشف (folin) الممدد، ثم نضيف ml 2 من كربونات الصوديوم (Na_2CO_3) تركيزه 20%، نرج الأنابيب جيدا ليتجانس المحلول و نضعها في الظلام لمدة 30 دقيقة تتم القراءة الامتصاصية بجهاز(UV-Visible) عند طول الموجة λ_{max} =760 .انطلاقا من قيم الامتصاصية (A) لمحاليل حمض الغاليك نرسم المنحنى القياسي الذي يبين تغير الامتصاصية ، المنحنى رقم **(2.III)** يبين تغير الامتصاصية (A) بدلالة التركيز بـmg/l



المنحنى (2.III):المنحنى القياسي لحمض الغاليك

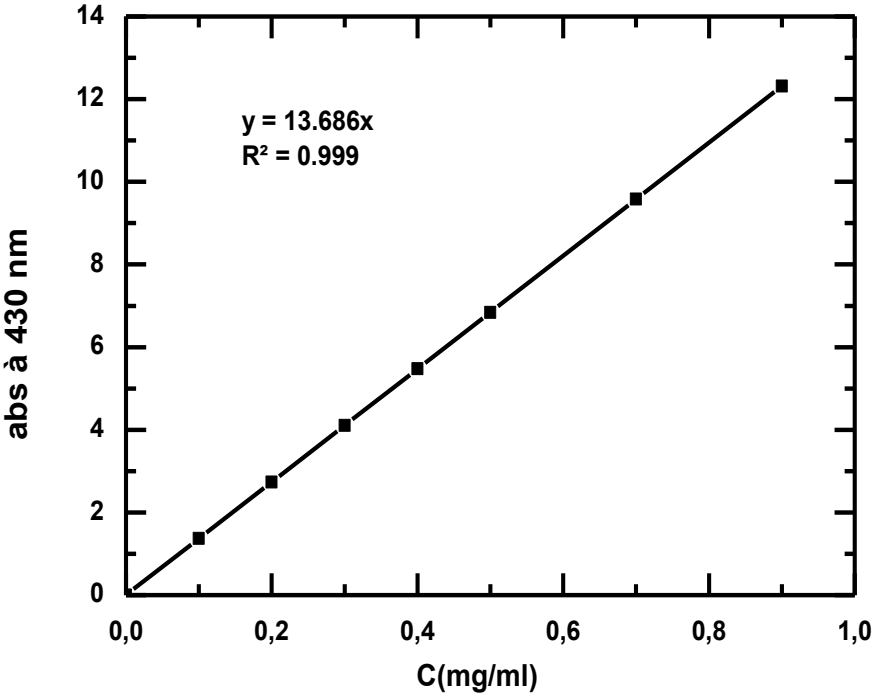
ب- تقدير كمية الفينولات في العينات :

عاملنا العينات بنفس الطريقة التي عاملنا بها حمض الغاليك ، نأخذ 100µl من كل محلول ذو التركيز 0.1ملغ/ملل ونعاملها بـ0.5 ml من كاشف فولين و2 ml من (Na_2CO_3) ونتركها في الظلام مدة 30 دقيقة ،نستخدم المنحنى القياسي لحمض الغاليك لحساب تراكيز الفينولات في مختلف العينات.

III .6. تقدير كمية الفلافونويدات:

أ- رسم المنحنى القياسي:

حضرنا تراكيز مختلفة من محلول الروتين (Rutine) محصورة مابين 0.02 mg/ml و 0.1 mg/l، من كل تركيز أخذنا 1ml وعاملناه بـ 1ml من ثلاثي كلور الألمنيوم ($AlCl_3$ 2%) ، يترك المزيج نصف ساعة في الظلام حتى إتمام التفاعل، ثم قرأنا شدة الامتصاص الضوئي لكل محلول عند طول الموجة 430nm، ثم رسمنا المنحنى البياني لتغير الامتصاصية الضوئية(A) بدلالة التركيز (mg/ml) المنحنى **(3.III)**.



المنحنى (3.III): المنحنى القياسي لـ(Rutine)

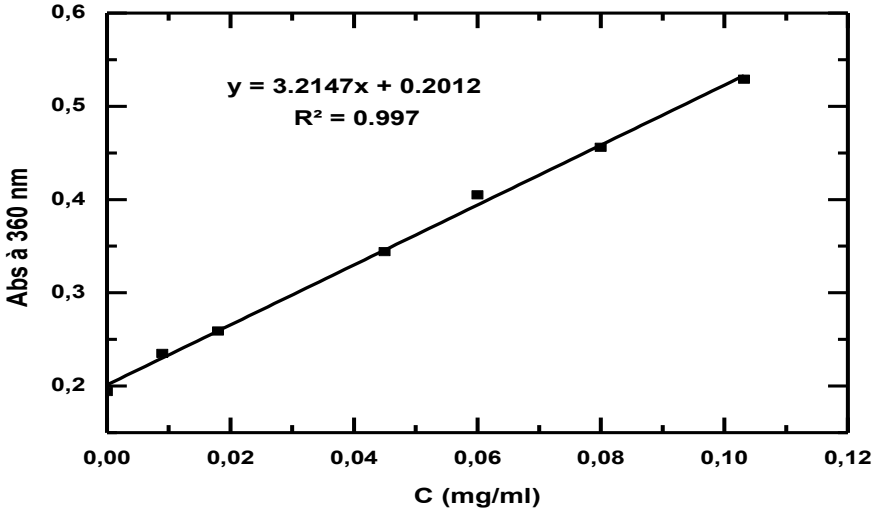
ت- تقدير كمية الفلافونويدات في العينات:

أخذنا 1ml من كل محاليل العينات ذو تراكيز0.1 mg/ml و نعامله بـ 1ml من ثلاثي كلور الألمنيوم ($AlCl_3$ 2%) ، نستعمل منحنى المعايرة (القياسي) لحساب كمية الفلافونويدات في كل محلول.

7.III. تقدير كمية الفلافانول:

أ- رسم المنحنى القياسي:

تم تحضير تراكيز مختلفة من الكرستين (مركب قياسي) تكون محصورة بين(0 g/ml و 0.1) g/ml ونأخذ من كل محلول ذو تركيز معين 0.125 ml و نضعها في أنبوب اختبار نضيف لها 0.125 ml من (0.1% HCl) في الميثانول، ثم نضيف 2.250 ml من (0.2% HCl) في الماء**[2]**، نرج الأنابيب جيدا ليتجانس المحلول و نضعها في الظلام لمدة 30 دقيقة **[3]**.حتى إتمام التفاعل، ثم تتم قراءة شدة الامتصاص الضوئي لكل محلول عند طول الموجة 360nm، فنتحصل على المنحنى البياني لتغير الامتصاصية الضوئية(A) بدلالة التركيز (mg/ml) المنحنى **(4.III)**.



المنحنى (4.III): المنحنى القياسي لـ (كرستين)

ب- تقدير كمية الفلافانول في العينات:

أخذنا 0.125مل من كل عينة و نعاملها بـ 0.125 مل من (0.1% HCl) المذاب في الميثانول و2.25 مل من (0.2 % HCl) المذاب في الماء، نستعمل منحنى المعايرة (القياسي) لحساب كمية الفلافانول في كل محلول.

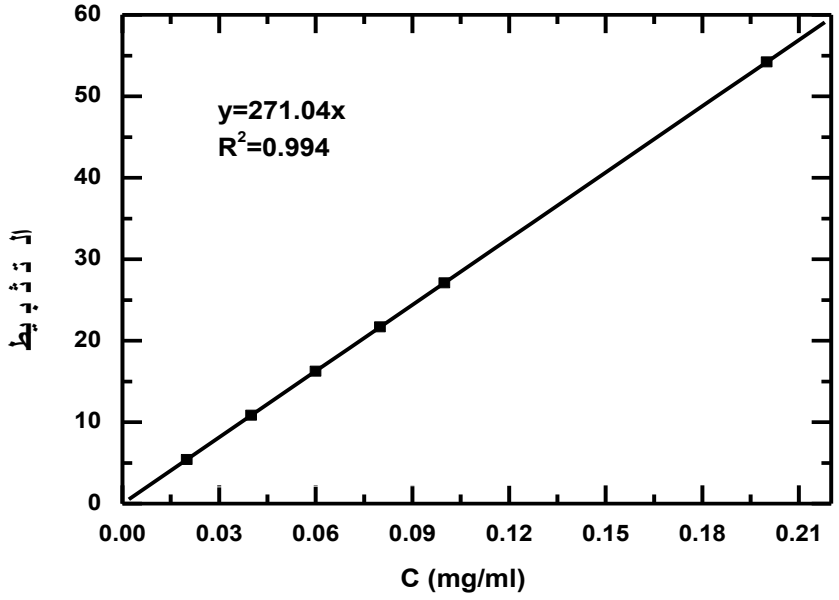
8.III. تقدير الفاعلية المضادة للأكسدة بالطرق الطيفية:

هي قياس قدرة المستخلص أو المركب لتثبيط الجذر الحر أو توقيف عملية الأكسدة، تقدر الفاعلية المضادة للأكسدة بعدة طرق نذكر منها:اختبار(DPPH) ،أو اختبار(FRAP)،أواختبار(ABTS)،أو اختبار(LMWA)،أو اختبار(TRAP)، او اختبار القدرة الإرجاعية (PR)، هذه الطرق تعتمد على التلوين ونزع التلوين في طول موجي معين**[4]**.في دراستنا هذه قمنا باختبار(DPPH) واخبار المولبيدات

1.8.III. اختبار DPPH:

أ- **رسم المنحنى القياسي :**

قمنا بتحضير 250 µM من محلول (DPPH) في الميثانول و تراكيز مختلفة من حمض الأسكوربيك (AA) في الميثانول من كل تركيز نأخذ 1ml نضيف لها 1ml من (DPPH) نجانس المحلول، و نتركه 30 دقيقة في الظلام بعدها تتم القراءة في جهاز UV-Vis عند طول الموجة الأعظمي λ_{max} =517nm [5].



المنحنى (5.III): المنحنى القياسي لـ (حمض الأسكوربيك)

ب- اختبار DPPH للعينات: نعامل تراكيز مختلفة من مستخلصات العينات بنفس الطريقة الي عاملنا بها حمض الاسكوربيك ،ثم نستعمل المنحنى القياسي لمقارنة فعالية مستخلصات العينات بالمركبات المضادة للجذور الحرة و للأكسدة.

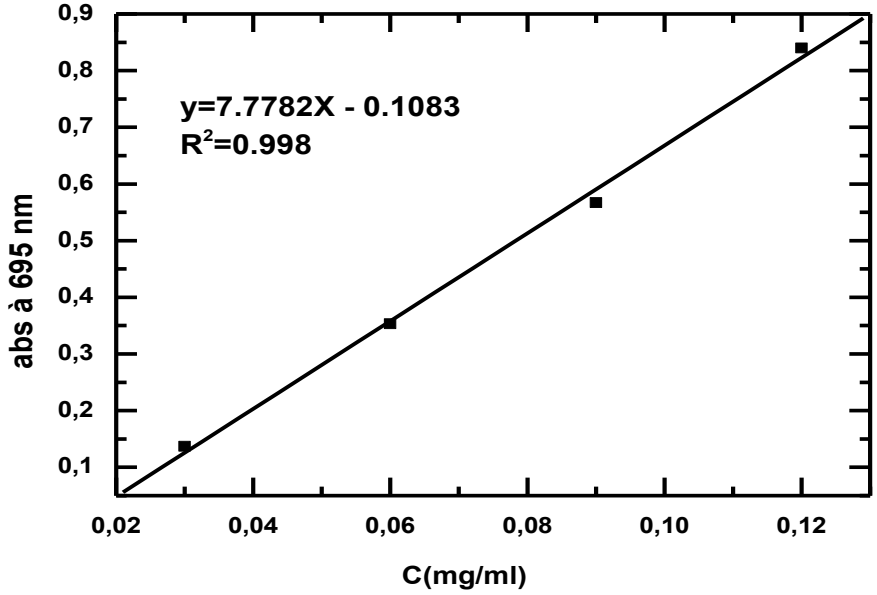
2.8.III. اختبار المولیبدات:

يمكننا هذا الاختبار من تقدير كمية مضادات الاكسدة الكلية عن طريق متابعة موليبدات الفوسفات بتحويله من
إن إجمالي الفعالية المضادة للأكسدة تقدر كميا بواسطة جهاز UV-Vis حيث يستعمل حمض الغاليك ***(ique)***

أ- رسم المنحنى القياسي :

تم تحضير تراكيز مختلفة من حمض الغاليك (مركب قياسي) تكون محصورة بين (0.03g/mlو0.3g/ml) نضعها في حمام مائي بدرجة 90°C لمدة 90 دقيقة ونتركه يبرد.[8]

تتم قراءة الامتصاصية بجهاز (UV-Visible) عند طول الموجة λ_{MAX}=695nm. فنحصل على المنحنى القياسي الذي يبين تغير الامتصاصية (A) بدلالة التركيز بـ(mg/ml) الموضح في المنحنى (6.III).



المنحنى (6.III): المنحنى القياسي لـ (حمض الغاليك)

ب- اختبار المواليبدات للعينات:

نعامل مستخلصات العينات بنفس الطريقة الي عاملنا بها حمض الغاليك، ثم نستعمل المنحنى القياسي لمقارنة فعالية مستخلصات العينات.

9.III. تقدير فعالية المواد المضادة للاكسدة بالطرق الكهروكيميائية:

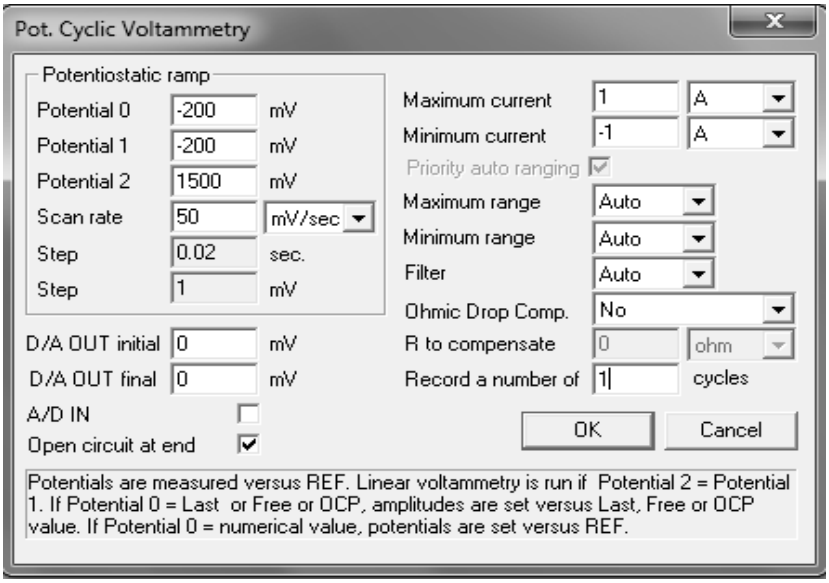
أ- تحضير المحلول الموقي:

يحضر المحلول الموقي ذو **pH=04** انطلاقا من من 18مل من اسيتات الصوديوم ($3H_2O$ .CH_3COONa) ذو تركيز 0.2 M و 82 مل من حمض الاسيتيك ذو نركيز 0.2 M [9].

ب- رسم المنحنيات القياسية:

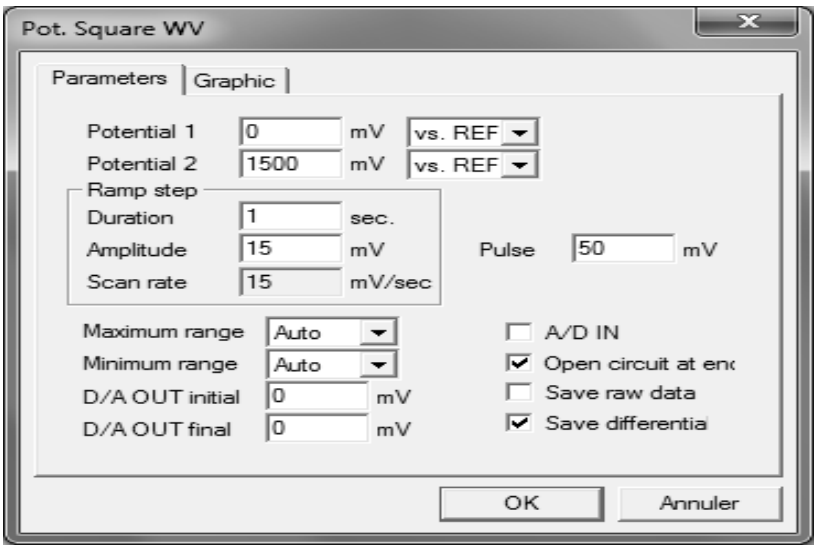
حضرنا تركيز 25 mM من حمض الاسكوربيك (مركب قياسي) في الميثانول، و اضفنا حجم 1*ml*، تتم إضافة تدريجيا بحجوم مختلفة من 0.1 إلى 1*ml* في خلية تحوي 25 مل من المحلول الموقي بحيث يتغير التركيز في الخلية عند كل إضافة ونرسم المنحنيات الفولتامترية الحلقية والفولتامترية الموجة المربعة والفولتامترية نبض التفاضلي الخاصة بكل اضافة تحت نفس الشروط لكل طريقة :

✓ **الفولتامتري الحلقي *Cyclic Voltammetry* :**



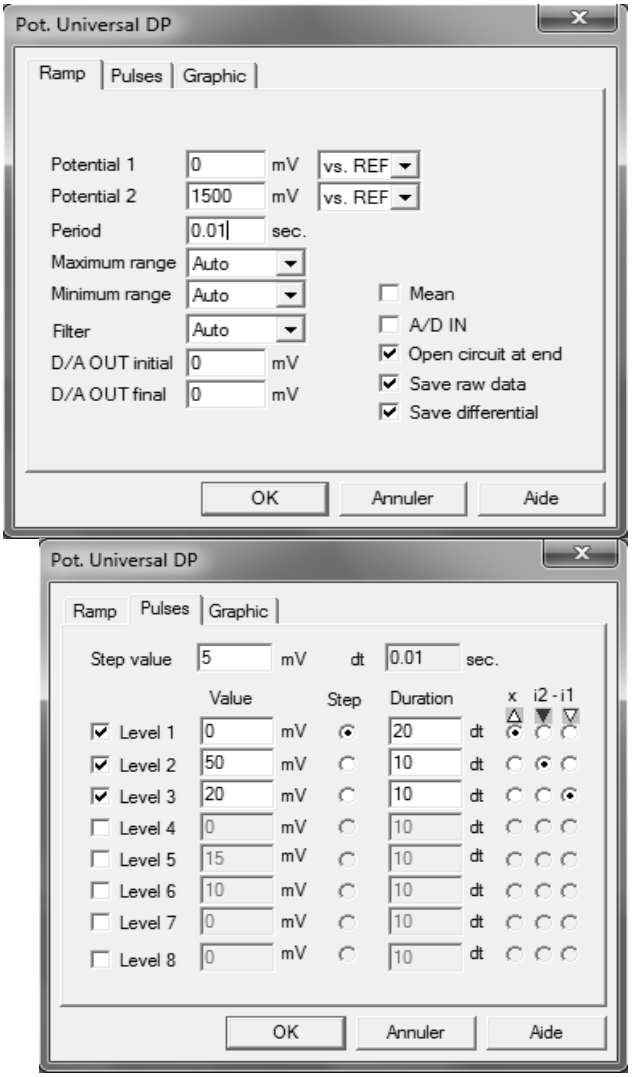
الشكل (7.III) : شروط الفولتامتري الحلقي *Cyclic Voltammetry*

