الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة الشهيد حمه لخضرالوادي

كلية العلوم الدقيقة

قســـم علوم المادة

مذكرة تخرج لنيل شهادة

ماستر في الكيمياء

تخصص:كيمياء عضوية- تحليلية

من إعداد الطالبة: قاسمي ثوريه

تحت عنوان:

البصمة الكهروكيميائية لبعض المركبات الفينولية في حبوب القاح

نوقشت يوم:2016/05/24

أمام لجنة المناقشة المكونة من :

بعيو سمير	أستاذ محاضر(ب)	جامعة الوادي	رئيساً
شعبية ناصر	أستاذ مساعد (أ)	جامعة الوادي	مناقشاً
مصباحي محمد عادل	أستاذ مساعد (أ)	جامعة الوادي	مناقشاً
ربيعي عبد الكريم	أستاذ مساعد (أ)	جامعة الوادي	مؤطراً

السنـة الجـامعية 2016/2015

وَقُل رَّبِّ زِدْنِي عِلْمًا

الإهـــــداء

إلى كل من وفر لي سبل التعليم وأنار لي درب الحياة. . .

إلى والديا الكريمين ،والى كل إخوتي وأخواتي. . .

إلى زملائي وأصدقائي في مشواري الدراسي . . .

إلى كل من ساهم في إثراء هذا البحث. . .

أهدي هذا العمل المتواضع . . .

ثوريـــة

تشكـــرات

الحمد و الشكر لله سبحانه وتعالى الذي بفضله وعونه وتوفيقه أتممت بحثي هذا .

أتقدم بأسمى عبارات الامتنان والشكر إلى أستاذي الفاضل المشرف على هذا البحث **ربيعي عبد الكريم** الذي لم يبخل علينا بتوجيهاته القيمة و تشجيعه المتواصل و توفيره كل الإمكانيات والوسائل .

كما أتقدم بجزيل الشكر والامتنان إلى أعضاء اللجنة المناقشة على قبولها مناقشة هذه المذكرة ، أستاذي الكريم السيد: **بعيو سمير** ، و أستاذي الفاضل: **شعيبية ناصر**،و أستاذي الكريم :**مصباحي محمد عادل** .

ويمتد شكري وتقديري إلى طالبتي الدكتورة : **همامي هادية** ،**حني مريم** .و إلى المشرفات على المخبر: **لويزة فوناس، جميلة برة، وحيدة دية** . . . ، اللاتي رحبن وقدمن لي النصح والإرشاد لأجل إنجاح عملي ولا أنسى بتقديم الشكر الجزيل لمسؤول مخبر البحث **طلبية علي**.

وخالص الشكر أقدمه إلى جميع أصدقائي من قريب أو بعيد ، أنار الله طريقكم وجزاكم عني خير الجزاء وأفره.

ثوريـــة

الفهارس العامة

قائمة الأشكال

الشكل		الصفحة
	الجزء النظري	
	الفصل الأول: عموميات حول حبوب الطلع	
الشكل(1.I)	حبوب لقاح الأزهار	**6**
الشكل(2.I)	حبوب لقاح جمعت من طرف النحل	**7**
الشكل(3.I)	جمع النحل لحبوب اللقاح من الأزهار ووضعها في سلة حبوب اللقاح	**8**
الشكل(4.I)	عملية تخزين النحل لحبوب اللقاح في النخاريب	**8**
الشكل(5.I)	جمع النحالين لحبوب الطلع بواسطة مصائد خاصة	**9**
الشكل(6.I)	تخزين حبوب اللقاح من طرف النحالين	**10**
الشكل(7.I)	بعض أشكال حبة الطلع و تنوعها	**11**
	الفصل الثاني: الجذور الحرة والفعالية المضادة للأكسدة	
الشكل(II .1)	يوضح التراكيب الرنينية في جزيء DPPH	**22**
	الفصل الثالث: المركبات الفينولية الطبيعية	
الشكل(1.III)	بنية بعض الفينولات البسيطة	**31**
الشكل(2.III)	بعض النماذج الكومارينات	**32**
الشكل(3.III)	صيغ بعض الكومارينات	**33**
الشكل(4.III)	الهيكلة الأساسية للفلافويد	**33**
الشكل(5.III)	وحدة التانينات المتراكمة	**35**
الشكل(6.III)	وحدة التانينات المتحللة	**35**
الشكل(7.III)	التركيب البنائي للقنين	**36**
الشكل(8.III)	اكسدة المركبات فينولية	**37**
الشكل(9.III)	المواقع الفعالة في النشاط المضادة للأكسدة للفلافونويدات	**37**
الشكل(10.III)	آلية تفاعل الفلافنويدات مع الجذور الحرة	**39**
	الجزء العملي	
	الفصل الرابع: مواد وطرق العمل	
الشكل(1.IV)	تمثيل تخطيطي لدارسة المنجزة	**44**
الشكل(2.IV)	مكونات جهاز *(PGZ 301،VOLTALAB 40)*.	**47**
الشكل(3.IV)	مختلف الألوان التي تم فرزها من عينة الوادي	**48**
الشكل(4.IV)	عملية الاستخلاص في تركيب سوكسلي	**49**
الشكل(5.IV)	مخطط تقدير الفينولات الكلية في المستخلصات	**51**
الشكل(6.IV)	مخطط تقدير الفلافونويدات الكلية في المستخلصات	**52**

الشكل(7.IV) جهاز (HPLC) **54**
الشكل(8.IV) يوضح آلية تثبيط العامل المضاد للأكسدة مع الجذر الثابت $DPPH^{\cdot}$ **57**
الفصل الخامس: نتائج و مناقشة
الشكل(V .1) يوضح صور الدراسة المجهرية للعينات **64**

قائمة الجداول

الجدول		الصفحة
	الجزء النظري	
	الفصل الأول: عموميات حول حبوب الطلع	
الجدول(1.I)	يمثل أهم المكونات لحبوب الطلع	**12**
الجدول(2.I)	كمية أهم الأحماض الامينية في حبوب الطلع	**13**
الجدول(3.I)	الفيتامينات التي يمكن إن تتواجد بحبوب الطلع	**14**
الجدول(4.I)	تقدير لأهم المعادن الاساسية في حبوب الطلع	**15**
	الفصل الثالث: المركبات الفينولية الطبيعية	
الجدول(1.III)	الأحماض الفينولية المشتقة من حامض البنزويك	**31**
الجدول(2.III)	الأحماض الفينولية المشتقة من حامض السينامیك	**32**
الجدول(3.III)	تصنيف الفلافونويدات	**34**
	الجزء العملي	
	الفصل الرابع: مواد وطرق العمل	
الجدول(1.IV)	مناطق وتاريخ الجني لحبوب الطلع المدروسة	**45**
الجدول(2.IV)	الشروط التجريبية لجهاز (HPLC) لفصل المركبات الفينولية المدروسة	**53**
الجدول(3.IV)	تغيرات نسبة الطور المتحرك بدلالة الزمن.	**53**
	الفصل الخامس: نتائج ومناقشة	
الجدول(1.V)	نتائج مردود المادة المستخلصة	**65**
الجدول(2.V)	قيم الامتصاصية لكل عينة والتقدير الكمي للفينولات	**67**
الجدول(3.V)	قيم الامتصاصية لكل عينة والتقدير الكمي الفلافونويدات	**67**
الجدول(4.V)	***زمن المكوث لكل مركب فينولي***	**69**
الجدول(5.V)	***تقدير كمي للمركبات الفينولية في مستخلصات حبوب اللقاح***	**70**
الجدول(6.V)	***جدول يوضح المنحنيات الفولطامترية للعينات المدروسة***	**71**
الجدول(7.V)	***قيم كمونات الاكسدة والارجاع للمحاليل القياسية و المستخلصات***	**72**
الجدول(8.V)	***قيم IC50 و ARP***	**74**
الجدول(9.V)	***تقدير اجمالي الفعالية المضادة للاكسدة.***	**76**
الجدول (10.V)	***يوضح التقدير الإجمالي للفعالية***	**78**

قائمة المنحنيات

المنحنى		الصفحة
	الجزء العملي	
	الفصل الرابع: مواد وطرق العمل	
المنحنى(1.IV)	المنحنى القياسي لحمض الغاليك	**50**
المنحنى(2.IV)	المنحنى القياسي لمحاليل الروتين	**52**
المنحنى(3.IV)	المنحنيات الفولتامترية الحلقي و الموجة المربعة لوسط الدراسة	**55**
المنحنى(4.IV)	المنحنى الفولطامتري لحمض الكافيك	**56**
المنحنى(5.IV)	المنحنى الفولتامتري للرتين .	**56**
المنحنى(6.IV)	المنحنى القياسي لحمض الغاليك	**59**
المنحنى(7.IV)	المنحنى القياسي لحمض الاسكوربيك(AA)	**59**
	الفصل الخامس: نتائج ومناقشة	
المنحنى (1.V)	يوضح مقارنة مردود الاستخلاص حسب المناطق	**66**
المنحنى (2.V)	يوضح النسبة بين كل من الفينولات والفلافونويدات	**68**
المنحنى (3 .V)	الكروماتوغرام الممثل للفينولات المرجعية المدروسة	**68**
المنحنى (4 .V)	الكروماتوغرام الممثل لفينولات العينة P3	**69**
المنحنى (5 .V)	لتمثيل البياني لتقدير الكمي للمركبات الفينولية للمستخلصات .	**70**
المنحنى (6 .V)	التركيز المثبط ل% IC50	**74**
المنحنى (7 .V)	قيم ARP(IC50)	**75**
المنحنى (8 .V)	يوضح علاقة الارتباط بين كمية الفينولات والفلافونيدات ونتائج اختبار القوة الفعالية المضادة للأكسدة (DPPH) للمستخلصات عند IC50.	**75**
المنحنى (9 .V)	مقارنة نتائج اختبار TAC لمستخلصات حبوب اللقاح	**76**
المنحنى (10.V)	يوضح علاقة الارتباط بين كمية الفينولات والفلافانويدات ونتائج اختبار الفعالية المضادة للأكسدة للمستخلصات.	**77**
المنحنى (11.V)	يوضح علاقة الارتباط بين ال ARP و اجمالي الفعالية المضادة للاكسدة	**77**
المنحنى (12.V)	مقارنة نتائج اختبار FARP لمستخلصات حبوب اللقاح	**79**

قائمـة الرمــوز	
P	حبوب الطلع .
MeOH	الميثانول.
UV	الأشعة فوق البنفسجية.
Na_2CO_3	كربونات الصوديوم.
A	الإمتصاصية.
AA	حمض الاسكوربيك.
GA	حمض الغاليك.
Ru	الروتين
CLA	حمض الكلورجنيك
VA	حمض الفانيليك
VN	الفانيلين
p-Co	كومارين
NR	النارجين
QR	الكريستين
K	ميل المنحنى القياسي.
C	التركيز g/l.
V	الحجم.
$AlCl_3$	كلورورالألومينيوم.
OH	مجموعة الهيدروكسيل
HCl	حمض الكلور.
DPPH	1 ,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
(DPPH-H)	2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazine
FRAP	Ferric Reducing Antioxydant Power
ABTS	2,2azinobis-(3-ethylbenzothialozine-6-sulphonic acid)
ROS	Reactive Oxygen Species
TAC	Total antioxidant activity
IC_{50}	تركيز المستخلص الفينولي لتثبيط 50% من الجذور الحرة.
I%	النسبة المئوية للتثبيط
A_0	الامتصاصية الضوئية للجذر الحر في غياب المستخلصات.
A_i	الامتصاصية الضوئية للخليط (الجذر + المستخلصات) بعد مرور زمن.
KCl	كلوريد البوتاسيوم.
ECS	قطب الكالومل المشبع.
pH	درجة الحموضة.

CV	الفولطاأمبيرومتري الحلقي.
SWV	الفولطاأمبيرومتري الموجة المربعة.
E	الكمون.
ARP	Anti-Radicalaire Puissance
VTRS	ترقية وتثمين الموارد الصحراوية.

الفهـرس

الإهداء

تشكرات

قائمة الأشكال والصور

قائمة الرموز قائمة الجداول

قائمة المنحنيات

قائمة الرموز

الفهرس

العنوان	الصفحة
مقدمـة عامة	1

الجزء النظري

۞الفصل الأول: عموميات حول حبوب اللقاح ۞	
تمهيد	6
I.1.حبوب اللقاح	6
I.2.تخزين النحل لحبوب اللقاح	7
I.3. جمع النحالين لحبوب اللقاح	8
I.4. خصائص حبوب اللقاح	10
I.5. تصنيف حبوب اللقاح	11
I..1.5 وفقا للمحتوى المائي	11
I. 2.5 وفقا لمصدر محتوى الزهرة	12
I. 6.تركيب حبوب اللقاح	12
I.1.6 الماء	12
I. 2.6 السكريات	13
I. 3.6 الدهون	13
I. 4.6 البروتينات و الأحماض الامنية	13
I. 5.6 الفيتامينات	14
I.6.6 المعادن	14
I.7.6 الإنزيمات والخمائ	15

I. 7 طرق استخدام حبوب اللقاح	15
I.8 الفوائد الطبية والعلاجية لحبوب اللقاح	16
خاتمة	17
المراجع	18
۞الفصل الثاني: الجذور الحرة و الفعالية المضادة للأكسدة ۞	
تمهيد	21
II.1. الجذور الحرة	21
II.1.1. تعريف الجذور الحرة	21
II.1.2. أنواع الجذور الحرة حسب استقراريتها	21
II.1.3. فعالية الجذور الحرة	22
II.1.4. متابعة حركية الجذور الحرة	22
II.2.الفعالية المضادة للأكسدة	23
II.2.1. تعريف مضادات الأكسدة	23
II.2.2. مصادر المضادات الأكسدة	23
II.2.3. تقسيم مضادات الأكسدة	23
II.2.4. آلية عمل مضادات الأكسدة	24
II.2.5. الحالات المرضية ذات العلاقة بالمواد المؤكسدة	25
II.3. الفعالية المضادة للأكسدة	25
خاتمة	26
المراجع	27
۞الفصل الثالث: المركبات الفينولية الطبيعية۞	
تمهيد	30
III.1. تعريف المركبات الفينولية الطبيعية	30
III.2. دراسة تصنيف المركبات الفينولية الطبيعية (أقسامها)	30
III.2.1. الفينولات البسيطة	31
III. 2.2.الأحماض الفينولية	31
III.2.3.الكومارينات	32
III 2.4.الفلافونيدات	33
III 2.5. التانينات(العفصيات)	35
III 2 .6. *الليغنين*	35