✓ **فولتا متري الموجة المربعة *Square Wave Voltammetry, SWV*:**



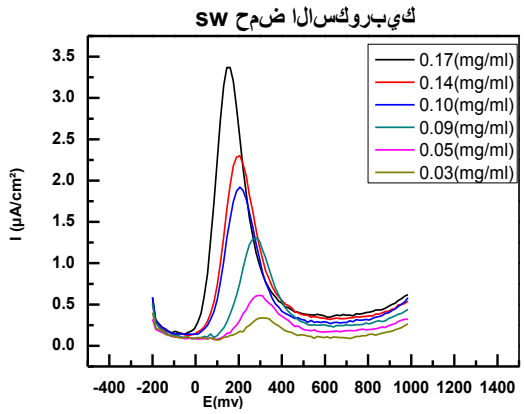
الشكل (8.III) : شروط فولتا متري الموجة المربعة (SWV)

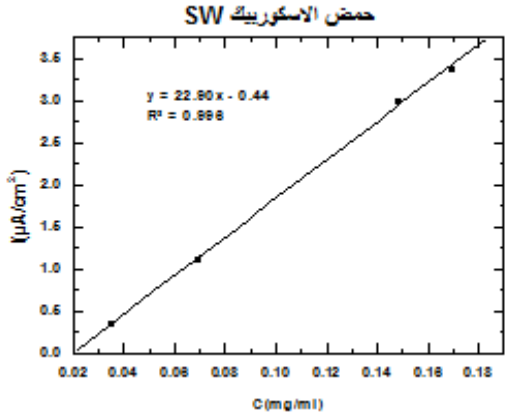
✓ **الفولتامتري النبضي التفاضلي *Différentiel pulse voltamètre DPV:***

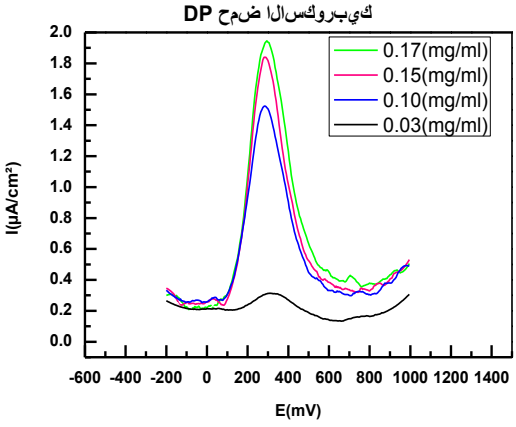


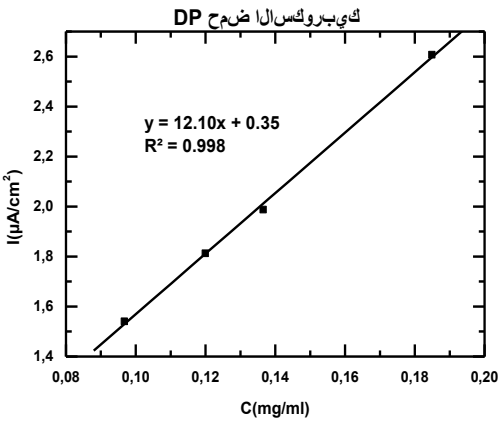
الشكل (9.III) : شروط الفولتامتري النبضي التفاضلي (DPV)

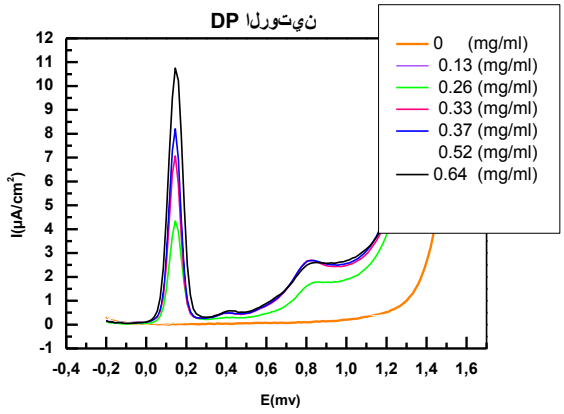
نرسم المنحنى القياسي لتغير شدة التيار بدلالة التركيز I(C) ،وبنفس الطريقة يتم رسم المنحنيات القياسية للكرستين والروتين .المنحنى (6.III) يوضح منحنيات I(C)، والمنحنيات الفولتامترية بالطريقتين الفولتامتري الموجة المربعة SWV والفولتامتري النبضي التفاضلي DPV للمركبات القياسية (حمض الاسكوربيك، الروتين، الكرسيتين):

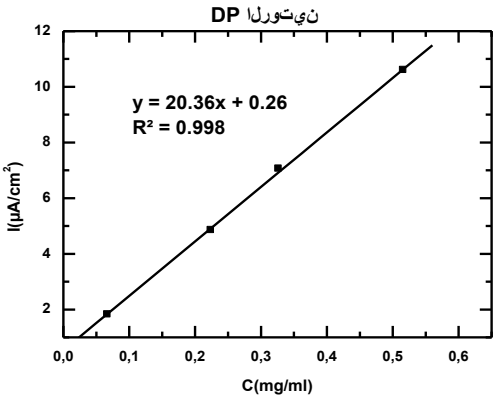

sw حمض الاسكوربيك
0.17(mg/ml)
0.14(mg/ml)
0.10(mg/ml)
0.09(mg/ml)
0.05(mg/ml)
0.03(mg/ml)
I (µA/cm²)
E(mv)

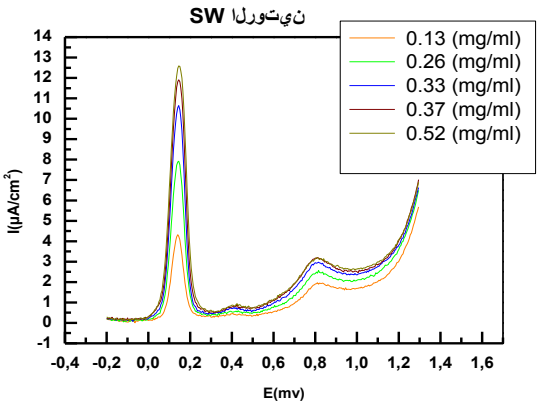

SW حمض الاسكوربيك
y = 22.90x - 0.44
R² = 0.998
I(µA/cm²)
C(mg/ml)

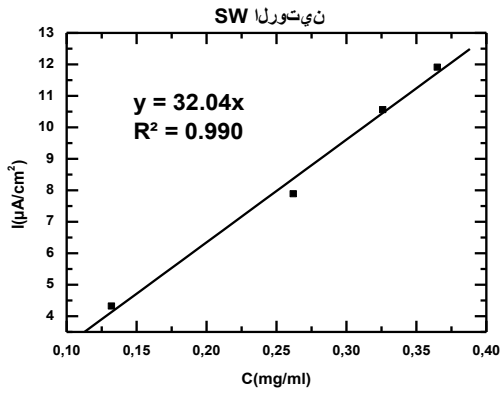

DP حمض الاسكوربيك
0.17(mg/ml)
0.15(mg/ml)
0.10(mg/ml)
0.03(mg/ml)
I(µA/cm²)
E(mV)

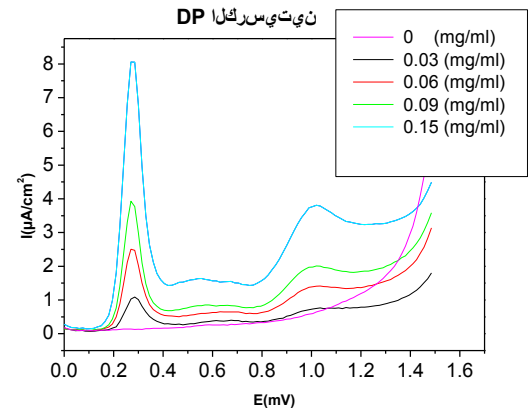

DP حمض الاسكوربيك
y = 12.10x + 0.35
R² = 0.998
I(µA/cm²)
C(mg/ml)

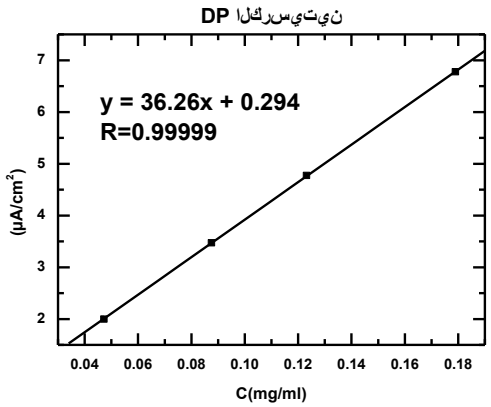

DP الروتين
0 (mg/ml)
0.13 (mg/ml)
0.26 (mg/ml)
0.33 (mg/ml)
0.37 (mg/ml)
0.52 (mg/ml)
0.64 (mg/ml)
I(µA/cm²)
E(mv)

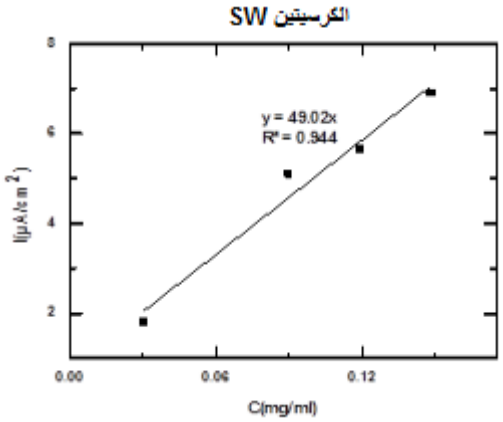

DP الروتين
y = 20.36x + 0.26
R² = 0.998
I(µA/cm²)
C(mg/ml)

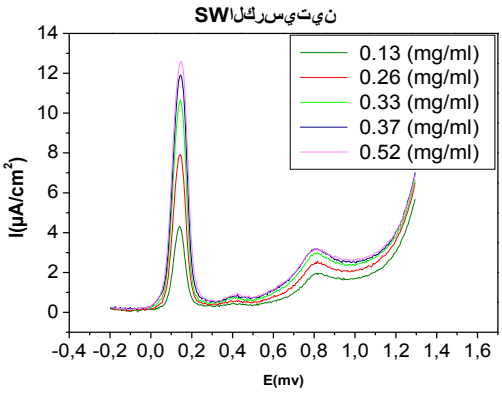

SW الروتين
0.13 (mg/ml)
0.26 (mg/ml)
0.33 (mg/ml)
0.37 (mg/ml)
0.52 (mg/ml)
I(µA/cm²)
E(mv)


SW الروتين
y = 32.04x
R² = 0.990
I(µA/cm²)
C(mg/ml)









المنحنى (7.III): منحنيات I(C)،والمنحنيات الفولتامترية بالطريقتين SW وDP للمركبات القياسية

ت- تقدير فعالية المواد المضادة للأكسدة في العينات:

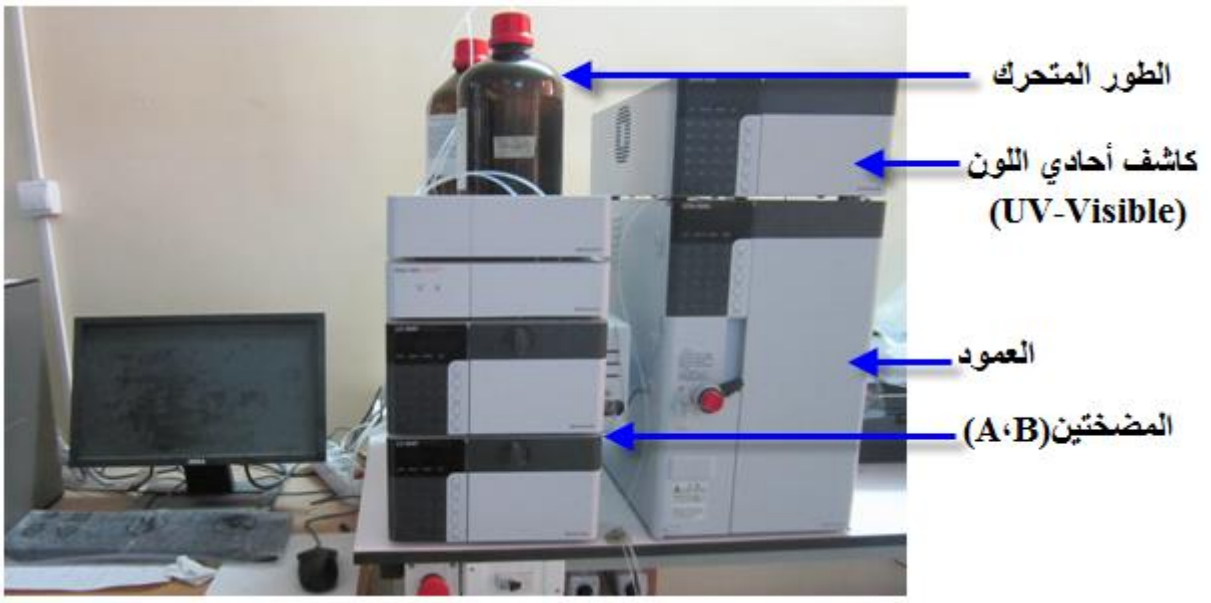
نذيب وزن 0.2 غ من كل عينة في حجم 25 مل (15 مل محلول موقي + 10 مل ميثانول) ،ونضعه في الـ
بدلالة التركيز I(C) لكل عينة.

10.III. تقدير كمية بعض الفينولات بطريقة الكروماتوغرافيا السائلة ذات الكفاءة العالية :

تسمح تقنية الكروماتوغرافيا السائلة ذات الكفاءة العالية بتقدير كيفي ونوعي لبعض الفينولات في المستخلصات،وتعد هذه التقنية الافضل لتحليل الخلائط المعقدة في وقت قصير[10].

أ- رسم المنحنيات القياسية:

نقوم بتحضير محلول ام ذو تركيز(1mg/ml) من عينات المركبات القياسية، ثم نمدد هاته المحاليل للحصول على سلسلة من التراكيز بين (200-2 µg/ml) في 80% ميثانول عالي النقاوة، نقوم بترشيح العينات ثم حقنها في جهاز الكروماتوغرافيا السائلة العالية الاداء HPLC.



الشكل (10.III) : جهاز الكروماتوغرافيا السائلة ذات الكفاءة العالية HPLC

نقوم بحقن كل محلول من المحاليل القياسية في جهاز الكروماتوغرافيا السائلة العالية الاداء HPLC في الشروط التالية:

- ✓ تدفق الطور المتحرك المستخدم : 1mL/min
- ✓ حجم خلية الحقن 20µl

- ✓ الطول الموجي 300 nm
- ✓ زمن التحليل الكلي 50min
- ✓ درجة الحرارة المستخدمة 25 C°
- ✓ الطور المتحرك : يتكون من مذيبين

← (A) ماء محمض (H_2O (0.2% *acid acetique*)

← (B) أسيتونتريل (*acetonitrile*).

والجدول (2.III) يوضح تغيرات نسبة الطور المتحرك Aو B بدلالة الزمن:

الجدول(2.III): تغيرات نسبة الطور المتحرك بدلالة الزمن

الزمن (*min*)	نسبة (A)	نسبة (B)
0.01	10	90
0.02	10	90
6.00	14	86
16.00	17	83
23.00	19	81
28.00	23	77
30.00	10	90
50.00	10	90

نقوم بحقن كل محلول من المحاليل القياسية في جهاز الكروماتوغرافيا السائلة العالية الاداء HPLC ،ثم نرسم المنحنى القياسي لتغير المساحة بدلالة التركيز لكل محلول قياسي.

والجدول (3.III) يوضح معادلات المنحنيات القياسية

الجدول(3.III): معادلات المنحنيات المحاليل القياسية

المحاليل القياسية	المعادلة	R^2
الكريستين	y = 548.0x - 2832	R^2 = 0.9960
حمض الغاليك	y = 23616x - 7232	R^2 = 0.99864
حمض الكافييك	y = 72328X	R^2 = 0.99864
حمض كلوروجينيك	y = 39775x - 1881	R^2 = 0.9983
الفانيلين	y = 82773x - 1423	R^2 = 0.99525

الروتين	$y = 24112.98x - 1060$	$R^2 = 0.99842$
حمض الاسكوربيك	$y = 211.7x + 1098$	$R^2 = 0.96144$

ب- تقدير المركبات المضادة للأكسدة في العينات:

نقوم بتحضير محلول ام ذو تركيز(1mg/ml) من عينات البروبوليس وحبوب اللقاح، ثم نمدد هاته المحاليل خمس مرات كي نحصل على تراكيز (200 µg/ml) في 80% ميثانول عالي النقاوة، نقوم بترشيح العينات ثم حقنها في جهاز الكروماتوغرافيا السائلة العالية الاداء HPLC.

قمنا بأخذ المنحنيات الكروماتوغرافيا للعينات و اسقاط المساحة المتحصل عليها لكل مركب على منحنى تغير مساحة كروماتوغرام كل مركب بدلالة التركيز.

المراجع:

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

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

[3]. C.W. Daniels et al./South African Journal of Botany 77 (2011) 711-717.

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

[5].P.Molyneux, song klana Karin J. sci technol., 26 (2004) 211-219.

[6]. AUBAKAR B.ALIYU, MOHAMMED A.IBRAHIM, ALIYU M.MUSA, AISHA O.MUSA, JOYCE J.KIPLIMO and ADEBAYO O.OYEWALE. FREE RADICAL SCAVENGING AND TOTAL ANTIOXIDANT CAPACITY OF ROOT EXTRACTS OF ANCHOMANES DIFFORMIS ENGL. (ARACEAE, Acta Poloniae Pharmaceutica- Drug Research, Vol. 70 No.1 pp. 115-121, 2013.