3.III. أهمية الفينولات و الفلافونيدات	**36**
4.III. الخصائص الكهروكيميائية للفينولات	**37**
5.III. الفلافونيدات والنشاط المضاد للأكسدة	**38**
خاتمة	**39**
المراجع	**30**

الجزء العملي

الفصل الرابع: مواد وطرق العمل	
تمهيد	**44**
1.IV. تحضير العينات	**45**
1.1.IV. حني العينات	**45**
2.1.IV. المواد و الأجهزة المستعملة	**45**
3.1.IV. الدراسة المجهرية لبعض عينات حبوب الطلع	**48**
4.1.IV. استخلاص المواد الفعالة	**48**
2.IV. تقدير كمية الفينولات الكلية والفلافونويدات	**49**
3.IV. الدراسة السلوك الكهروكيميائية للمستخلصات و المركبات الفينولية	**54**
4.IV. الاختبارات المضادة للأكسدة	**56**
خاتمة	**60**
المراجع	**61**
الفصل الخامس: نتائج ومناقشة	
تمهيد	**64**
1.V نتائج الدراسة المجهرية لحبوب الطلع	**64**
2.V نتائج مردود الاستخلاص لعينات حبوب الطلع	**66**
3.V مقارنة المحتوى الفينولي للمستخلصات	**66**
4.V. نتائج تقدير بعض الأحماض الفينولية و الفلافونويدات بالكروماتوغرافية السائلة عالية الأداءHPLC	**68**
5.V. نتائج الدراسة الكهروكيميائية	**71**
6.V نتائج تقدير الفعالية المضادة للأكسدة	**73**
خاتمة	**79**
خلاصة عامة	
ملحق	

مقدمة عامة

مقدمة عامة

حبوب اللقاح أو (الطلع) من بين أهم منتجات نحل العسل، فهي تمثل العناصر التكاثرية الذكرية التي تعلق بشعيرات جسمه و تنتقل معه إلى الأعضاء الأنثوية للنبتات، وهذا ما يعرف بعملية التلقيح، و منه ما يتم حفظه في سلة الطلع على أرجله و الذي يستخدمه لتغذية اليرقات و بعجنه مع العسل يصبح خبز النحل ، كما يتم جمعه من طرف النحالين بواسطة مصائد النحل [1،2].

إن الأبحاث التي تم إجراؤها مؤخرا أثبتت أن حبوب اللقاح تعد من أغنى الأغذية الطبيعة المضافة للعسل. فهي تحوي تركيبة معقدة من المواد الغذائية و العلاجية الثمينة جدا، فقد استخدمت حبوب اللقاح كغذاء في عصور قدماء الصينيون و الرومان ... . وقد اعتبروه نافعا جدا للصحة ، مما جعل من دراسة تركيب حبوب اللقاح ذات أهمية كبيرة [3].

ومن أبرز مكوناته الأساسية نجد البروتينات والفيتامينات و السكريات و الفلافونويدات و الأحماض الامينية ... . إن التركيب الكيميائي و البيولوجي لحبوب اللقاح مزال قيد الدراسة كونه متنوع بتنوع المصدر النباتي ومنه تنوع المركبات التي يحتوي عليها [4] .

المركبات الفينولية مركبات مهمة جدا لجسم الإنسان كونها من بين مضادات الأكسدة الجد فعالة ،وهي أحد المكونات الأساسية لحبوب اللقاح [5]، و لأهميتها فقد تعددت طرق التقدير الكمي لها من خلال تقدير الفعالية المضادة للأكسدة و لعل أهم هذه الطرق: اختبار *(DPPH)*، *(FRAP)*، *(ABTS)*، *(ORAC)*، *(TRAP)* واختبار القدرة الإرجاعية (PR)، هذه الطرق تعتمد على التلوين ونزع التلوين في طول موجي معين، لكن بالرغم من الاعتماد على هذه الطرق والتقنيات التقديرية المذكورة، فإن أحد لا ينكر أن لكل طريقة إيجابياتها وسلبياتها،

ولهذا فان في دراستنا هذه إعتمدنا على ثلاث اختبارات وهي اختبار FRAP،DPPH و اختبار موليبدات الفوسفات .إضافة لهذه الطرق قمنا بدراسة السلوك الكهروكيميائي للمستخلصات، كما إستعنا بالكروماتوغرافيا ذات الكفاءة العالية (HPLC) في دراسة البصمة الفينولية في حبوب الطلع ، من خلال تقدير المحتوى الفينولي.

وتتضمن دراستنا جزئيين رئيسين وهما على التوالي:

الجزء الأول:

وهو الجانب النظري ويتكون من ثلاثة فصول:

- **الفصل الأول** : تم توضيح معلومات عامة حول حبوب الطلع وخصائصه الفيزوكيميائية و الخصائص العلاجية لها .
- **الفصل الثاني** : خصص للجذور الحرة، التعريف بها أنواعها وطرق تفاعلاتها، و كذلك فعالية المواد المضادة للأكسدة بصفة عامة ونختم هذا الفصل بالتطرق إلى طرق تقدير فعالية المواد المضادة للأكسدة.
- **الفصل الثالث** : وتم فيها دراسة عامة حول المركبات الفينولية، أقسامها وخصائصها العامة.

الجزء الثاني:

وهو الجانب العملي وضم هذا الجزء فصلين:

- **الفصل الرابع :** حيث تناولنا فيه إستخلاص المركبات الفينولية في نظام كحولي (ميثانول) وقدرت كميتها في العينات المدروسة بواسطة جهاز(Spectroscopie UV- visible)الذي من خلاله تم معرفة مقدار الخلاصة الفينولية في العينات المدروسة، كما قمنا أيضا بتقدير فعالية المواد المضادة للأكسدة بالطرق و دراسة السلوك الكهروكيميائية.
- **الفصل الخامس :** تم في هذا الفصل مناقشة وتحليل النتائج المتحصل عليها.

وفي الأخير تم إنهاء المذكرة بعون الله وتوفيقه، بخلاصة عامة فيها تلخيص مجمل للنتائج المتحصل عليها.

المراجع

[2]. البروفيسور عبد الباسط محمد السيد ، موسوعة النحل (تربية – إعجاز – شفاء)، الطبعة الأولى ،ألفا للنشر والتوزيع - جمهورية مصر العربية ،2011 م،

[4]. عارف سالم حمزة، تربية النحل و منتجات الخلية في الغذاء و المعالجة (العسل و الرحيق-الشمع- حبوب الطلع- غذاء الملكة- العكبر سم النحل)، الطبعة الأولى،دار علاء الدين – دمشق،1995، ص : 198.

[1]. BOGDANOV, Stefan. Pollen: Production, Nutrition and Health: A Review(en ligne). Bee. Product Science. April 2015 ,www.bee-hexagon.net.p: 21,22.