[7]. A.B. ALIYU, M.A.IBRAHIM, H. IBRAHIM, A.M. MUSA, A.LAWAL, Y. OSHANIMI, J.A, USMAN, M, ABDULKADIR, I.E, A.O, OYEWALE, J.O,

AMUPITAN, Free radical scavenging and total antioxidant capacity of methanol extract of Ethulia conyzoides growing in Nigeria Romanian Biotechnological Letters, Vol. 17, No. 4, 2012

[8]. P. PRIETO, M. PINEDA, R.ANGUILA, Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific application to the determination of Vitamin E. Anal. Biochem., 269, 337-341 (1999).

[9] R.M.C.**.**Dawson, D.C.Elliot, W.H.Elliot, , K.M Jones. Data for Biochemical Research, 3rd ed.,Oxford Science puble, 1986.

[10] . A. Francisco, F.Tomas-Barberan, et coll.(1990). High performance liquid chromatography, thin layer chromatography and ultra violet behaviour of flavone aglycone with unsubstituted rings . Phytochemistry. I. Anal, 44.

الفصل الرابع:

النتائج و المناقشة

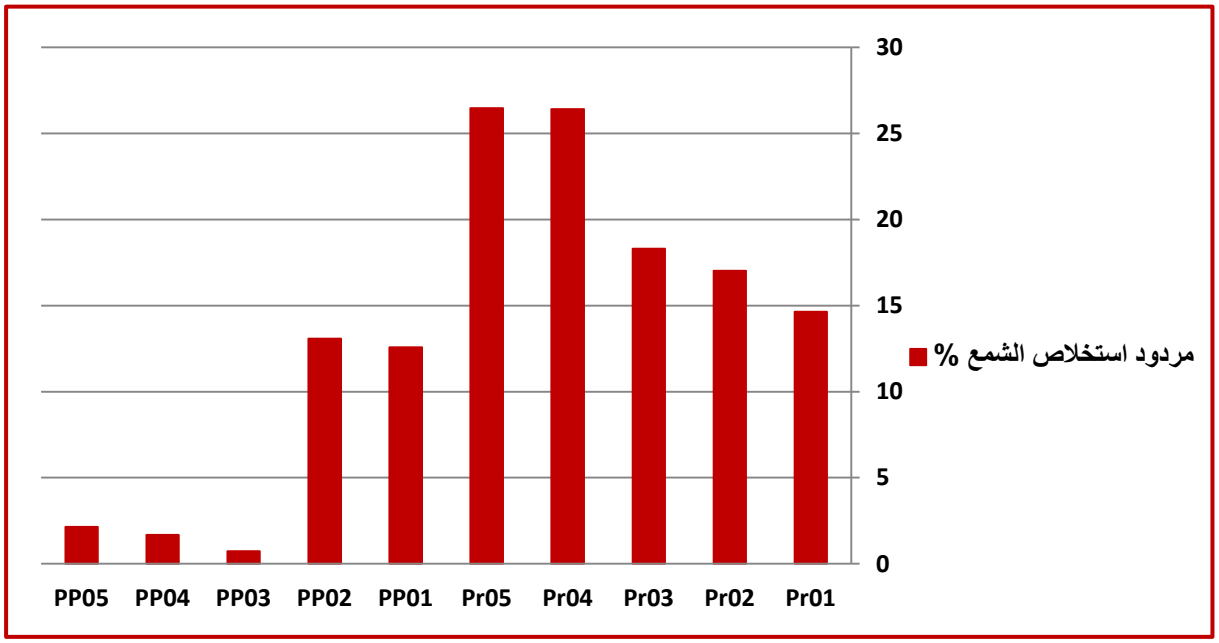
VI. النتائج و المناقشة:

1.VI. التقدير الكمي لمستخلصات عينات البروبوليس و حبوب اللقاح:

تم استخلاص العينات اعتمادا على طريقتين الاولى بجهاز سوكسلي بواسطة الميثانول و الثانية بحوض الامواج فوق الصوتية بواسطة الايثانول و تم حساب مردود الاستخلاص انطلاقا من $5g$ من الوزن الجاف لعينات البروبوليس و حبوب اللقاح:

الجدول (1.VI): نتائج مردود المستخلص الايثري (الشمع) للبروبوليس وحبوب اللقاح

العينات	مردود الاستخلاص%
Pr01	14.639
Pr02	17.018
Pr03	18.300
Pr04	26.412
Pr05	26.470
PP01	12.580
PP02	13.077
PP03	0.739
PP04	1.680
PP05	2.149



المنحنى (1.VI): نتائج مردود المستخلص الايثري (الشمع) للبروبوليس وحبوب اللقاح

يتضح من خلال المنحنى (1.VI) أن مردود استخلاص الشمع بواسطة ايثر بترول يتغير من عينة لأخرى، حيث نلاحظ ان اكبر مردود نتحصل عليه في العينة Pr05 والذي بلغ 26.47 % بالنسبة لعينات البروبوليس، اما بالنسبة لعينات حبوب اللقاح فنلاحظ أن أكبر مردود نحصل عليه عند العينة PP02 والذي بلغ 13.077% .

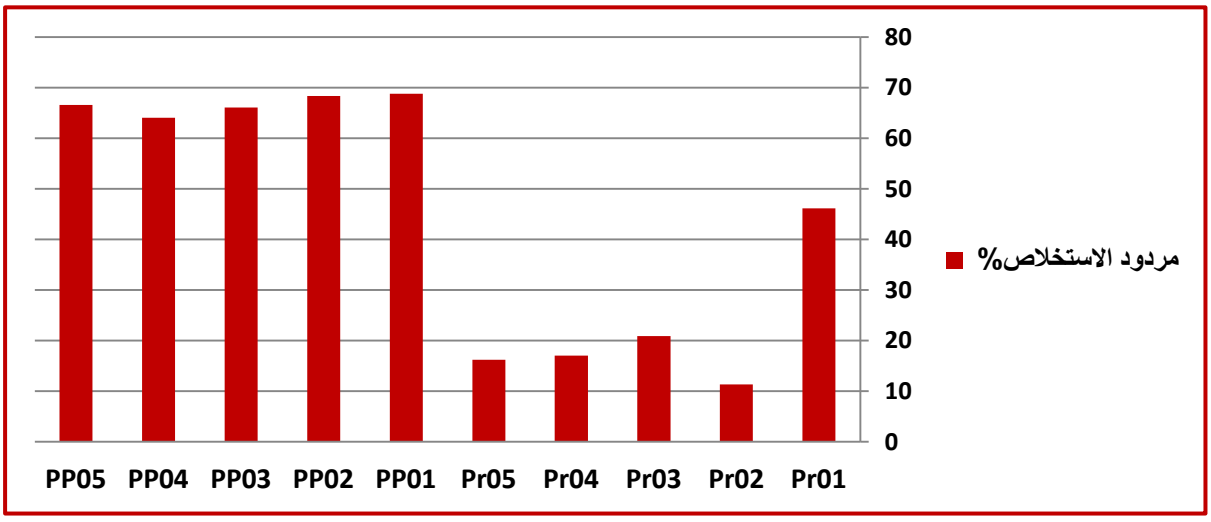
كما نلاحظ ان مردود الاستخلاص لعينات البروبوليس اكثر من مردود الاستخلاص لعينات حبوب اللقاح.

الجدول (2.VI): نتائج مردود المستخلص الايثانولي لعينات البروبوليس

العينات	مردود الاستخلاص%
Pr01	**46.100**
Pr02	**11.3**
Pr03	**20.880**
Pr04	**17.020**
Pr05	**16.220**

الجدول (3.VI): نتائج مردود المستخلص الميثانولي لعينات حبوب اللقاح بسوكسلي

العينات	مردود الاستخلاص%
PP_1	68.797
PP_2	68.300
PP3	66.025
PP4	64.003
PP5	66.543



المنحنى (2.VI): نتائج مردود المستخلص الايثانولي و الميثانولي للبروبوليس وحبوب اللقاح

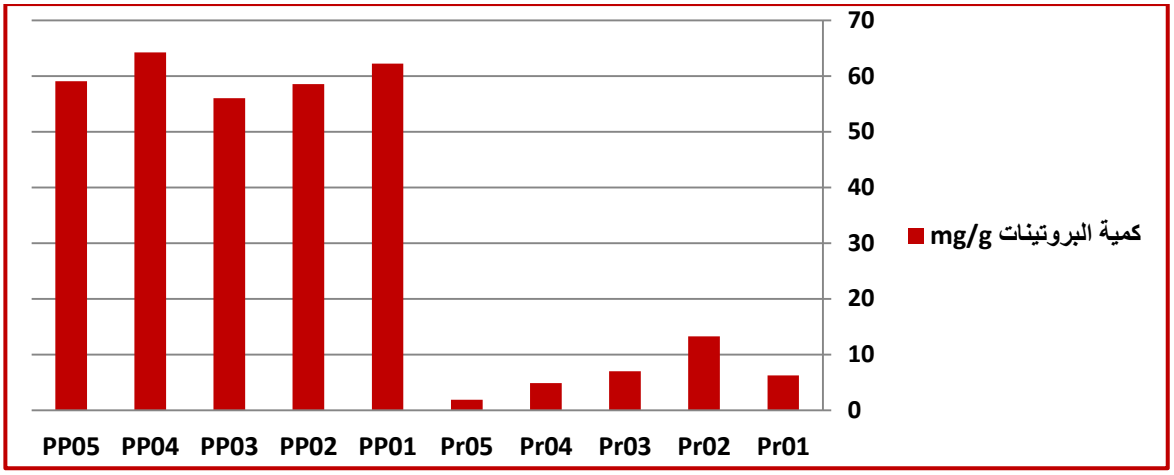
يتضح من خلال المنحنى (2.VI) أن مردود الاستخلاص يتغير من عينة لأخرى، ومن طريقة لأخرى، بالنسبة لطريقة الاستخلاص بحوض الامواج الفوق صوتية لعينات البروبوليس نلاحظ ان اكبر مردود نتحصل عليه في العينة Pr03 والذي بلغ 46.1 % ،اما بالنسبة لطريقة الاستخلاص صلب- سائل بسوكسلي لعينات حبوب اللقاح نلاحظ أن أكبر مردود نحصل عليه عند العينة PP01 والذي بلغ 68.79%.

نلاحظ ان مردود الاستخلاص لعينات حبوب اللقاح اكثر من مردود الاستخلاص لعينات البروبوليس، و هذا نظرا لاختلاف طريقة الاستخلاص و نوع المذيب بالاضافة الى طبيعة العينات.

2.VI. مقارنة كمية البروتينات في مستخلصات البروبوليس وحبوب اللقاح:

الجدول (4.VI): كمية البروتينات في مستخلصات البروبوليس وحبوب اللقاح.

العينات	كمية البروتينات mg/g	SD
Pr01	6,249	0.002±
Pr02	13,252	0.826±
Pr03	6,989	0.717±
Pr04	4,882	1.468±
Pr05	1,863	0.094±
PP01	62,232	2.391±
PP02	58,567	1.833±
PP03	56,032	0.956±
PP04	64,261	0.159±
PP05	59,076	1.913±



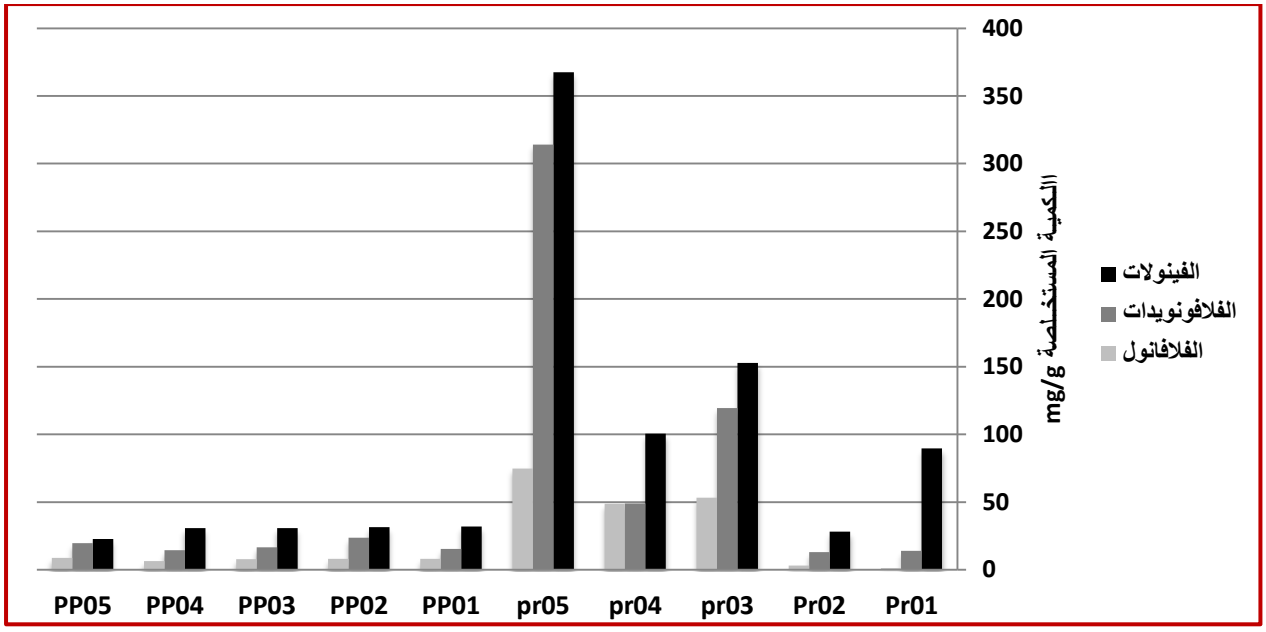
المنحنى (3.VI): كمية البروتينات في مستخلصات البروبوليس وحبوب اللقاح.

اظهرت النتائج الموضحة في الجدول (4.VI) ان مستخلصات البروبوليس تحوي على كمية من البروتينات تراوحت بين (1-13*mg/g*) ،ونلاحظ ان اكبر كمية كانت في العينة Pr02 وهاذا راجع الى تنوع الغطاء النباتي.اما في مستخلصات حبوب اللقاح فنلاحظ انها غنية بالبروتينات حيث تراوحت كميتها بين (*64 mg/g* -56).

3.VI. مقارنة كمية الفينولات لمختلف المستخلصات:

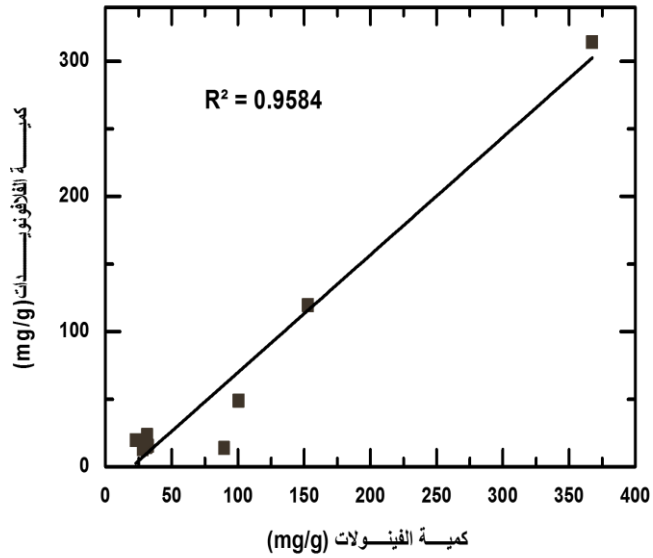
الجدول (5.VI): كمية الفينولات في عينات مستخلصات البروبوليس وحبوب اللقاح

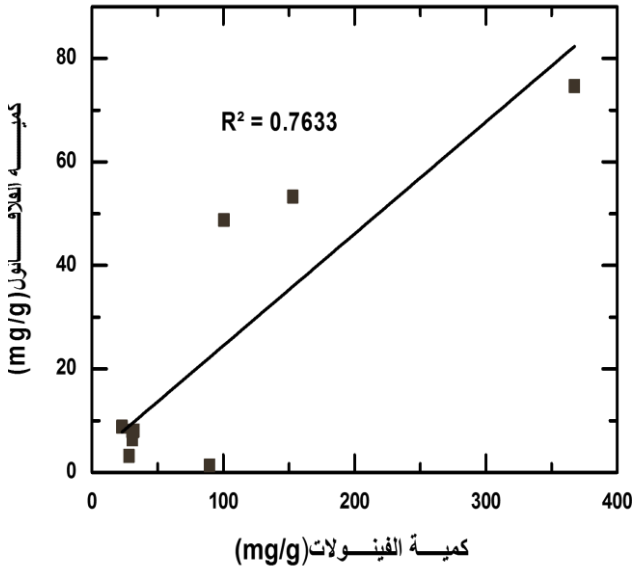
العينات	كمية الفينولات *(mg/g)*	SD	كمية الفلافونويدات *(mg/g)*	SD	كمية الفلافانول *(mg/g)*	SD
Pr01	89.572	1.640±	13.883	0.261±	1.278	2.357±
Pr02	28.163	0.678±	13.034	0±	3.187	0.596±
Pr03	152.864	4.797±	119.444	0.254±	53.298	2.499±
Pr04	100.525	1.131±	49.015	1.411±	48.749	2.857±
Pr05	367.39	3.679±	314.073	3.717±	74.658	1.14±
PP01	32	2.107±	15.39	0±	8.049	0.164±
PP02	31.5	1.899±	23.55	2.474±	7.966	1.202±
PP03	30.7	0.494±	16.65	0.494±	7.883	0.353±
PP04	30.8	1.782±	14.35	0.989±	6.3495	0.565±
PP05	22.8	0.919±	19.65	0.859±	8.833	0.447±



المنحنى (4.VI): مقارنة بين كمية الفينولات في عينات مستخلصات البروبوليس وحبوب اللقاح

اظهرت النتائج الموضحة في المنحنى (4.VI) ان مستخلصات البروبوليس و حبوب اللقاح غنية بالمركبات البولي فينولية، حيث نلاحظ ان كمية البولي فينول في مستخلص العينة Pr05 اكثر بالنسبة لعينات البروبوليس حيث تتراوح كمية الفينولات بين (367-28*mg/g*) وكمية الفلافينويدات بين(314-13*mg/g*) اما كمية الفلافانول فتتراوح بين (- 74 1*mg/g*)، اما بالنسبة لمستخلصات حبوب اللقاح فنلاحظ ان كمية الفينولات متقاربة حيث تتراوح كمية الفينولات بين (32-22*mg/g*) وكمية الفلافينويدات بين(23-14*mg/g*)، اما كمية الفلافانول فتتراوح بين (8-6*mg/g*).