[3]. MariaG.R.Campos, BOGDANOV Stefan, Ligia Bicudo de Almeida Muradian,Teresa Szczesna, Mancebo Yanina, Christian FRIGERIO , Francisco Ferreira , Pollen composition and standardisation of anlytical methods, Journal of Apicultural Resereach and Bee World ,2008,p:157-159.

[5].CARLSON,, Wade. HEALTH FROM THE HIVE. USA: Keats Publishing, Inc ,1992,162 p. ISBN 0-87983-581-8 .

الجزء النظري

عموميات حول حبوب اللقاح

تمهيد :

أصبح استخدام منتجات النحل علما قائما بذاته وجه إليه العديد من العلماء والباحثين للغوص في أعماقه واكتشاف خباياه ، حيث استخدمت منتجات النحل بما في ذلك (العسل ، حبوب الطلع ، العكبر، سم النحل ، شمع ...) في العلاج منذ أزل بعيد وكونها مواد طبيعية فليس هناك خوف من مضاعفات استخدامها وأيضا قد أثبتت جدواها في علاج العديد من الأمراض ، كما أن هناك العديد من المستحضرات الطبية في العالم لمنتجات النحل [1،2] .

تعد حبوب اللقاح من بين أهم هذه المنتجات ، والتي عرفت منذ العصور القديمة كعلاج و مكمل غذائي فقد اعتبره نافعا للصحة [3]، فوصفه بـ : " الغبار الواهبة للحياة " أو " الطعام الشهي " وذلك بتناوله مع العسل للفوائد الصحية التي يمنحها [4]. واشتقت تسميته من اللفظة شاحب" اليونانية والتي تشير إلى الدقيق و الغبار.

I. 1. حبوب اللقاح :

الاسم العلمي للمكون الأساسي: غبار الطلع أو لقاح الأزهار الأسماء الأخرى من بعد تحويله من قبل النحل: حبوب اللقاح، خبز النحل.الاسم باللغة الأجنبية الفرنسية (pollen) و الانجليزية (bee pollen).

لقاح الأزهار:

عبارة عن البذور الذكرية المنتجة في الأعضاء الذكرية للنبات. وهو عبارة عن جزيئات مجهريه أو بودرة يحملها الهواء على شكل غبار أو الحشرات [3]، لهدف أساس هو تخصيب "المدقات" أو أعضاء التأنيث في الأزهار لتوليد الثمار. ويحمل اللقاح العلامات الجينية الوراثية للنبات. وكل نوع من النبات ينتج لقاح مختلف ولكل منها مكونات مختلفة [5] **الشكل** (1.I).

الشكل ***(1.I): حبوب لقاح الأزهار.***

حبوب اللقاح الذي يجمعه النحل :

هي خليط مركب من أنواع مختلفة من لقاح الأزهار تجمعه النحلة في شكل مسحوق بحيث تعلق في الشعر الذي في جسم النحلة وكما يوجد في أرجل النحلة الخلفية جيوب تسمى (سلة اللقاح)، تقوم النحلة بتجميع ما علق في جسمها من هذ ا مسحوق في تلك الجيوب ، كما تقوم بإضافة بعض الأنزيمات ونسبة من العسل إليها كي تجعل منها غداء ليرقات النحل [5،6].

تعد حبوب اللقاح التي يجمعها النحل أفضل بكثير من التي يمكن جمعها مباشرة من الأزهار، إذ يقوم النحل باختيار أفضلها من بين ملايين الأزهار المتوافرة له ، ومن بين أهم الأنواع التي يقبل عليها لنحل Entomophile والتي لها فوائد غذائية كبيرة [6] . **الشكل (2.I)**

*الشكل (2.I): **حبوب لقاح جمعت من طرف النحل .***

I. 2. تخزين النحل لحبوب اللقاح :

يقوم النحل بجمع حبوب اللقاح ع بر خطوات، فعند زيارة النحل إلى الأزهار يتعفر جسمها بواسطة حبوب اللقاح ، ثم يقوم النحل بجمع حبو ب ا للقاح المنتشرة على الجسم بواسطة الأرجل الخلفية بمساعدة فرشاة حبوب اللقاح ، الشكل **(3.I)**. ثم يكبس النحل حبوب اللقاح في شكل كرات بواسطة مكبس حبوب اللقاح المتواجد بين قاعدة الساق و الرسغ القاعدي ،و أخيرا يضع النحل حبوب اللقاح في تجويف خاص على الأرجل الخلفية يعرف بسلة حبوب اللقاح، و عامة يكون وزن حمولة حبوب اللقاح م ن 14mg إلى 20mg [7].

*الشكل (3.I): **جمع النحل لحبوب اللقاح من الأزهار ووضعها في سلة حبوب 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 بضربات متتالية حتى تمتلئ ، وعندها تضع فوقها قليلا من العسل لتمنع الهواء من الوصول إليها وإفسادها [8] **الشكل (4.I).**

وهنا وبسبب غنى حبوب اللقاح والعسل بالخمائر، فإن تغيرات و التفاعلات كيميائية هامة جدا تبدأ في الحدوث ، بحيث يتحول جزء من السكر إلى حمض اللبن الذي يحمي حبوب الطلع من الفساد، وبنهاية هذا التحول يصير الطلع ما نسميه خبز النحل أو غذاء الملكات، الذي يختلف في مكوناته عن العسل والطلع [9;5].

*الشكل (4.I): **عملية تخزين النحل لحبوب اللقاح في النخاريب .***

I. 4. جمع النحالين لحبوب اللقاح :

فكرة جمع حبوب اللقاح تتلخص في عمل مصيدة مزودة بفتحات صغيرة بحيث تمرر النحل دون إمرار كرات حبوب اللقاح على أن تسقط هذه الأخيرة على قاعدة من سلك شبكي بحيث تتجمع في درج سفلى و لا يستطيع النحل أن يأخذها مرة أخرى، هذا و تتنوع أشكال و أحجام مصائد حبوب اللقاح مع ثبات الفكرة الرئيسية في عملها .و لكي يقوم النحال بإنتاج حبوب اللقاح في منحله فأنه يقوم بعمل عدة خطوات :

- تحديد الخلايا القوية ذات النحل السارح الكثيف.
- إحضار مصائد حبوب اللقاح و تجهيزها و وضعها على مدخل الخلايا القوية.
- جمع حبوب اللقاح من المصائد كل يومين أو ثلاثة أيام .
- رفع مصائد حبوب اللقاح من على مدخل الطوائف لمدة يومين أسبوعيا مع تغذية الطوائف المستخدمة في إنتاج حبوب اللقاح على بدائل حبوب اللقاح و تعويض ما قد ينقص من حضنتها، هذا و قد تجمع الطائفة القوية حوالي 35 كيلوجرام في العام متوقفا على المرعى و نشاط النحل وقوته[10] .

*الشكل (**5.I**):* ***جمع النحالين لحبوب الطلع بواسطة مصائد خاصة .***

ويمكن حفظ حبوب اللقاح بالطريقتين التاليتين :

حبوب اللقاح الطازجة :

تجمع النحلة حبوب اللقاح التي تحوي ما بين 20g-30 ماء لكل 100gمن حبوب اللقاح ، هذه الرطوبة العالية هي وسط مثالي للكائنات العضوية الدقيقة مثل البكتيريا لمنع التلف ، وللحفاظ على جودة العالية لحبوب اللقاح يجب أن تحصد يوميا وتوضع على في المبرد، يتم تجفيف حبوب اللقاح في ظروف ملائمة بحيث يكون المحتوى المائي في حدود 4g-8 لكل 100g تحت هذه الظروف تحتفظ حبوب اللقاح بجودتها لمدة حوالي سنتين [11] .

الشكل (6.I): **تخزين حبوب اللقاح من طرف النحالين .**

حبوب اللقاح الطازجة المجمدة –المجففة :

اخترع(Patrice Perice)(فرنسا) وسجل تقنية تسمح بالحفاظ على كل المواد الغذائية في حبوب اللقاح الطازجة، حيث تجمد حبوب الطلع المجمعة والمحفوظة في أكياس مليئة بالنتروجين مع عدم وجود الأوكسجين لمنع التعفن ، التي تسمح بتقديم حبوب اللقاح نقية قدر الإمكان ، وبالتالي الحفاظ على الخصائص الغذائية والبيولوجية الكاملة [12] .

I. 5 . خصائص حبوب اللقاح :

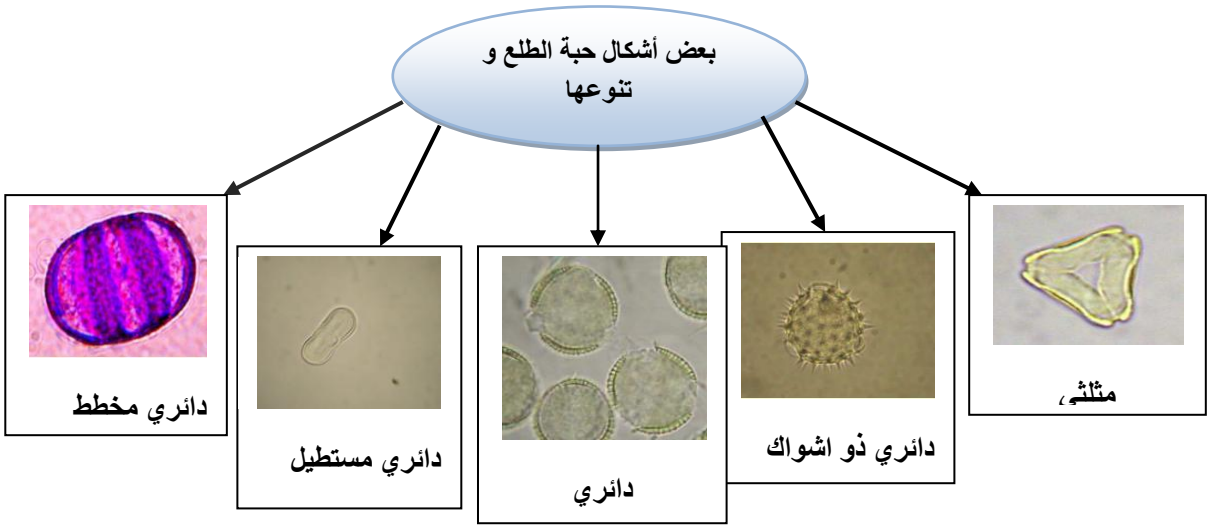
لحبوب اللقاح صفات طبيعية عديدة ومميزة منها اللون ،الرائحة ، الطعم والشكل ...وهذا الإختلاف راجع إلى المصدر النباتي ، فالنحل يرعى في العديد من المناطق ب إختلاف نباتاتها ومناخيها كلها ظروف تساهم في تعدد خصائص حبوب اللقاح .

- **اللون :**

يختلف لونه من الأبيض إلى الأسود، في الغالب أصفر، برتقالي أو بني ولكن العديد من الألوان المختلفة طبقا للمصادر الزهرية [8] .

- **الشكل :**

تتنوع حبوب اللقاح في خصائص الشكل، والحجم، والسطح. وتتكون نتيجة هذا التنوعات حبوب اللقاح المميزة لكل نوع من أنواع النباتات المختلفة. ومعظم حبوب اللقاح مستديرة أو مستطيلة، ويتراوح عرضها ما بين 15 ميكرومترًا إلى أكثر من 200 ميكرومتر، وهذه بعض النماذج لحبوب اللقاح المشاهدة بالمجهر **الشكل** (7.I)،



*الشكل (I.7): **بعض أشكال حبة الطلع و تنوعها.***

حبة اللقاح خلية حية محاطة بغلافين واقيين : خارجي مقاوم وداخلي مرن بينهما طبقة متوسطة وهذه الخلية تحوي سيتوبلازما ونواتين، وبهذا فان حبة الطلع تتركب من ثلاث طبقات:

الطبقة الخارجية : وتتركب من مادة صلبة جدا، وتختلف من نوع إلى أخر من حيث الشكل و التركيب و السمك . فقد تكون ناعمة الملمس أو مُجعَّدة، أو مغطاة بنتوءات أو بثرات. هذه القشرة تمنع الخلايا الداخلية لحبوب اللقاح من الجفاف .

- **الطبقة المتوسطة** :هي طبقة هلامية شفافة على شكل رقائق وظيفتها هذه الطبقة حماية فتحات الإنبات من الجفاف .
- **الطبقة الداخلية** : هي طبقة رقيقة شفافة تحمي وتصون السيتوبلازم خلال النمو و التطور [13] .

I. 6. تصنيف حبوب اللقاح :

يمكن تصنيف حبوب اللقاح وفقا لخاصيتين هما :

I. 1.6. وفقا للمحتوى المائي:

حبوب لقاح النحل: المنتج مجمع في شكله الأصلي، مع محتوى مائي بين 20-30% حيث أن تخزين هذه الحبوب يجب أن يكون في المبرد لتجنب التلوث والتعفن البكتيري .

حبوب اللقاح : المنتج يقدم لعملية التجفيف في درجة حرارة لا تزيد عن 42C° مع محتوى مائي لا يزيد عن 6% .

I. 2.6. وفقا لمصدر محتوى الزهرة :

لقاح نحل أحادي الزهرة : ونقصد بذلك إن مصدر حبوب اللقاح يكون من نوع واحد من الأزهار بما يعادل نسبة تقارب 80% بحيث يمكن استخدام أصناف محددة في أغراض علاجية معينة .

لقاح النحل المجفف: إما هذا النوع فيشمل على العديد من أنواع الأزهار المختلفة وبنسبة متباينة [11] .

I. 7. تركيب حبوب اللقاح :

أثبتت التحليل الغذائية و الصيدلانية بان حبوب اللقاح التي يجمعها النحل من مصادره المختلفة تعد مصدرا جيدا لكثير من الفيتامينات والأملاح المعدنية و الأنزيمات والأحماض الدهنية التي تبعث على النشاط والحيوية لمن يتناولها. وتختلف النسبة المئوية لمكوناتها بإختلاف المصدر النباتي الذي جمعت منها[14]، وفيما يلي الجدول (**1.I**) يوضح هذه المكونات بصورة مجملة [15].