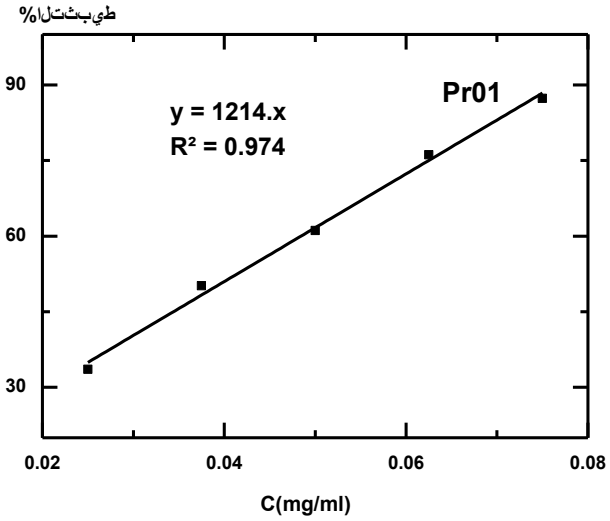
المنحنى (5.VI): علاقة الارتباط بين كمية الفينولات والفلافونويدات في المستخلصات

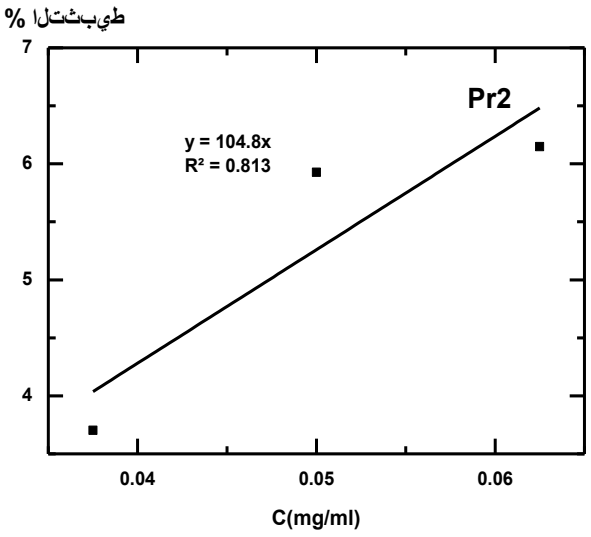
المنحنى (6.VI): علاقة الارتباط بين كمية الفينولات والفلافانول في المستخلصات

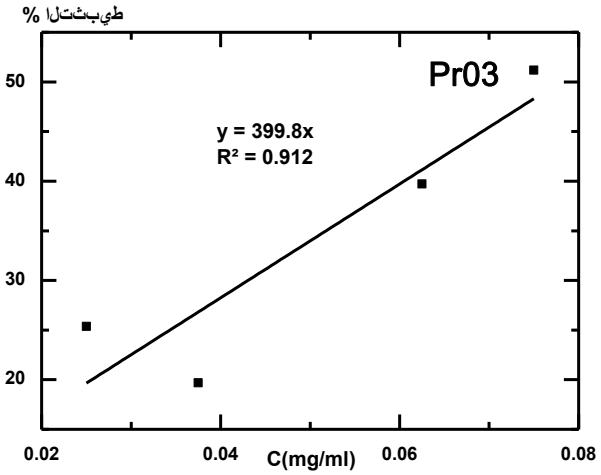
من خلال المنحنى (5.VI) يظهر جليا قوة الترابط بين نتائج كمية الفلافونويدات وكمية الفينولات حيث بلغت قوة الترابط ($R^2 = 0,958$) ، بينما في المنحنى (6.VI) نلاحظ ان قوة الترابط بين كمية الفلافانول وكمية الفينولات اقل من قوة الترابط بين كمية الفلافونويدات وكمية الفينولات حيث بلغت قوة الترابط ($R^2 = 0,76$)

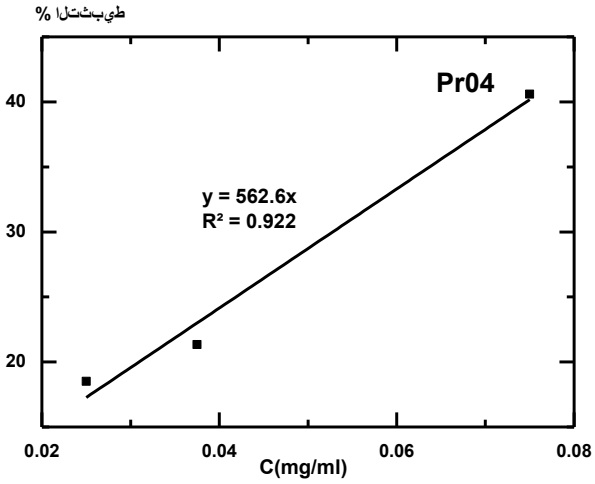
4.VI. تقدير اجمالي فعالية المواد المضادة للأكسدة بالطريقتين اختبار DPPH واختبار الموليبدات:

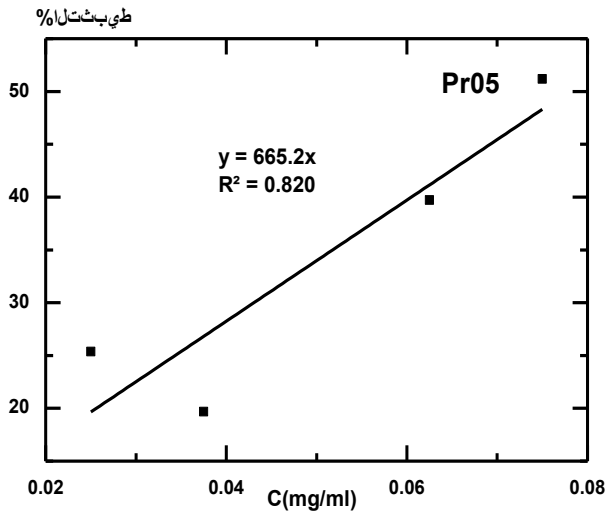
1.4.VI. مقارنة فعالية مضادات الاكسدة لاختبار DPPH في مختلف المستخلصات:

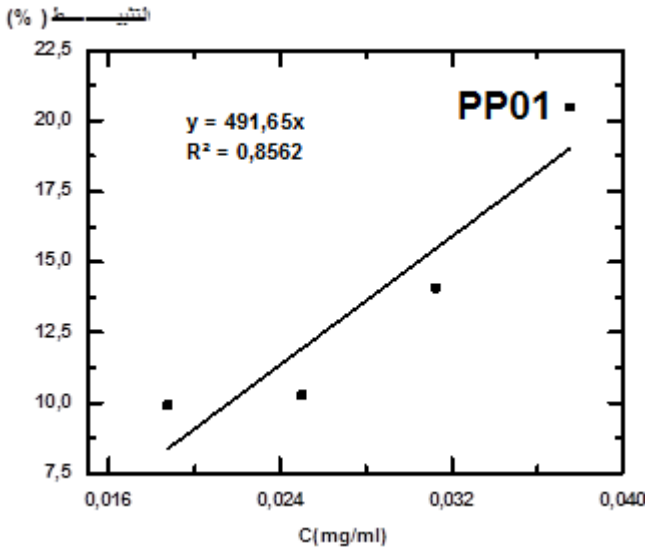


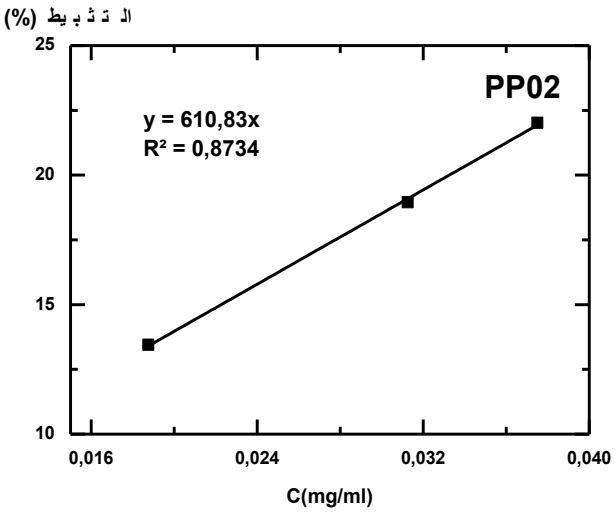


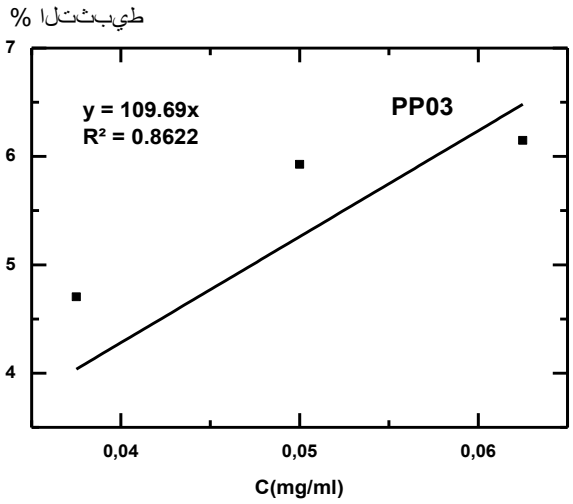

% التثبيط
Pr03
y = 399.8x
R² = 0.912
50
40
30
20
0.02
0.04
C(mg/ml)
0.06
0.08

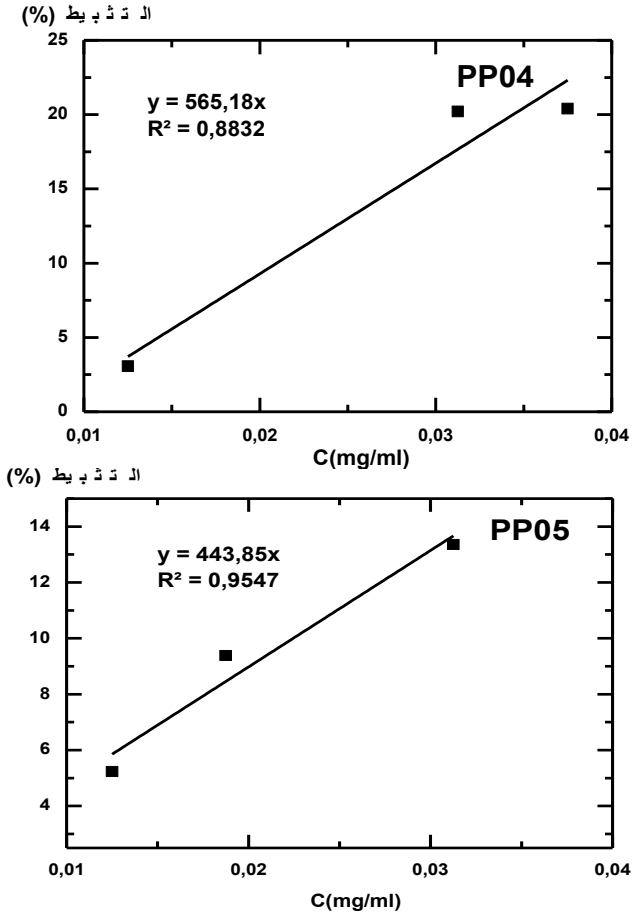

% التثبيط
Pr04
y = 562.6x
R² = 0.922
40
30
20
0.02
0.04
C(mg/ml)
0.06
0.08


%التثبيط
Pr05
y = 665.2x
R² = 0.820
50
40
30
20
0.02
0.04
0.06
0.08
C(mg/ml)


التثبيط (%)
PP01
y = 491,65x
R² = 0,8562
22,5
20,0
17,5
15,0
12,5
10,0
7,5
0,016
0,024
0,032
0,040
C(mg/ml)


الـ تـ ثـ بـ يـ ط (%)
PP02
y = 610,83x
R² = 0,8734
25
20
15
10
0,016
0,024
0,032
0,040
C(mg/ml)

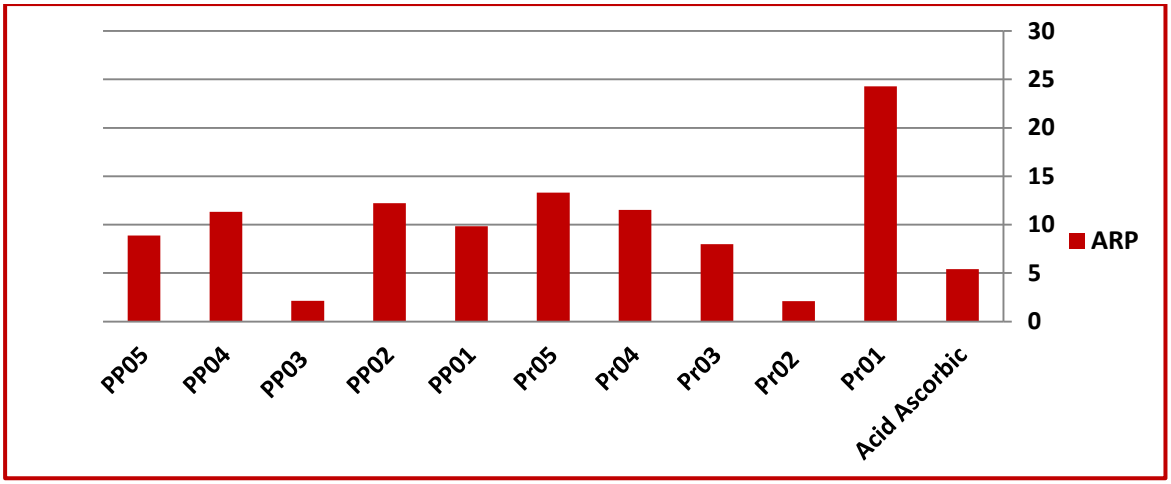

% التثبيط
PP03
y = 109.69x
R² = 0.8622
7
6
5
4
0,04
0,05
0,06
C(mg/ml)



المنحنى (7.VI): إختبار DPPH لمستخلصات عينات البروبوليس وحبوب اللقاح

الجدول (6.VI): نتائج إختبار DPPH لكل من مستخلصات ولحمض الأسكوربيك

ARP	قيم IC_{50} بـ g/l	
5.421	0.184	حمض الأسكوربيك
24.283	0.041	**Pr1**
2.096	0.477	**Pr2**
7.996	0.125	**Pr3**
11.520	0.088	**Pr4**
13.304	0.075	**Pr5**
9.832	0.101	**PP1**
12.217	0.081	**PP2**
2.137	0.467	**PP3**
11.312	0.088	**PP4**
8.876	0.112	**PP5**



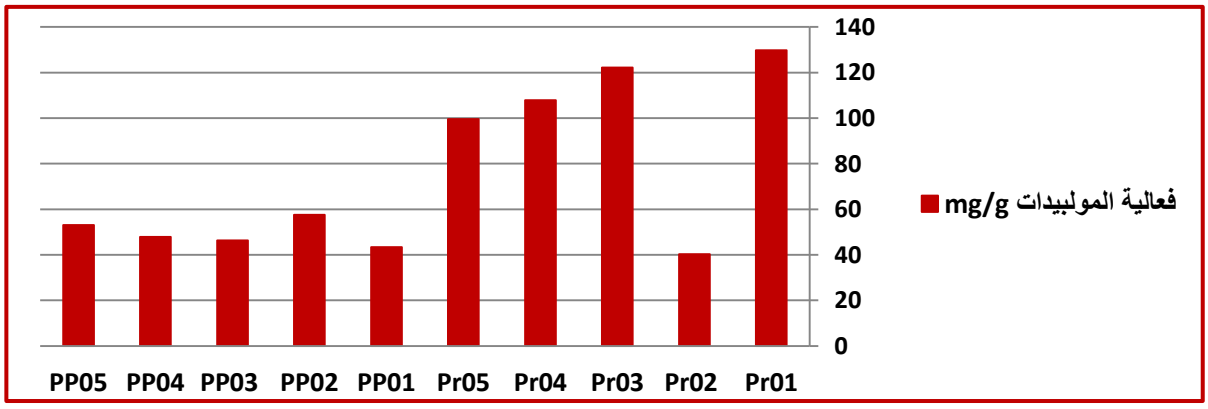
المنحنى (8.VI): نتائج إختبار DPPH لكل من مستخلصات العينات وحمض الأسكوربيك

يتضح من خلال المنحنى (8.VI) أن الفعالية المضادة للأكسدة لمستخلصات البروبوليس وحبوب اللقاح أقوى من فعالية حمض الأسكوربيك عدا عينة البروبوليس Pr2 وعينة حبوب اللقاح PP03 ،حيث بلغت الفعالية في العينات المدروسة أضعاف قوة حمض الأسكروبيك وذلك اعتمادا على أن كلما نقصت قيمة IC_{50} زادت الفعالية المضادة للأكسدة للمستخلص او بقيمة (ARP) التي تزيد بزيادة الفعالية .

2.4.VI.مقارنة فعالية مضادات الاكسدة لاختبار المولبيدات في مختلف المستخلصات:

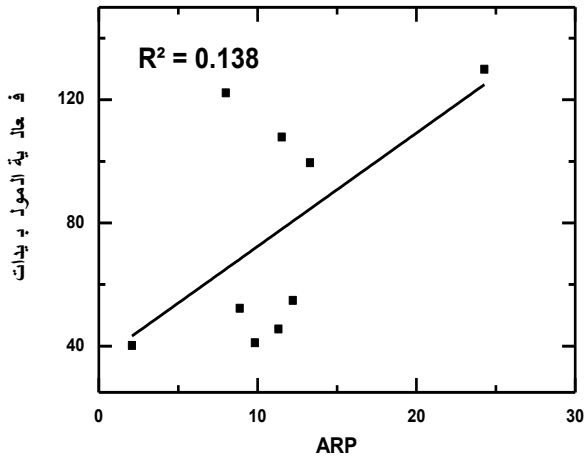
الجدول (7.VI): فعالية المولبيدات في مستخلصات البروبوليس وحبوب اللقاح.