الجدول (1.I): أهم المكونات لحبوب الطلع.

المكون الرئيسي	المحتويات
الماء	11%لحبوب اللقاح الطازجة- 6% لحبوب اللقاح الجافة
المعادن	6%
الهرمونات	هرمون الاستيرون
الفيتامينات	فيتامينات(A,D,C) مجموعة فيتامينات (B1, B2,B6,B12) , تيأسين. بيوتين، انيوستول، روتين.
عناصر غذائية	كربوهيدرات 34%، بروتينات35% ، دهون 5% تقريبا.
أملاح معدنية	كالسيوم ، فسفور، بوتاسيوم، كبريت، صوديوم، كلور، ماغنيسيوم حديد، منجنيز، نحاس، يود، خارسين، سيليكون
أنزيمات	كتاليز، انفرتيز، املیز، ديامتيز، بكتيز، فوسفاتيز .
مساعدات الأنزيمات	سيتوكروم، ايزوميريز، لاكتيك، ديهدروجيتيز.
صابغات	كاروتين، زانتوفيل.
مواد أخرى	أحماض معدنية، أحماض فينولية، جليسريدهات أحادية و ثنائية وثلاثية.

I. 1.7. الماء:

بنسبة تتراوح بين 10- 12% وذلك بالنسبة للحبوب الطازج، و 4% بالنسبة للمجففة (وتمثل 6% أقصى حد ممكن)، وتجفيف حبوب اللقاح يتطلب معدات متخصصة والتي يراعى أن تصل

فيها درجة الحرارة إلى 40C° وهى الدرجة الموازية لحرارة الخلية، وذلك حفظاً على عدم إتلاف بعض المكونات الحيوية التي تتأثر بالحرارة [16] .

I. 2.7. السكريات:

السكريات (الكربوهيدرات) هي واحدة من بين المكونات الرئيسية ،تتمثل أساسا في الفركتوز السكروز و الغلوكوز ، موجودة بكميات متفاوتة و بشكل رئيسي في رحيق النحل الذي يستخدم لجمع حبوب اللقاح في كرايات . يحتوي اللقاح بين 20% و 40% من السكريات المختزلة (الجلوكوز، الفركتوز، المالتوز) . كما أنه يحتوي على ما بين 1% إلى 20% من سكر السكروز [17] .

I. 3.7. الدهون :

و الدهون تحدد ما بين 1% و 5%، و هناك اختلاف كبير في تكوين حبوب اللقاح من الدهون ، وهذا يتوقف على المصدر النباتي ، تكون الدهون بشكل أحادي، ثنائي و ثلاثي غليسريد ، وكمية محدودة من الأحماض الدهنية، ستيرين و هيدروكربونات .لقد أثبتت الدراسات أن اختلاف محتوى الأحماض الدهنية هو نتيجة لتنوع النبات ففي الغالب يحتوي حبوب اللقاح على الأحماض الأمنية الغير مشبعة، لكن هناك استثناءات كحبوب الطلع لعباد الشمس[18] .

I. 4.7. *البروتينات و الأحماض الامنية* :

البروتين ما يقارب ربع كتلة حبوب الطلع، كما يتوفر على كمية كبيرة من الأحماض الأمنية . بحيث تقدر نسبته مابين 11%-35%، وهذه النسبة تختلف وفقا لمصدر حبوب اللقاح و للظروف المناخية ، وخصائص التربة التي تنمو فيها النباتات و الموسم . ويمكن تقدير كمية البروتينات باستخدام طريقة Kjedahl باعتماد معامل(6.25 أو5.6) كما تحتوي حبوب اللقاح 17 حمض أمينيا مختلفا، ويبرز **الجدول** (2.I) أهم هذه الأحماض (معبرا بالنسبة المئوية من مجموع الوزن الجاف) [19،20]:

الجدول ***(2.I)****:* ***كمية أهم الأحماض الامينية في حبوب الطلع .***

الأحماض الأمنية	الكتلة(g/100g)
Cystine	**0.6 g**
Histidine	**1.5 g**
Phenylalanine	**3.5 g**

4.6 g	Threonine
4.7 g	Arginine
4.7 g	Isoleucine
5.6 g	Leucine
6.0 g	Valine
9.1 g	Glutamic acid

I. 5.7.الفيتامينات :

تحتوى حبوب اللقاح على الفيتامينات المختلفة عدا الفيتامين(B12) [12] ،والجدول(3.I) يوضح أهمها:

*الجدول (**3.I**):* **الفيتامينات التي يمكن أن تتواجد بحبوب الطلع .**

الكمية (mg/kg)	الفيتامينات
560-70	Ascorbic acid (C)
7-2	Pyridoxin (B6)
13-6	Thiamin (B1)
20-6	Riboflavin (B2)
20-5	Pantothenic acid
10-3	Folic acid
0.7-0.5	H-Biotin

I. 6.7. المعادن :

المعادن: من المعروف إن نسبة الرماد في أي مادة غذائية تعبر عن محتواها من العناصر المعدنية حيث تحتوى حبوب اللقاح على عدد كبير من المعادن الضرورية لجسم الإنسان، والتي لها دور أساسي في عمليات الأيض الغذائي للخلية، ومن هذه المعادن: الكالسيوم، الماغنسيوم و البوتاسيوم ... [21]، يلخص الجدول (4.I) بعض أهم هذه المعادن ونسبة تواجدها[12].

الجدول (*4.I*): ***تقدير لأهم المعادن الاساسية في حبوب الطلع .***

المعادن	الكتلة(mg in 100g)
Potassium (K)	400 – 2000
Calcium (Ca)	20 – 300
Magnesium(Mg)	20 – 300
Zink(Zn)	3 – 25
Manganese(Mn)	2 – 11
Iron(Fe)	1.1 – 17
Copper(Cu)	0.2 – 1.6
Phosphor (P)	80 – 600
Selenium(Se)	0.05-0.005

I. 7.7.الإنزيمات والخمائر:

تحتوي حبوب اللقاح علي عدد كبير من الإنزيمات والخمائر التي تستخد م كعوامل مساعدة في التفاعلات الكيماوية وخصوصاً الاميليز والانفرتاز و الفوسفاتيز [5]، وهناك دراسات تؤكد وجود 24 أنزيما من مجموعة Oxidoreductrises، و أنزيما من مجموعة Transferases[10] .

I. 8. طرق استخدام حبوب اللقاح :

من الأفضل اختيار حبوب الفعالة. حبوب اللقاح مادة لطيفة تعمل ببطء. والنتائج الأولى لا تظهر إلا بعد أسبوعين أو ثلاثة أسابيع. ولكنها تستمر لعدة أسابيع من بعد التوقف عن العلاج. من المفيد أن يتم أخذ دورتين من العلاج في السنة من حبوب اللقاح: اللقاح المتعددة الألوان لأنها تجمع لقاح أزهار مختلفة وبالتالي تكون ذات خصائص متعددة.ويمكن تناولها بعدة طرق ويمكن استخدام الطريقتين[21]:

- تأكل مباشرة طازجة مع مراعاة مضغها جيدا بعد تحلينها في العسل.
- ولمن لا يرغب بهذه الطريقة يمكنه وضعها مع أي مشروب من عصير الفواكه أو الحليب : توضع الحبوب في السائل، ننتظر عدة دقائق ثم يخفق المزيج ويؤخذ مباشرة دون تركه لما بعد حتى لو في البراد.
- يجب الانتباه إلى عدم طبخ حبوب اللقاح لأنها تخسر معظم عناصرها في نهاية الخريف وفي بداية الربيع. فهذه فترات متعبة للجسم. وكل علاج يجب أن يستمر من شهرين إلى ثلاثة أشهر.

I. 9. الفوائد الطبية والعلاجية لحبوب اللقاح :

أثير الكثير حول هذا الموضوع ، كما قامت أبحاث عديدة في كل البلدان حول المنافع المنوعة للطلع أو حبوب اللقاح . فكل حبة من غبار الطلع هي تركيب معقد لكثير من المواد الغذائية و العلاجية الثمينة جدا ، لأنها تحتوي على مواد أزوتية مثل: الببتيدات ، والأحماض الأمينة بالإضافة إلى مواد سكرية ، و دهنية ، وخمائر، ومعادن ، وفيتامينات وهذه من بين أهم الفوائد العلاجية لحبوب اللقاح[22] :

- تقوى الجسم لكل الفئات العمرية لأنها تحتوى على الأحماض الامينيه والفيتامينات والإنزيمات والعناصر الهامة، علاج أمراض الشيخوخة وفقر الدم وزيادة مقاومة الجسم[23].
- تمنع ترسيب الدهون بالكبد وإزالة الكلسترول من الدم والتخلص من الدهون الزائدة بالجسم لاحتوائها على (اليسين - انوسيتول - نياسين - حمض الفوليك) [22] .
- تساعد على فتح الشهية وتنظيم عمليات التحول الغذائي [24].
- علاج ضغط الأوردة والشعيرات الدموية التي تمنع الإرتشاح لاحتوائها على (روتين – بيوفلافينورات).
- تفيد المرضى الذين يعالجون بالأدوية المشعة لأن حبوب اللقاح تختزل آثار الإشعاع على الدم والجسم[9].
- يضاف العسل إلى حبوب اللقاح لعلاج فيروسات الكبد [25].
- إضافة حبوب اللقاح إلى العسل وغذاء الملكات والبروليس والجنسيح الأحمر تفيد في علاج الأمراض الفيروسية وأمراض الإيدز والأورام الخبيثة[15].
- تستخدم حبوب اللقاح مع العسل كعلاج ناجح لمرضى زيادة حموضة المعدة وحالات قرح المعدة والإثنى عشر كما تفيد أمراض القولون العصبي[26].

خاتمة:

من خلال ما تطرقنا إليه سابقا تعرفنا على حبوب اللقاح تلك العناصر الذكرية لنبات والتي من خلالها تتم عملية التلقيح، و من خلال الأبحاث التي تم إجراؤها حول هذه المادة و التي تعتبر من بين أهم منتجات نحل العسل، حيث يستعمله النحل كغذاء لليرقات و هذا بمزجه مع العسل ليعطي مادة غنية بأهم العناصر

الغذائيِ، فمن خلال الأبحاث الأخيرة تبين لنا أنها تركيبة معقدة من المواد الغذائية التي يحتاجها الجسم لنمو و تطوره.

و لعل من بين أهم هذه المكونات نجد البروتينات بكمية معتبرة، الفيتامينات، السكريات، المعادن، الأحماض الأمينية...، إن هذا التركيب الهائل من المواد جعل من حبوب اللقاح ذات فوائدة صحية متعددة، فهي تقوى الجسم لكل الفئات العمرية، علاج أمراض الشيخوخة وفقر الدم وزيادة مقاومة الجسم، تساعد على فتح الشهية وتنظيم عمليات التحول الغذائي . إضافة حبوب اللقاح إلى العسل وغذاء الملكات والبروليس والجنسيح الأحمر تفيد في علاج الأمراض الفيروسية وأمراض الإيدز والأورام الخبيثة..

المراجع

[1]. البروفيسور عبد الباسط محمد السيد ، موسوعة النحل (تربية – اعجاز – شفاء)، الطبعة الاولى ،ألفا للنشر والتوزيع - جمهورية مصر العربية ،1432ه/2011م،

[2]. كنوز المعرفة والمعلومات العامة. منتجات النحل وإستخدماتها طبي [en ligne] .ديسمبر 2009 ، /http://knozalmarfhoalmalomatalamh.blogspot.com

[3]. طه وهدان مجاهد، النحل امة، الطبعة الأولى، الدار العالمية للنشر والتوزيع –الإسكندرية ، 2007، ص: 283-283 .

[5]. باحثي شركة الندى لتربية النحل (كتاب حبوب اللقاح غذاء و دواء) الإصدار الأول ، 2001.

[7]. د- عبد العزيز بن سعد القرني ، نحل العسل وتربية ومنتجات ، لقاء مربي النحل بحائل، جامعة الملك سعود،2007.

[8]. المهندس الزراعي ناظم مصطفى، العلاج بعسل النحل، منشورات دار الكتاب الحديث، 2003 م،

[9]. د.محمد عباس عبد اللطيف – كتاب عالم النحل ، إسكندرية ، مصر1994.

[13]. سوزان روس، م.م. بسام البركات، ا.د. موسى السمارة، هوية العسل السوري، الجمهورية العربية السورية وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي مشروع تطوير تربية النحل والحرير، تصميم م.م. هدى شلش، دمشق، 2005 .

[14]. منصور عبد الحكيم محمد التداوي و الشفاء بعسل النحل، الطبعة الأولى، دار الكتاب العربي للنشر- دمشق- القاهرة،2008 م ، ISBN:977-376-373-0 .

[15]. فتحي محمد دسوقي _ لقاح النحل – مجلة العلوم التقنية العدد 74 ، 2006 .

[18]. محمد السيد عطية، عسل النحل غذاء ودواء، الطبعة الأولى – دار الغد الجديد-القاهرة- المنصورة، 2009 ،-977 372-237-X:INBS,ص:22-18.

[19]. عارف سالم حمزة، تربية النحل و منتجات الخلية في الغذاء و المعالجة (العسل و الرحيق-الشمع- حبوب الطلع- غذاء الملكة- العكبر سم النحل)، الطبعة الأولى،دار علاء الدين – دمشق،1995، ص : 198.

[20]. أيمن الشربيني، عسل النحل السائل الذهبي و أكسير الحياة ، مكتبة ابن سينا للطباعة و النشر والتوزيع، 1998،-977, 270-461-7:INBS ص:26-27.

[22]. منصور عبد الحكيم- التداوي و الشفاء بعسل النحل- دار الكتاب العربي. دمشق-القاهرة- الطبعة الأولى 2008م ص 115-112.

[23]. عبد الغني وليد ، نحل العسل ومنتجاتها وفوائدها الطبية ، دار الرضوان- حلب - سوريا، 2009 .

[24]. الدكتور احمد بن عبد الله الغمادي، رئيس وحدة أبحاث النحل بجامعة الملك سعود ،منتجات النحل : مصدرها – كيفية إنتاجها – استخداماتها .