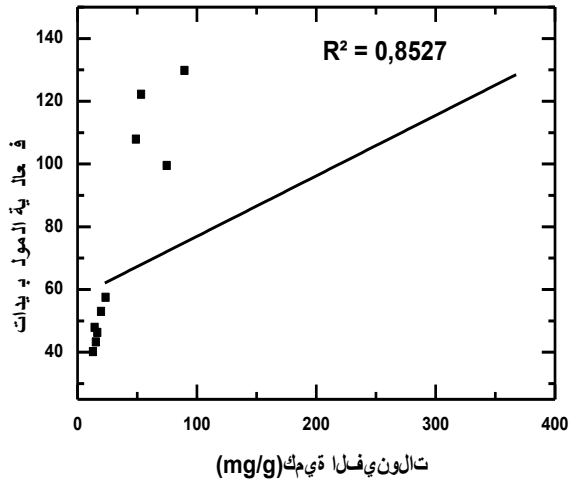
	البروبوليس					حبوب اللقاح				
العينات	Pr01	Pr02	Pr03	Pr04	Pr05	PP01	PP02	PP03	PP04	PP05
فعالية المولبيدات *(mg/g)*	129.8	40.2	122.2	107.9	99.5	43.3	57.5	46.3	47.9	53
SD	2.54±	0.09±	1.18±	0.003±	3.64±	3.18±	3.73±	1.27±	1.66±	0.49±



المنحنى (9.VI): نتائج إختبار المولبيدات لمستخلصات العينات

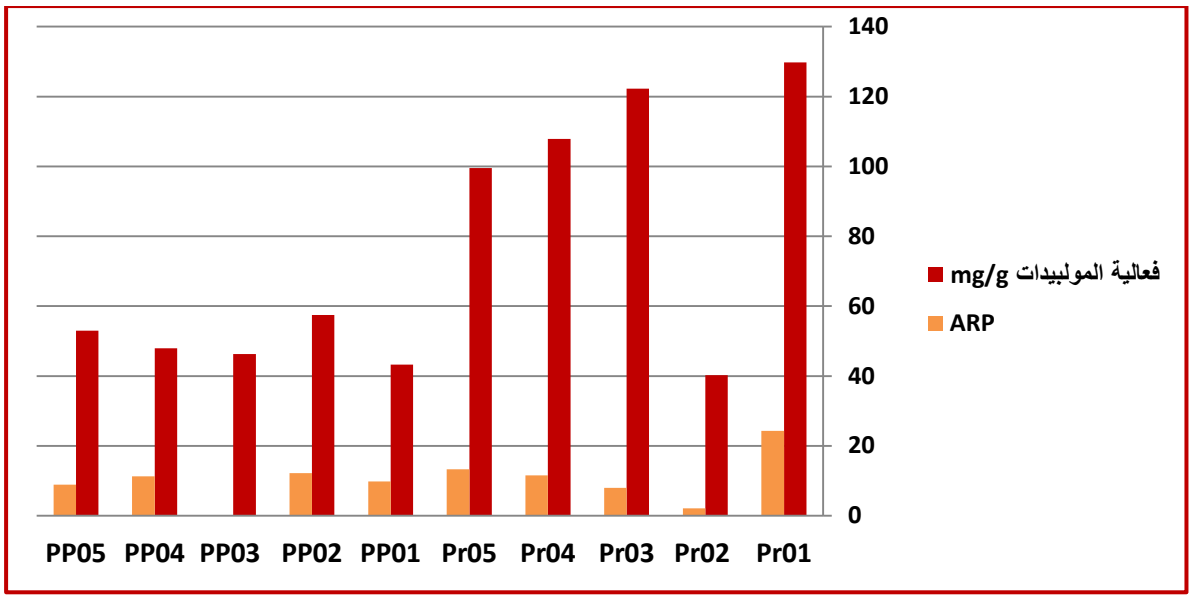
يتضح من خلال المنحنى (10.VI) ان فعالية المولبيدات في مستخلصات البروبوليس تتراوح بين (40-129 mg/g) حيث نلاحظ ان العينة Pr01 هي اكبر فعالية ،اما في مستخلصات حبوب اللقاح العينة PP02هي اكبر فعالية حيث تتراوح فعالية المولبيبدات بين (43-57 mg/g).





المنحنى (10.VI): علاقة الارتباط بين فعالية المولبيدات و ARPفي المستخلصات

المنحنى (11.VI): علاقة الارتباط بين المولبيدات وكمية الفينولات في المستخلصات



المنحنى (12.VI): مقارنة بين نتائج اختبار المولبيدات واختبار DPPH.

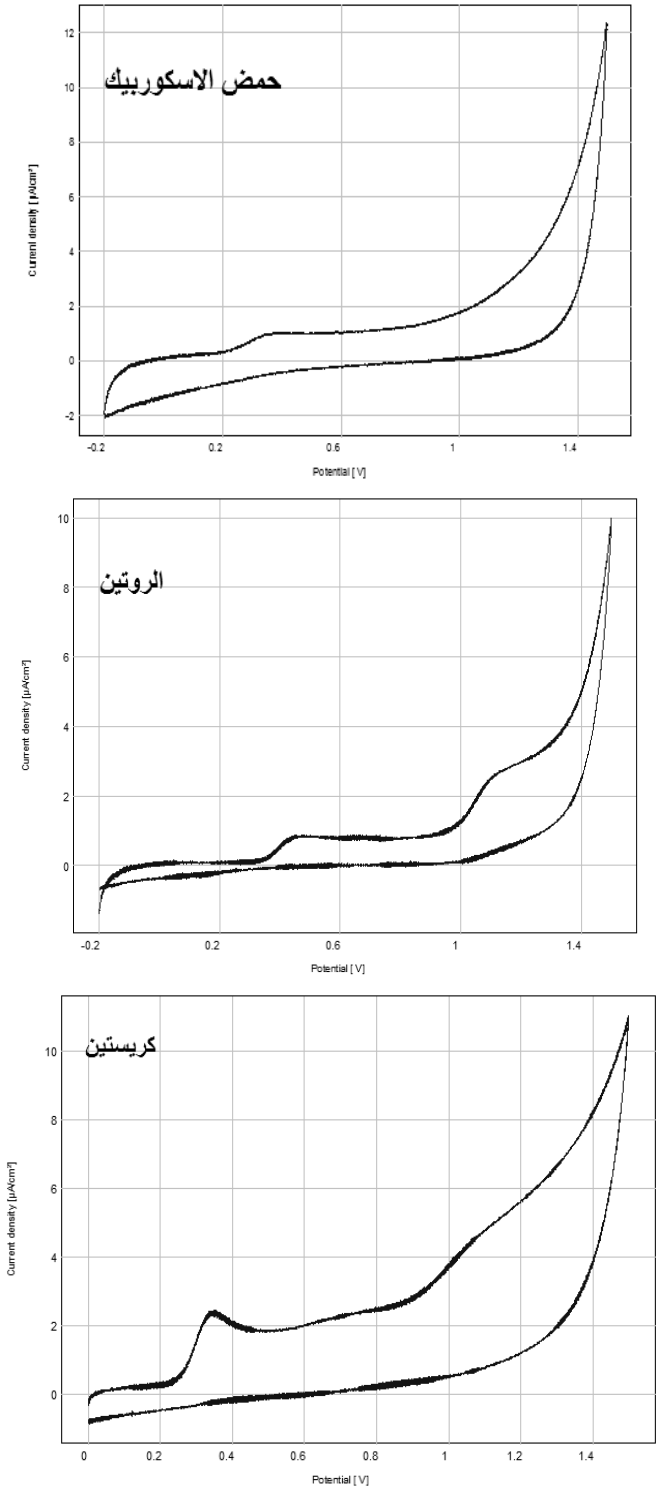
من خلال المنحنى (10.VI) يظهر جليا ضعف الترابط بين نتائج اختبار DPPH واختبار المولبيدات حيث لم تتجاوز($R^2 = 0.138$) وهاذا راجع لاختلاف الوسطين حيث الأول يتم في وسط عضوي و الثاني يتم في وسط مائي و هذا يحول دون تطابق نتائج الاختبارين، كما يفسر ايضا الفرق بين النتائج في المنحنى (12.VI).

بينما نلاحظ من المنحنى (11.VI) ان هناك علاقة ترابط اقوى بين فعالية المولبيدات وكمية الفينولات في المستخلصات حيث بلغ ($R^2 = 0.85$)، و منه نستطيع ان نقول ان الفعالية المضادة للأكسدة ليست مرتبطة بكمية الفينولات بشكل مطلق بقدر ماهي مرتبطة بنوعية و بنية الجزيئات و طبيعة الوسط الذي اجري فيه الاختبار.

5.VI. الدراسة الكهروكيميائية لمضادات الاكسدة:

1.5.VI. دراسة السلوك الكهروكيميائي لبعض المركبات الفينولية:

تم الحصول على المنحنيات التالية بالطريقة الفولتامترية الحلقية لـ(100 µl)من المركبات القياسية:



المنحنى (13.VI): المنحنيات القياسية بالفولتاميترية الحلقية

pH=4، سرعة المسح 50 mV/s.

نلاحظ في المنحنى (13. VI) ان لدى حمض الاسكوربيك لديه نتوء وحيد على غرار الروتين والكرسيتين نتوءان مصعديان و لا وجود لنتوء مهبطي و يدل هذا على أن أكسدتها في هذه الشروط هي تفاعل غير عكوس و نستطيع من هذا المنحنى معرفة قيمة I_{P1}، I_{P2} و E_{P1}، E_{P2} للقمتين PIC_1، PIC_2 كما هو موضح في الجدول التالي :

الجدول (8.VI): الخصائص الكهروكيميائية للمركبات المضادة للاكسدةالقياسية.

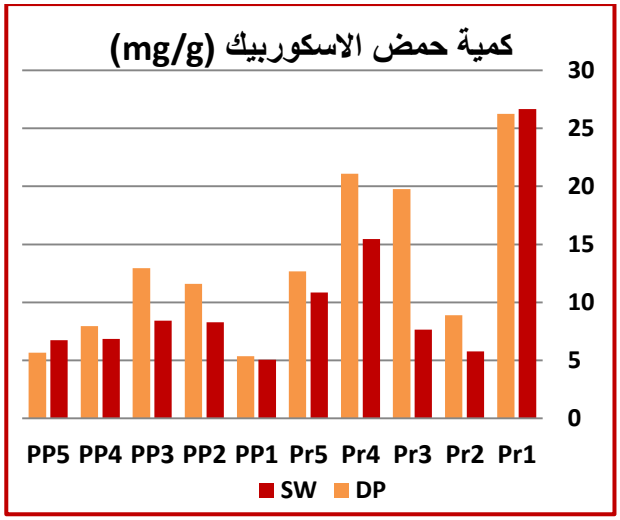
pic1		pic2		
E_{p1}(v)	I_{p1}(µa/cm^2)	E_{p2}(v)	I_{p2}(µa/cm^2)	
0.346	2.347	0.866	2.688	**كريسيتين**
1.087	0.776	1.07	2.469	**الروتين**
0.355	1.047	-	-	**حمض الاسكوربيك**

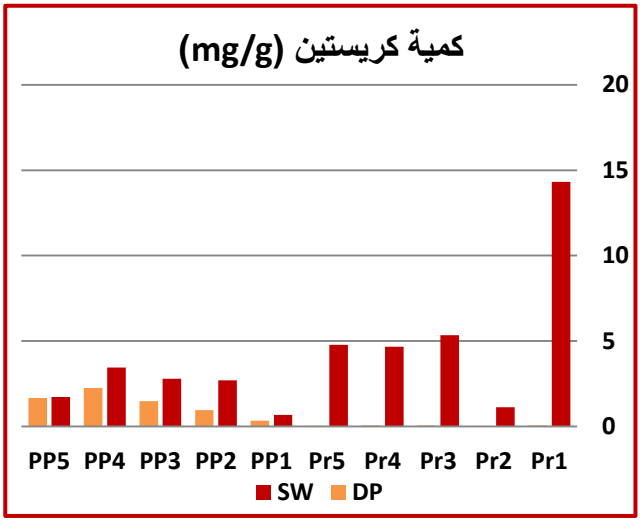
5.VI .2 التقدير الكمي لمضادات الاكسدة في العينات المدروسة:

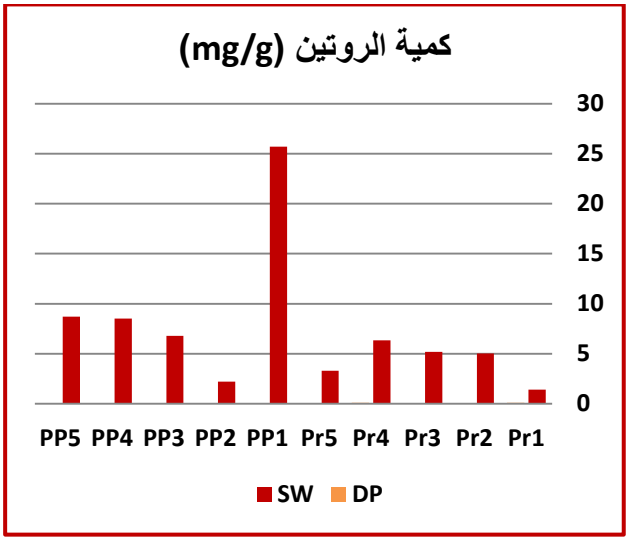
انطلاقا من منحنيات المركبات القياسية نتحصل على الجدول التالي الذي يوضح كمية مضادات الاكسدة في مستخلصات البروبوليس وحبوب اللقاح بطريقة فولتامتري الموجة المربعة وطريقة فولتامتري النبض التفاضلي :

الجدول (9.VI): كمية مضادات الاكسدة في مستخلصات البروبوليس وحبوب اللقاح.

كمية الروتين في العينة(mg/g)		كمية كريستين في العينة(mg/g)		كمية حمض الاسكوربيك في العينة(mg/g)		
SW	**DP**	**SW**	**DP**	**SW**	**DP**	**العينة**
1.3998	0.082	14.3125	0.053	26.675	26.239	**Pr1**
5.02824	0.037	1.11875	0.024	5.7792	8.884	**Pr2**
5.1817	0.070	5.3325	0.046	7.6473	19.762	**Pr3**
6.348	0.074	4.65875	0.048	15.45305	21.084	**Pr4**
3.2784	0.048	4.77375	0.031	10.846	12.657	**Pr5**
25.706	0.027	0.668	0.342	5.0655	5.3615	**PP1**
2.2025	0.045	2.706	0.949	8.2914	11.594	**PP2**
6.784	0.050	2.79233	1.485	8.4279	12.9545	**PP3**
8.497	0.055	3.4473	2.247	6.8449	7.944	**PP4**
8.7119	0.051	1.72366	1.672	6.7358	5.651	**PP5**







المنحنى (14.VI): مقارنة كمية مضادات الاكسدة في المستخلصات بين طريقة فولتامتري الموجة المربعة و طريقة فولتامتري النبض التفاضلي .

من المنحنى (14.VI) نلاحظ ان نتائج كمية الكريسيتين والروتين بطريقة فولتامتري الموجة المربعة اكبر من طريقة فولتامتري النبض التفاضلي في مستخلصات العينات، اما حمض الاسكوربيك فكانت بالطريقتين فولتامتري الموجة المربعة و فولتامتري النبض التفاضلي

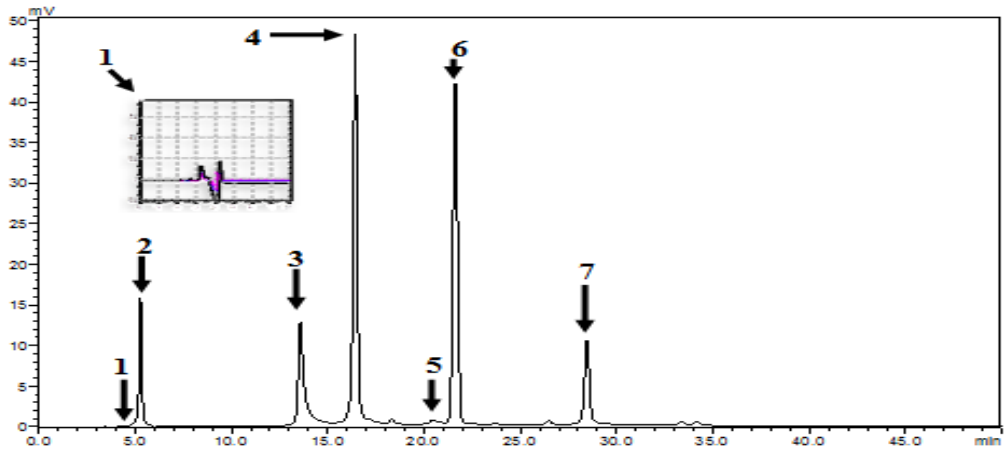
بكميات كبيرة ومتقاربة في جميع المستخلصات، حيث نلاحظ ان اكبر كمية لمضادات الاكسدة كانت في العينة Pr1 في مستخلصات البروبوليس اما بالنسبة لمستخلصات حبوب اللقاح فكانت كمية حمض الاسكوربيك اكبر في العينة PP3 وكمية الكرسيتين اكبر في العينة PP4 ،اما كمية الروتين فكانت كبير في العينة PP1.

6.VI.التقدير الكمي للمواد المضادة للاكسدة بطريقة الكروماتوغرافيا السائلة ذات الكفاءة العالية (HPLC):

الجدول التالي يوضح زمن ظهور لكل مركب قياسي (t_r) في جهاز كروماتوغرافيا السائلة ذات الكفاءة العالية (HPLC):

الجدول (10.VI): زمن ظهور للمركبات القياسية (t_r)

	المركبات القياسية	زمن ظهور المركب القياسي t_r(min)
1	حمض الاسكوربيك	4.21
2	حمض الغاليك	5.23
3	حمض الكلوروجينيك	13.62
4	حمض الكافييك	16.3
5	كريسيتين	20.37
6	الفانيلين	21.46
7	الروتين	28.22



الشكل (1.VI): كروماتوغرام المحاليل القياسية

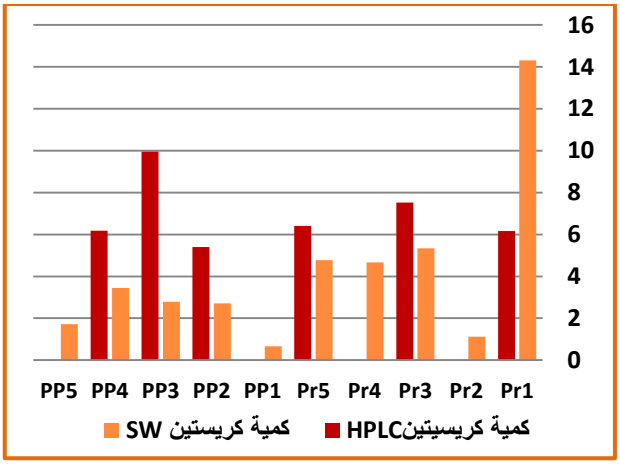
الجدول (11.VI): كمية مضادات الاكسدة في المستخلصات البروبوليس وحبوب اللقاح.

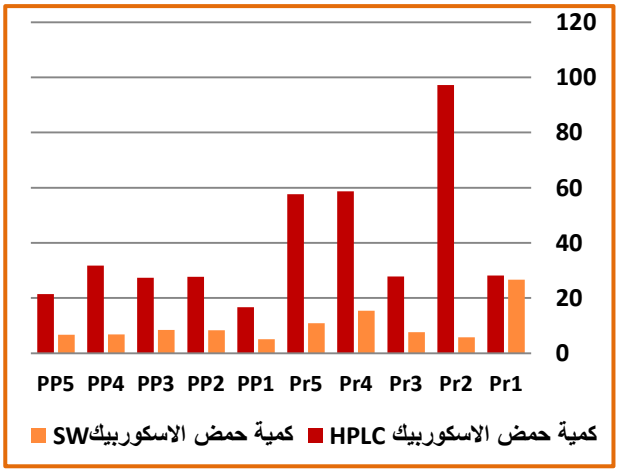
كمية مضادات الاكسدة في المستخلصات بـ (mg/g)								
العينات	**كريسيتين**	**حمض الغاليك**	**حمض الاسكوربيك**	**الفانيلين**	**الروتين**	**حمض كلوروجينيك**	**حمض الكافييك**	**المجموع**
Pr01	6.17	0.44	28.129	0.056	0.1228	0.148	7.128	42.19

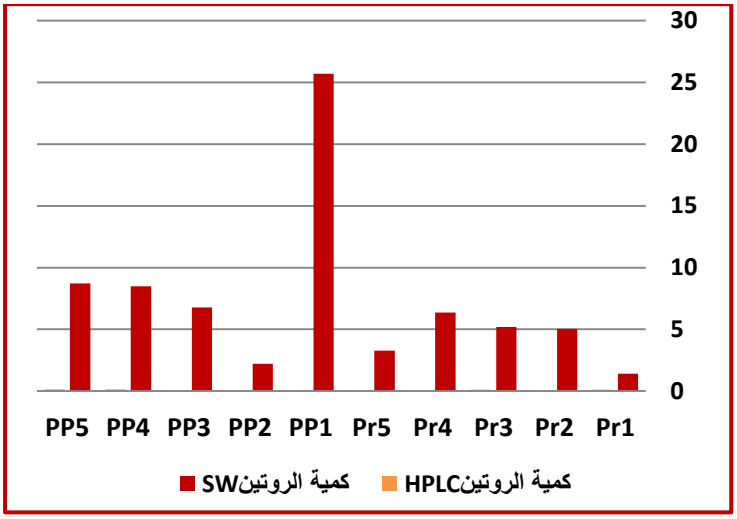
97.77	0.043	0.05219	0.057	0.0288	97.203	0.387	**ND**	**Pr02**
39.78	3.805	0.1018	0.123	0.041	27.779	0.407	7.528	**Pr03**
60.54	1.6832	0.094	0.067	**ND**	58.705	**ND**	**ND**	**Pr04**
69.27	4.75	0.0709	0.059	0.025	57.633	0.328	6.405	**Pr05**
26.42	9.287	**ND**	**ND**	0.0187	16.712	0.406	**ND**	**PP01**
33.53	0.042	**ND**	0.0767	0.0187	27.675	0.321	5.405	**PP02**
10.45	0.0356	**ND**	0.0541	0.048	27.30	0.353	9.961	**PP03**
6.68	0.027	**ND**	0.1354	0.023	31.755	0.324	6.177	**PP04**
0.506	0.0247	**ND**	0.141	**ND**	21.426	0.34	**ND**	**PP05**

يتضح من خلال الجدول (11.VI) حمض الاسكوربيك الاكثر تواجدا في مستخلصات البروبوليس وحبوب اللقاح يليه الكرسيتين والروتين وحمض الكافييك ثم الفانيلين، اما حمض كلوروجينيك فلم يظهر في مستخلصات حبوب اللقاح.

نلاحظ ان كمية الكرسيتين وحمض الغاليك والفانيلين والروتين اكثر تواجدا في العينة Pr03، اما حمض كلوروجينيك وحمض الكافييك فكانت اكبر كمية في العينة Pr01 وحمض الاسكوربيك اكثر تواجدا في العينة Pr02 بالنسبة لمستخلصات البروبوليس، اما بالنسبة لمستخلصات حبوب اللقاح نلاحظ ان كمية الكرسيتين وحمض الاسكوربيك والفانيلين اكثر تواجدا في العينة PP03، اما الروتين وحمض الكافييك فكانت اكبر كمية في العينة PP01،PP05 على التوالي.







المنحنى (15.VI): مقارنة كمية مضادات الاكسدة في المستخلصات بين طريقة فولتامتري الموجة المربعة وHPLC

من خلال منحنيات المقارنة بين كميات المواد المضادة للأكسدة المقدرة بالطرق الكهروكيميائية وكميات بعض المركبات المقدرة بالكروماتوغرافيا السائلة (HPLC) نجد في اغلب الاحيان ان الكميات المقدرة بالطرق الكهروكيميائية اكبر من الكميات المقدرة بالطرق الكروماتوغرافيا و يرجع ذلك لعدة اسباب منها:

ان الكميات الزائدة في تقدير الطرق الكهروكيميائية هي كميات المواد المضادة للاكسدة التي تشابه في خصائصها الكهروكيميائية المركب القياسي الذي اتخذ كمرجع، فيمكن التعبير عن هاته الكميات كمايلي:

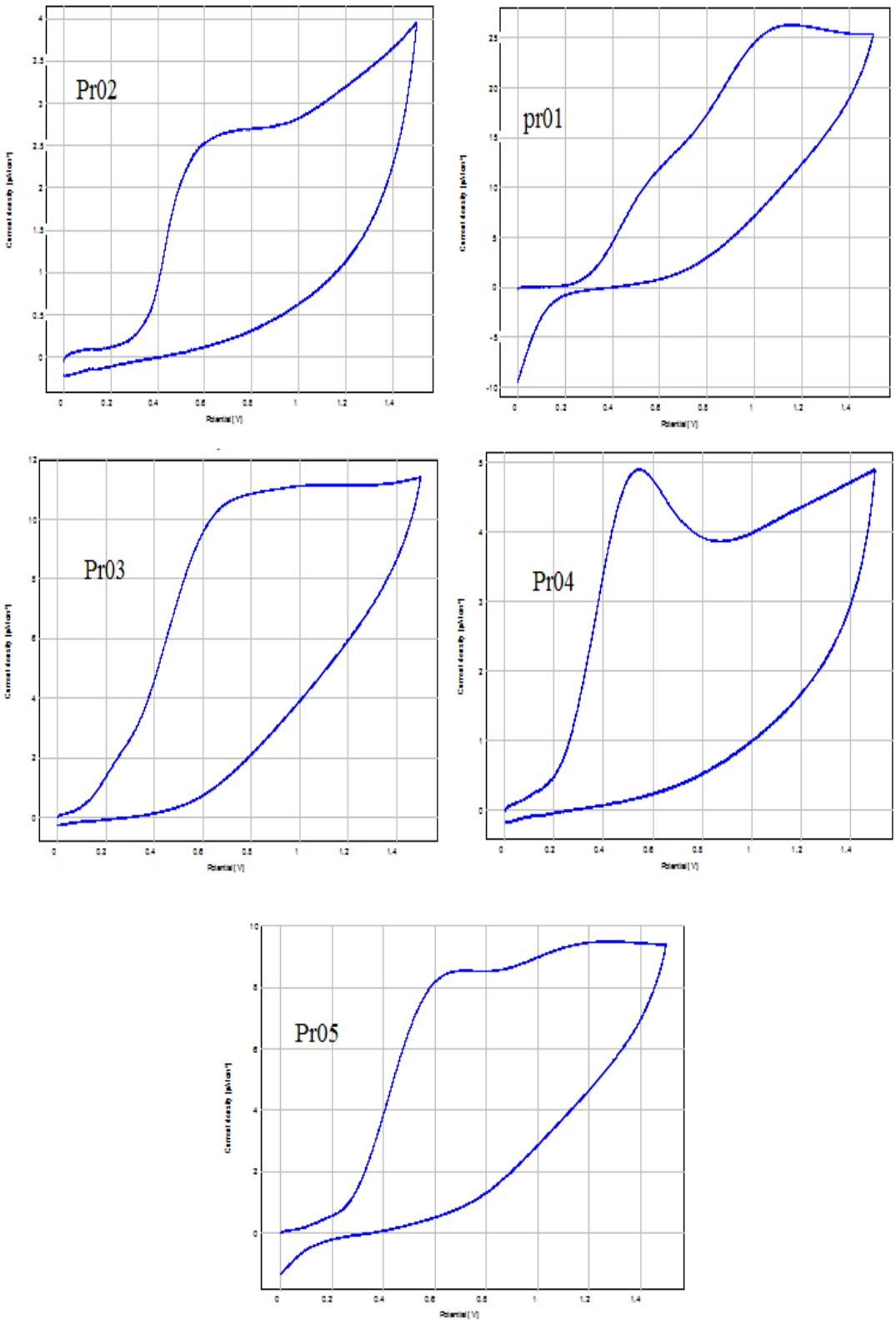
[(كمية المركب القياسي)$_{HPLC}$ +المركبات الفينولية المشابه له]= [كمية المواد المضادة للأكسدة]$_{SWV}$

كما يمكن ان يكون الفارق في الكمية هي المركبات التي لم يتم تقديرها بالطريقة الكروماتوغرافيا فالمركبات القياسية لدينا ستة فقط و من المعلوم ان المنتجات المدروسة تحتوي على عدد هائل من هذه المركبات تتجاوزها بعشرات او مئات المرات لذلك فنتائج التقدير في الكهروكيمياء اكبر.

الطرق الكهروكيميائية في هاته الحالة تصلح كطريقة للتحليل الكمي للمركبات المتاشبه في خصائصها الكهروكيميائية كمون الاكسدة و الارجاع، اما الكروماتوغرافيا السائلة فهي تعتمد على اكثر من خاصية فهي تعتمد علي حجم الجزيئة وقطبتها و طول موجة الامتصاص الاعظمي λ ، هذه الخصائص تجعلها اكثر انتقائية خاصة من ناحية التحليل الكيفي و بالتالي تقدير كل مركب على حدى.

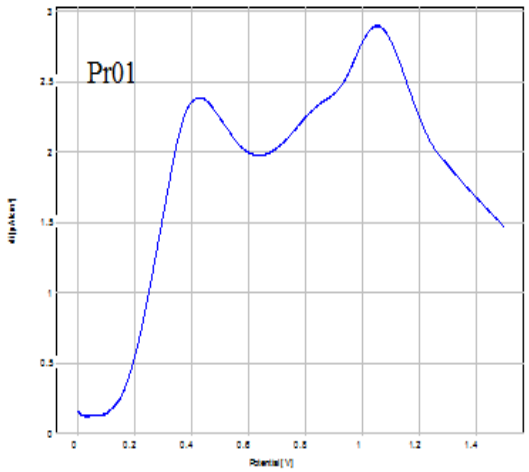
الملحق

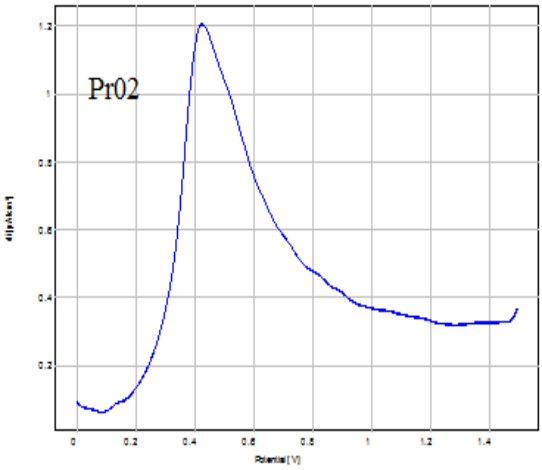
الملحق A:

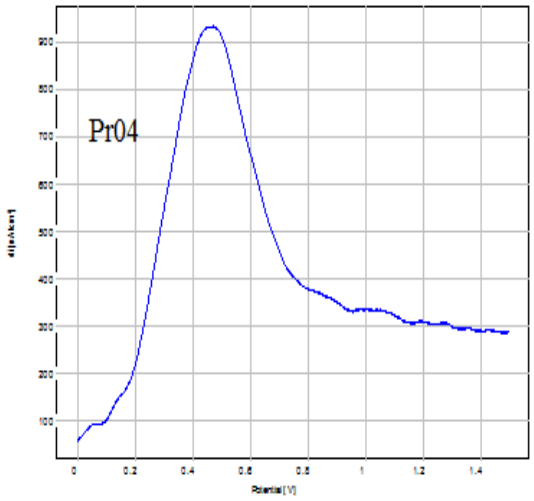


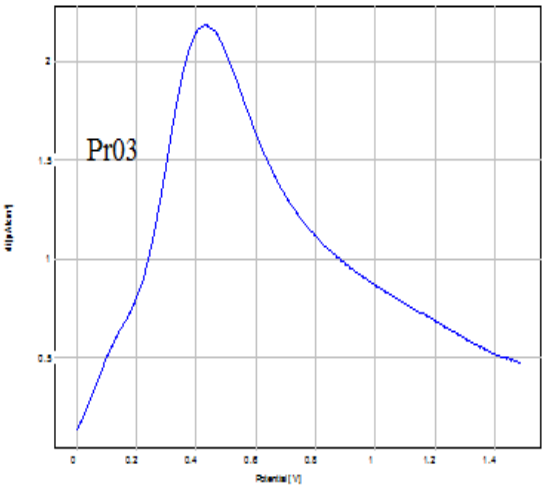
المنحنى(1.A): المنحنيات الفولتامترية بالطريقة الحلقية لعينات البربوليس

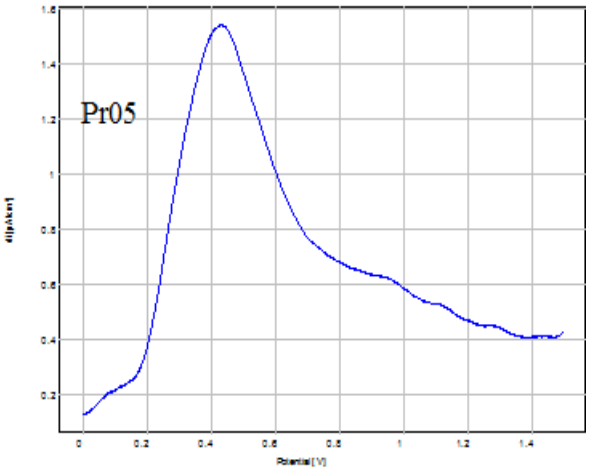
pH=4، سرعة المسح 50 mV/s





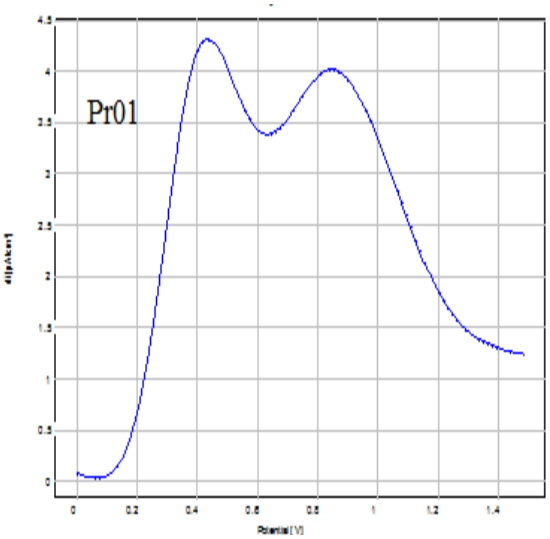


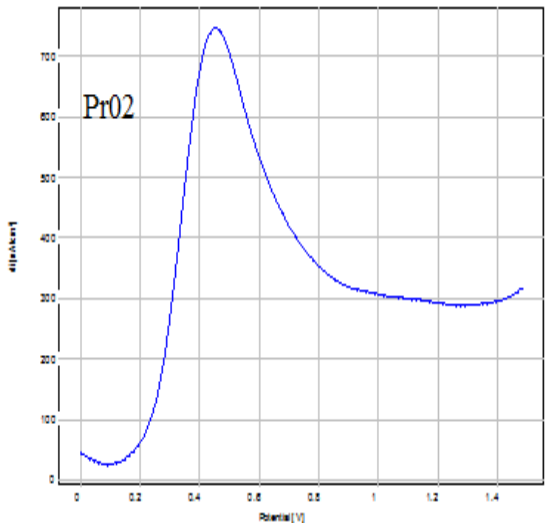


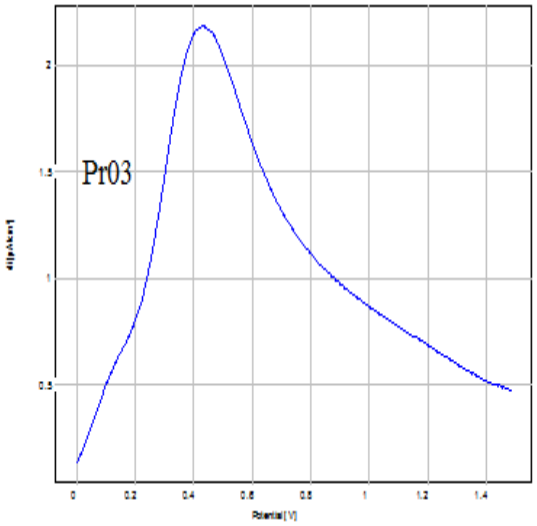


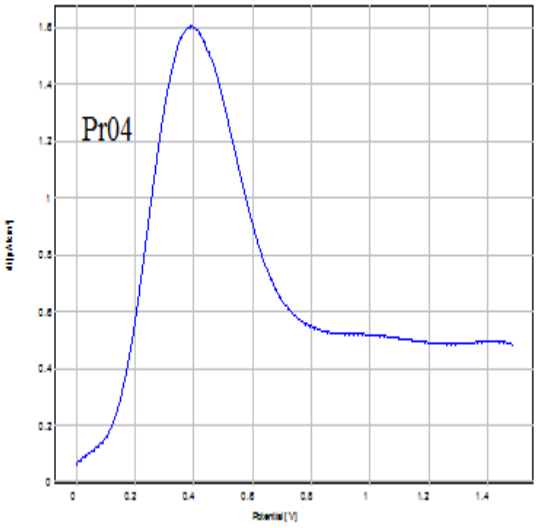
المنحنى(2.A):المنحنيات الفولتامترية بطريقة النبض التفاضلي لعينات البروبوليس

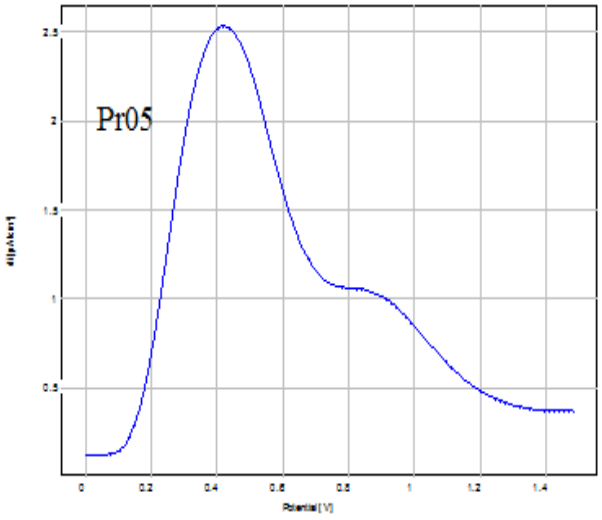
pH=4،سرعة المسح 50 mv/s





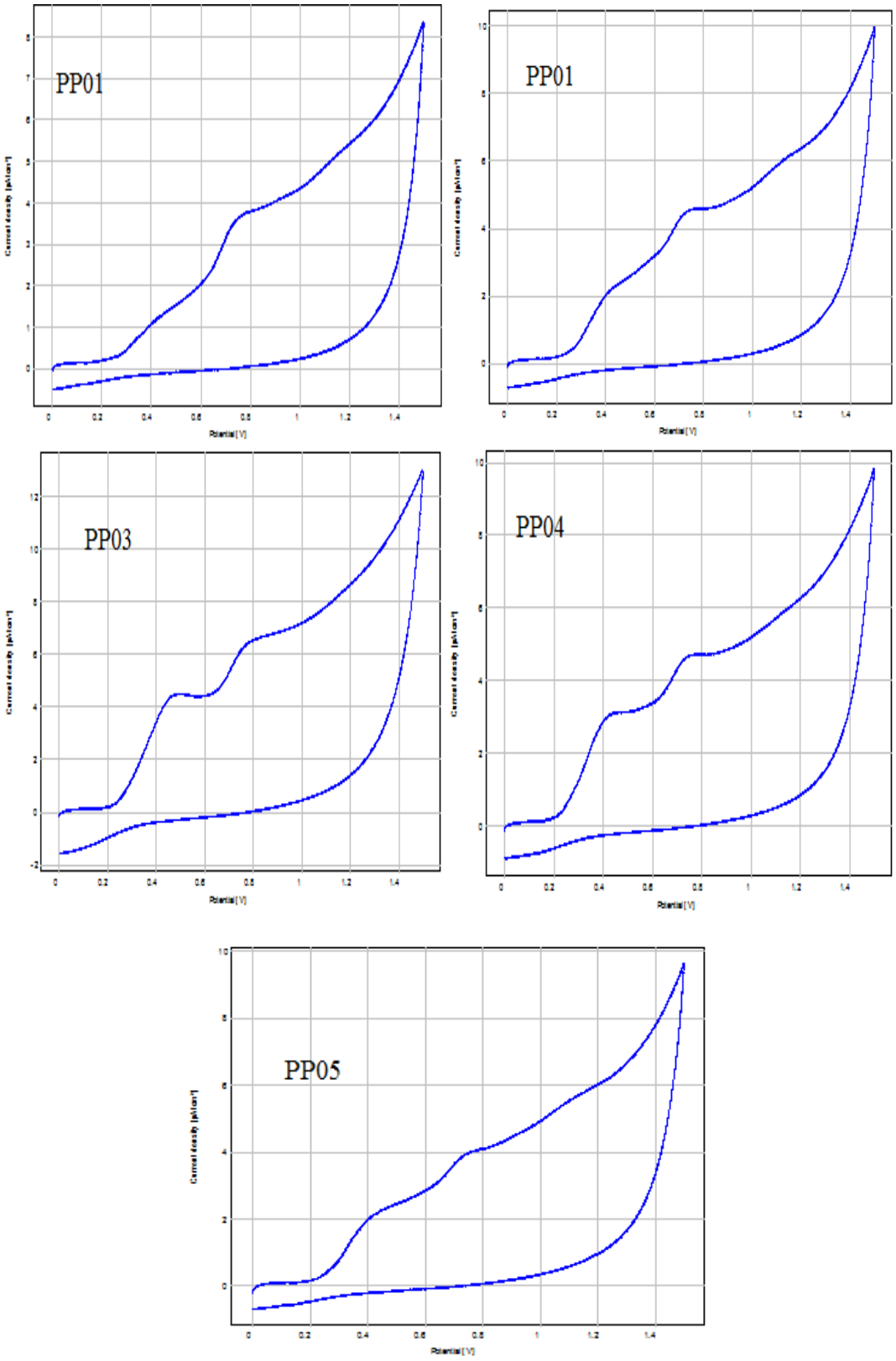






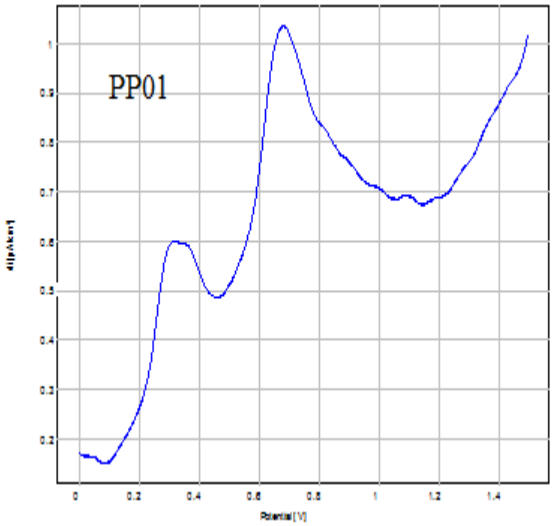
المنحنى(3.A): منحنيات الفولتامترية بطريقة الموجة المربعة لعينات البربوليس

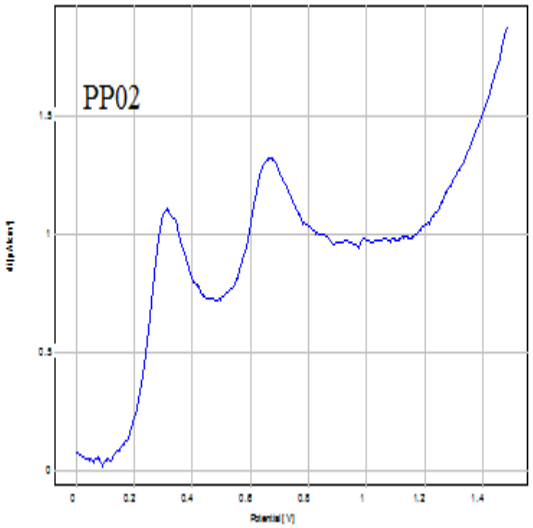
pH=4، سرعة المسح 50 mV/s

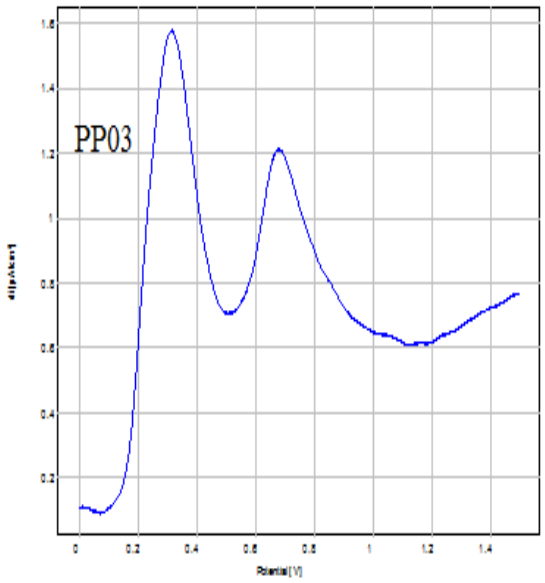


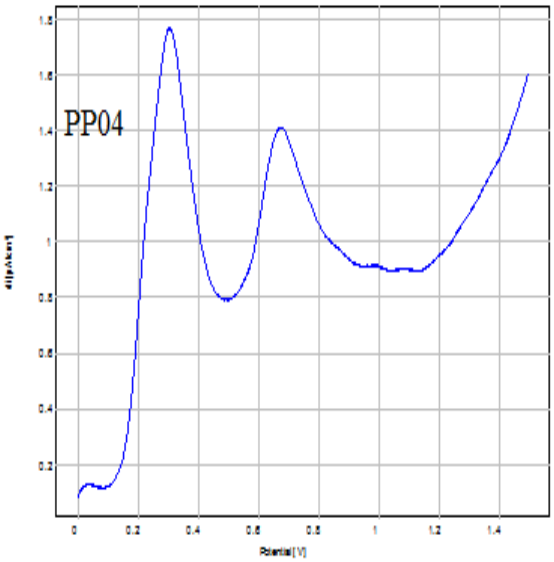
المنحنى(4.A):منحنيات الفولتامترية بطريقة الحلقية لعينات حبوب اللقاح

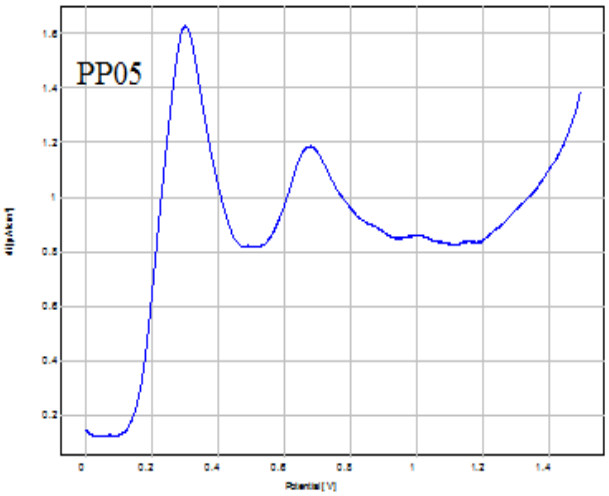
pH=4، سرعة المسح 50 mv/s


PP01
Potential [V]


PP02
Potential [V]

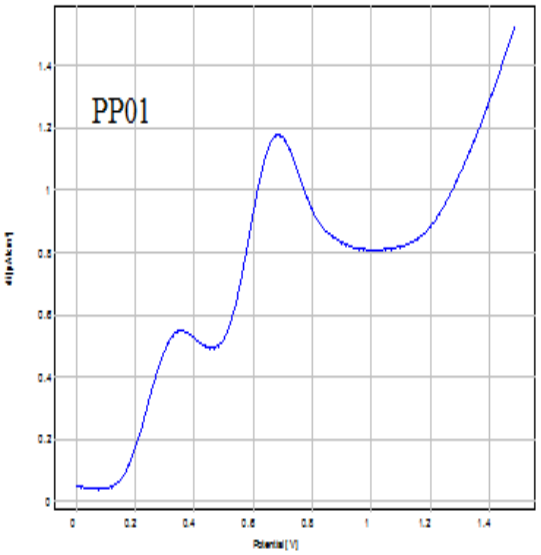


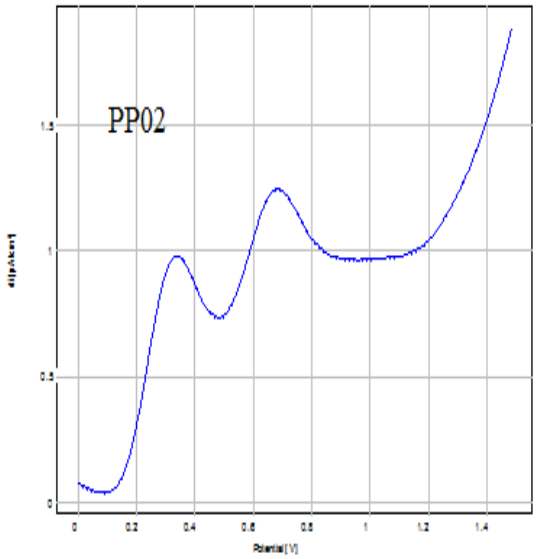


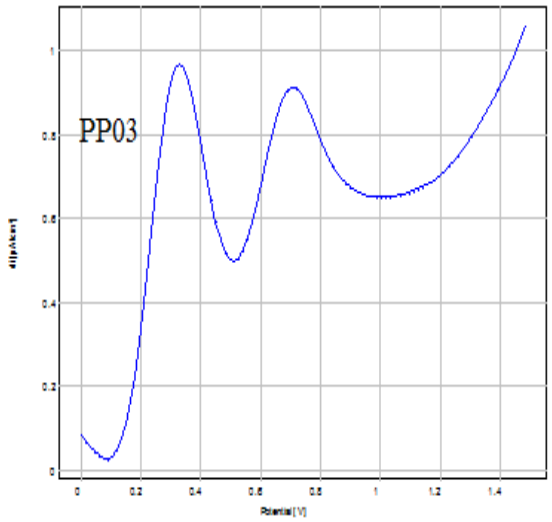


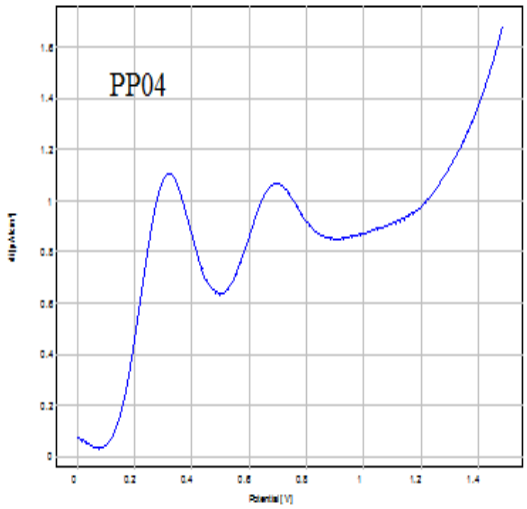
المنحنى(5.A):منحنيات الفولتامترية بطريقة النبض التفاضلي لعينات حبوب اللقاح

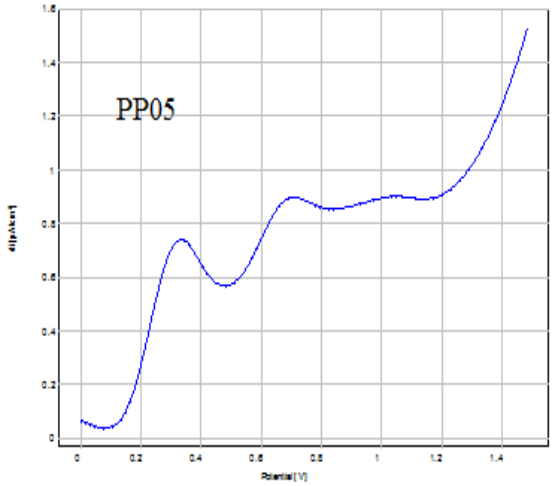
pH=4، سرعة المسح 50 mV/s


PP01
Potential [V]


PP02
Potential [V]



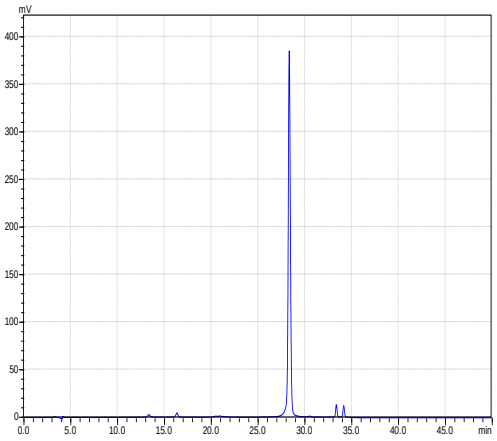




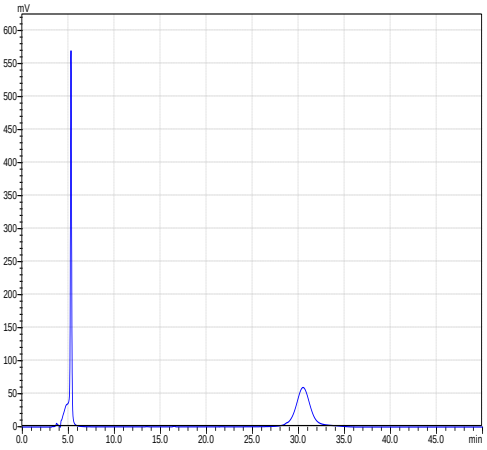
المنحنى(6.A):منحنيات الفولتاامبيرومترية بطريقة الموجة المربعة لعينات حبوب اللقاح

pH=4، سرعة المسح 50mV/s

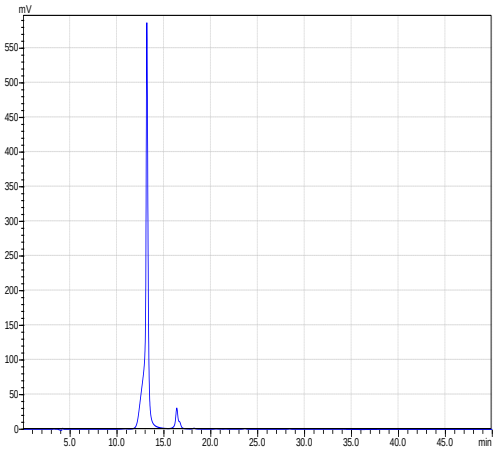
الملحق B:



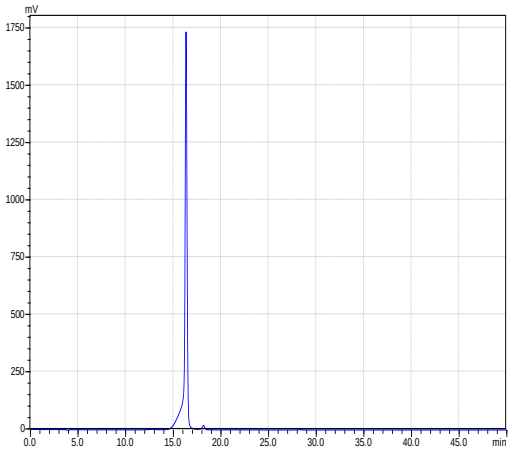
كروماتوغرام لروتين



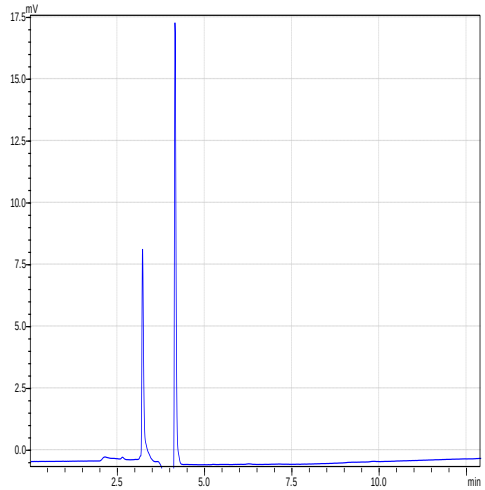
كروماتوغرام لحمض الغاليك



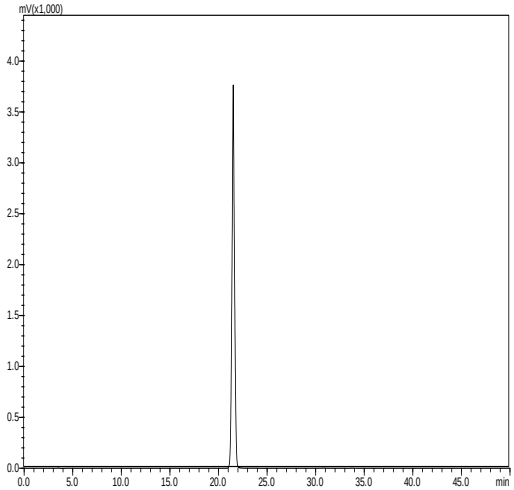
كروماتوغرام حمض الكلورجنيك



كروماتوغرام حمض الكافييك

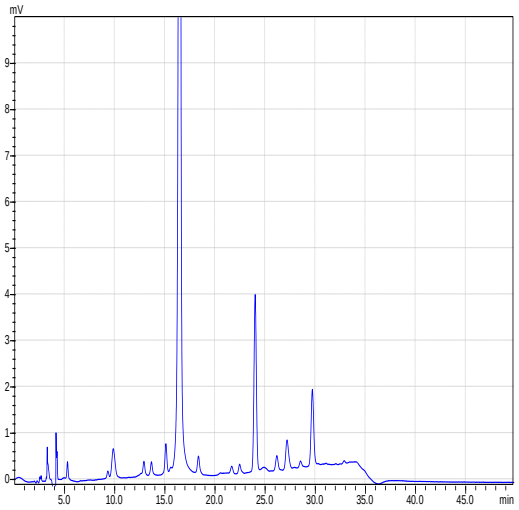


كروماتوغرام حمض اسكوربيك

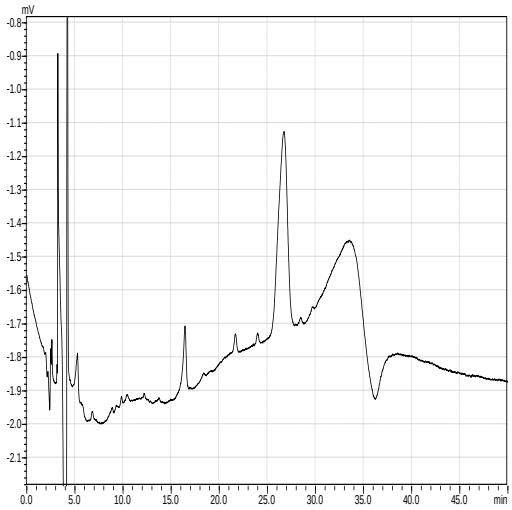


كروماتوغرام الفانيلين

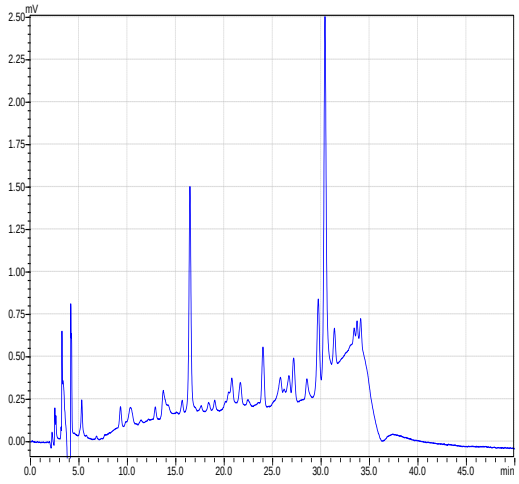
الشكل (1.B): كروماتوغرام المحاليل القياسية



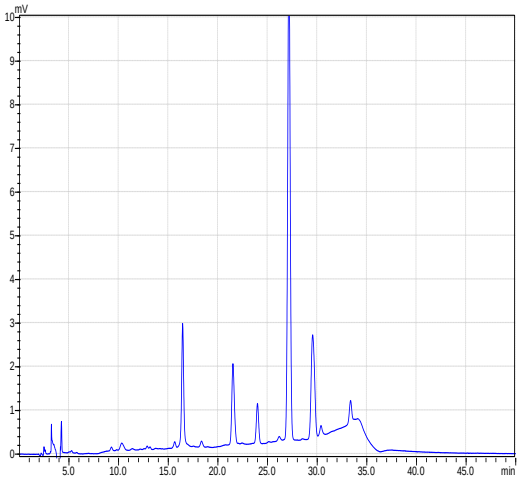
كروماتوغرام للعينة Pr01



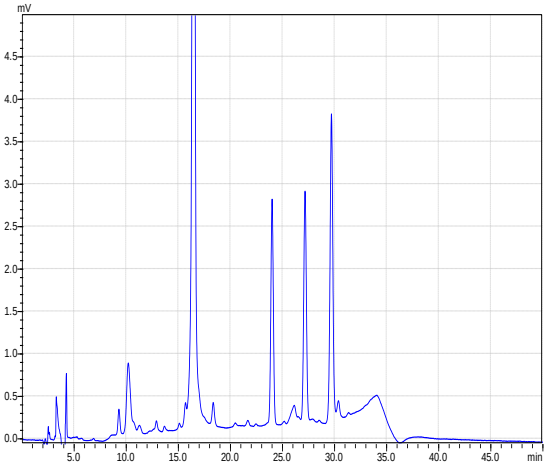
كروماتوغرام للعينة Pr02



كروماتوغرام للعينة Pr03

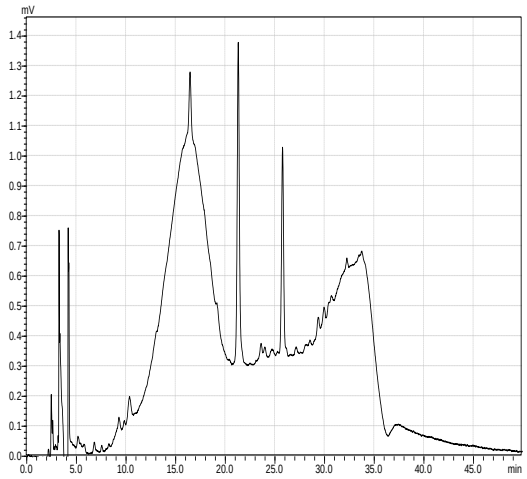


كروماتوغرام للعينة Pr04

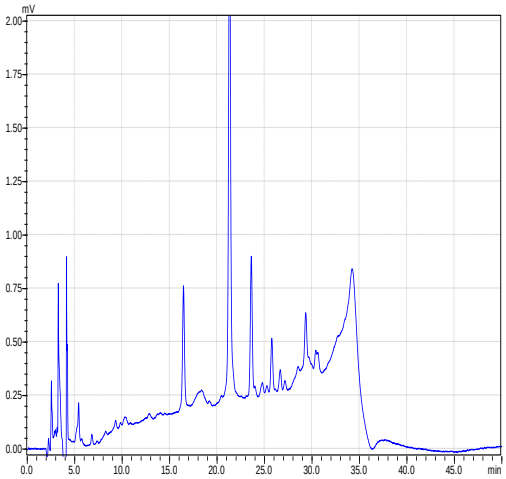


كروماتوغرام للعينةPr05

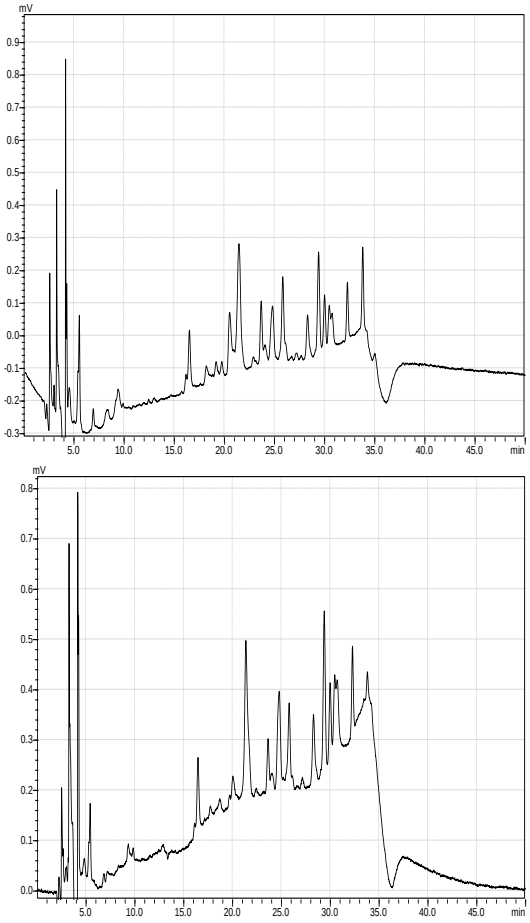
الشكل (2.B): كروماتوغرام عينات البربوليس



كروماتوغرام للعينة PP01

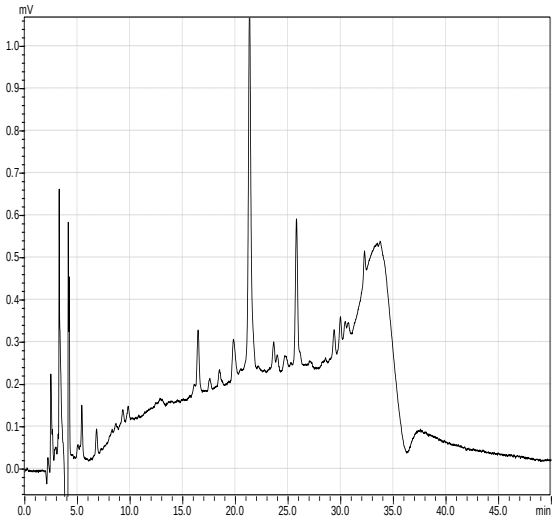


كروماتوغرام للعينة PP02



كروماتوغرام للعينةPP03

كروماتوغرام للعينة PP04



كروماتوغرام للعينة PP05

الشكل (3.B): كروماتوغرام عينات حبوب اللقاح

الخلاصة:

وأخيرا كخلاصة لهذا العمل الذي يهدف الى تثمين مادتي البروبوليس وحبوب اللقاح ذات الأهمية الكبيرة في المجالات الصيدلانية و الغذائية وقدرتها على تثبيط الجذور الحرة. حيث يهتم هذا العمل بإجراء تحاليل كمية و نوعية لتقدير بعض المركبات الفينولية بها، اضافة الى اختبارات القدرة المضادة للأكسدة لهذه المنتجات و ذلك باستعمال طرق آلية طيفية (Spectrophotomètre Uv, RP-HPLC) و كهروكيميائية.

كخطوة أولية في دراستنا قمنا بعملية استخلاص بطريقتين، الاستخلاص بحوض الامواج الفوق صوتية لعينات البروبوليس بالايثانول فكانت اكبر مردود تحصلنا عليه في العينة Pr03 والذي بلغ46.1 mg/g، ما الاستخلاص صلب- سائل بسوكسلي لعينات حبوب اللقاح بالميثانول فكانت أكبر مردود تحصلنا عليه عند العينة PP01 والذي بلغ 68.797 mg/g .

بعد عملية الاستخلاص قمنا بتقدير كمية البروتينات حيث اظهرت النتائج ان حبوب اللقاح غنية بالبروتينات. ومن ثم قمنا بتقدير كمية الفينولات الكلية حيث اظهرت النتائج ان مستخلصات البروبوليس وحبوب اللقاح غنية بالمركبات الفينولية، حيث ان كمية البولي فينول في مستخلص العينة Pr05 اكثر بالنسبة لعينات البروبوليس،فقد بينت النتائج ان اكبر كمية فينولات في عينات البربوليس عند العينة Pr05 حيث بلغتmg/g 367.39، اما عند حبوب اللقاح فكانت عند العينةPP01 بلغت mg/g 32 ،اما بالنسبة لكمية الفلافونويدات فكانت اكبر كمية في مستخلصات البربوليس عند Pr05 فقد بلغت mg/g 314.073، وعند العينة PP02 بكمية 23.55mg/g بالنسبة لمستخلصات حبوب اللقاح، اكبر كمية للفلافانول في مستخلصات البربوليس كانت في العينة Pr05 حيث بلغت 74.658mg/g، اما حبوب اللقاح كانت عند العينة PP05 بكمية 8.833mg/g.

بعدها قمنا بدراسة الفعالية المضادة للأكسدة للمستخلصات وتم ذلك بواسطة اختبارين اختبار (DPPH) واختبار المولبيدات، حيث اظهرت النتائج ان الفعالية في جميع المستخلصات معتبرة ومتقاربة بالنسبة لاختبار المولبيدات اما اختبار (DPPH) فكانت اقل، فقد سجلت اكبر فعالية عند Pr01 في عينات البروبوليس والعينة PP02 بالنسبة لعينات حبوب اللقاح في الاختبارين، حيث تم إجراء مقارنة النتائج المتحصل عليها بمركبات قياسية حمض الأسكوربيك (AA) في اختبار (DPPH) و حمض الغاليك (AG) في اختبار المولبيدات. كما وجد ان هناك علاقة ارتباط قوية بين فعالية المولبيدات وكمية الفينولات في المستخلصات (R^2=0.85)، ومن هذه الملاحظة يمكننا القول ان فعالية هذه المواد المضادة للأكسدة تعتمد على كمية الفينولات المتواجدة فيها.

وتطرقنا ايضا الى التقدير الكمي لمضادات الأكسدة في المستخلصات بالطريقة الكهروكيميائية بتقنيتي الفولتامترية الموجة المربعة والفولتامترية النبض التفاضلي حيث اوضحت النتائج ان مستخلصات البروبوليس وحبوب اللقاح غنية بحمض الاسكوربيك، كذلك بالنسبة لنتائج الكروماتوغرافيا السائلة ذات الكفاءة العالية (HPLC).

من خلال هذه الدراسة و النتائج المتحصل عليها من دراسات سابقة نستطيع القول انه من الممكن ان نعتمد على مصادر طبيعية للغذاء لكي نثبط عمل الجذور الحرة في جسم الانسان عوضا عن استعمال مواد مصنعة ،و بدون أي اضرار جانبية نظرا لما تسببه المواد المصنعة من اضرار مع مرور الوقت.

ويجب هنا تأكيد ان استخدام مضادات الأكسدة يتطلب الحذر من الافراط في تناولها ويمكن البدء في تناولها على شكل حصة غذائية مع تقدم السن بعد الخمسين من اجل تعويض نقص إنتاجها من مصادر الجسم.

وفي الأخير ارجوا من الباحثين و المهتمين بمثل هذه الدراسات مواصلة ابحاثهم في هذا المحور وايجاد طرق جديدة لتقدير كمية وفعالية مضادات الاكسدة، والسعي الى تحسين النتائج بالتغيير في شروط الطرق المتبعة في دراستنا هذه (المذيب في عملية الاستخلاص، الشروط في الدراسة الكهروكيميائية ...).

ملخص:

الهدف من هذه الدراسة هو تقدير فعالية منتوجات النحل الجزائرية (البروبوليس، حبوب اللقاح) ذلك من اجل تثمينها، والتي جمعت من مناطق مختلفة في الجزائر (تيزي وزو، الوادي، جيجل، تيبازة، تلمسان، الجزائر، البليدة، بومرداس).عملية استخلاص عينات البربوليس تمت بالاستعمال المذيب الايثانولي اما عينات حبوب اللقاح المذيب الميثانولي.

تم تقدير كمية الفينولات الكلية في المستخلصات اعتمادا على طرق طيفية بجهاز (*UV-Vis*) حيث أظهرت النتائج المتحصل عليها ان كمية الفينولات الكلية في العينات بنسب كبيرة، حيث بلغت اكبر كمية عند مستخلصات البروبوليس في عينة تلمسان. اما الفعالية المضادة للأكسدة فتم تقديرها باختبار DPPH واختبار المولبيدات فكانت اكبر فعالية في عينة البروبوليس لمنطقة تيزي وزو. كما وجد ان هناك علاقة ارتباط قوية بين فعالية المولبيدات وكمية الفينولات في المستخلصات (R^2=0.85).

وتم التقدير الكمي لمضادات الأكسدة في المستخلصات بالطريقة الكهروكيميائية بتقنيتي الفولتامتري الموجة المربعة والفولتامتري النبض التفاضلي وطريقة الكروماتوغرافيا السائلة ذات الكفاءة العالية (HPLC)، حيث اوضحت النتائج ان حمض الاسكوربيك الاكثر كمية في جميع المستخلصات.

الكلمات الدالة :

البروبوليس، حبوب اللقاح، الفينولات الكلية، الفعالية المضادة للأكسدة، الفولتامتري الموجة المربعة، الفولتامتري النبض التفاضلي، الكروماتوغرافيا السائلة ذات الكفاءة العالية (HPLC).

Résumé:

L'objectif principal de cette étude est l'estimation des produits des abeilles algériens (propolis, pollens) pour les évaluer, les échantillons sont regroupés de plusieurs régions d'Algérie (Tizi-Ouzou, El oued, Jijel, Tipaza, Tlemcen, Alger, Blida, Boumerdes). Le solvant utilisé pour l'extraction de propolis est l'éthanol et pour le pollen est le méthanol.

L'estimation de la quantité des phénols totale mesurés par la méthode spectrophotomètrique d'UV-Visible où on obtient des grandes quantités des phénols, la quantité maximale est dans l'extrait de propolis de Tlemcen.

L'activité anti oxydant être estimer par le teste de DPPH et le test de molybdènes, la quantité maximale est dans l'extrait de propolis de Tizi-Ouzou.
On trouve dans cette étude qu'il y on a une corrélation entre l'activité des molybdènes et la quantité des phénols (R^2=0.85)

La quantification d'activité anti oxydant des extraits est fait par des méthodes électrochimiques : La voltamétrie à onde carrée (SWV)et voltamétrie à impulsion différentielle (DPV) et par la méthode de la chromatographie de phase liquide à haute performance HPLC. Les résultats ont montré que la grande quantité dans tous les extraits est de l'acide ascorbique.

***Mots clé** : propolis, pollen, phénol totale, activité anti oxydant, voltamétrie à onde carrée, voltamétrie de impulsion différentielle, la chromatographie de phase liquide à haute performance(HPLC).*