[25]. الحسين محمد رضا ، عسل النحل في الطب الحديث و القديم ، الطبعة الاولى ،دار المحجبة البيضاء - بيروت- لبنان ،1999.

[26]، عبد الله ،محمد محمود ، عسل النحل غذاء وشفاء ، الطبعة الثانية دار الكتب العلمية – بيروت- لبنان،2008.

[4].CARLSON,, Wade. HEALTH FROM THE HIVE. USA: Keats Publishing, Inc ,1992,162 p. ISBN 0-87983-581-8 .

[6]. BRADBEAR,, Nicola. Le rôle des abeilles dans le développement rural. Rome: FAO, 2010,284p ISBN 978-92-5-206276-9.

[11]. MariaG.R.Campos, BOGDANOV Stefan, Ligia Bicudo de Almeida Muradian,Teresa Szczesna, Mancebo Yanina, Christian FRIGERIO , Francisco Ferreira , Pollen composition and standardisation of anlytical methods, Journal of Apicultural Resereach and Bee World ,2008,p:157-158-159.

[12]. BOGDANOV, Stefan. Pollen: Production, Nutrition and Health: A Review(en ligne). Bee. Product Science. April 2015 ,www.bee-hexagon.net.p: 21,22.

[21]. Paramàs, A.;Bàrez,A.;Villanova,R.Geographical discrimination of honey by using mineral composition and common chimical quality parameters, Journal of the Science of Food and Agriculture, Volume 80,Issue 1,2000.

الفصل الثاني

الجذور الحرة والفعالية المضادة للأكسدة

تمهيد :

إن كل خلية من خلايا جسم الإنسان تعاني من حوالي عشرة آلاف هجمة من الجذور الحرة في اليوم الواحد ، وهذا الهجوم يتركز في الغالب على المادة الوراثية بالإضافة إلى ذلك فإن الأغشية الخلوية والبروتينات و الدهون تتعرض أيضا للهجوم بواسطة الجذور الحرة وعلى مدى سبعين سنة اعتيادية من عمر الإنسان ، لذا فإن جسم الإنسان يحتاج إلى دفاعات فعالة مضادة للأكسدة في كل الأوقات [2;1] .

II.1 . الجذور الحرة :

II. 1. 1. *تعريف الجذور الحرة* :

الجذور الحرة هي أصناف كيميائية ذرية أو جزيئية مشحونة بشحنة سالبة أو موجبة، تحتوي في تركيبها الالكتروني على إلكترون منفرد (غير مزدوج) أو أكثر، ويكون معظمها شديد الفعالية (تتفاعل بسرعة) مع مركبات أخرى محاولة اقتناص ما ينقصها من الكترونات لتصل إلى حالة الاستقرار الكيميائي [3 ; 4] ، حيث تتولد هذه الأصناف خلال التفاعلات الكيميائية كمركبات وسطية شديدة الفعالية وتنتهي بنهايتها .

إن أغلب هذه المركبات تتولد خاصة من التفاعلات التسلسلية و المتعاقبة وبعض التفاعلات الأخرى مثل البلمرة و التفاعلات الضوئية و تلك المحثة بتسليط الأشعة الكهرومغناطيسية والدقائق الإشعاعية [5].

II. 2.1. أنواع الجذور الحرة حسب استقرارها :

تنقسم الجذور الحرة من حيث استقرارها إلى نوعين :

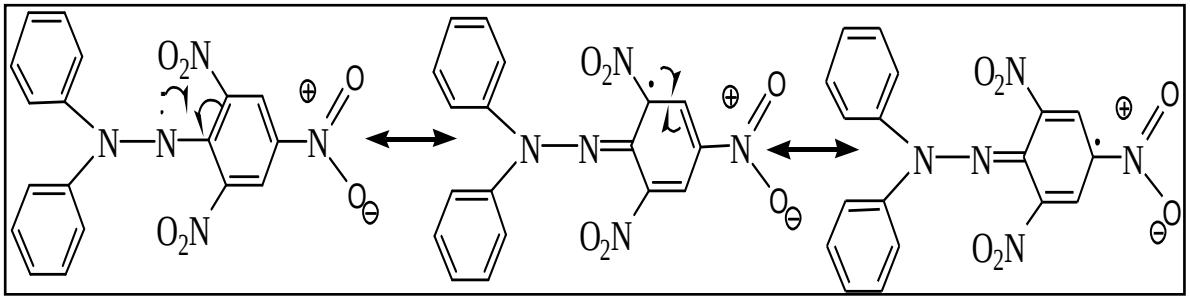
1. الجذور النشطة أو غير المستقرة :

وهي الجذور التي لها أعمار حياة قصيرة جدا أي غير مستقرة في الظروف الاعتيادية , ويشمل هذا النوع من الجذور الحرة ذرا ت الهيدروجين والنيتروجين، الفلور، الكلور، البروم، تقدر أعمار حياة هذه الجذور 10^{-6} (ثانية) أو أقل حتى تصل إلى 10^{-12} (ثانية) تلاحظ تفاعلات هذه الجذور وتشخص حركة تفاعلها بالطرق الطيفية الحديثة [4] .

2. الجذور الصامدة المستقرة :

وهي الجذور الحرة التي لها أعمار حياة طويلة حيث تقدر أعمارها بالثواني أو الدقائق أو الساعات أو حتى أيام ، مثل (DPPH) 2,2'-diphényle-1-picryle hydrazyle فهو عبارة عن مادة صلبة ذات لون بنفسجي مسود ويكون مستقر لعدة أيام.

ونستطيع القول بأن معظم الجذور الحرة الأروماتية التي بها التراكيب الرنينية تكون مستقرة في أغلب الأحيان , ويعزى استقرار هذا النوع من الجذور لعدم تمركز الإلكترون المنفرد بموقع معين في تركيب الجذر أي ينتقل من موقع إلى آخر على طول تركيب الجذر كما هو الحال في DPPH [9;8] .



***الشكل (1.II):*يوضح التراكيب الرنينية في جزيء DPPH**

3.1.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 ومع ذلك فالمعدل الحقيقي للتفاعل يعتمد على سرعة تقابل الوحدتين مع بعضهما البعض.
ومثل هذه التفاعلات توصف بأنها محكومة بالإنتشار وتنطوي خطوة الإيقاف في كثير من التفاعلات المتسلسلة على هذا الطراز من الاتحاد بين الجذور السريعة [10].

II. 4.1 . 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 رنين الإلكتروني، أما الجذور المستقرة نسبيا فيمكن متابعة حركية تفاعلاتها في الطرق التقليدية مثل قياس التغير بالتوصيلة الكهربائية بوحدة الزمن، أو التغير بالتركيز المولاري بوحدة الزمن،ولكن أدق هذه الطرق هي قياس تغير كثافة الضوء الممتص بوحدة الزمن بواسطة أجهزة قياس أطياف الأشعة فوق البنفسجية– المرئية (UV-Visible) [11] .

II. 2. مضادات الأكسدة

II. 2 .1. تعريف مضادات الأكسدة :

كثيرا ما نسمع بمصطلح " المواد المضادة للأكسدة"، ولكن الكثيرين منا لا يعلم بالضبط ما هي المواد المضادة للأكسدة أو السبب في أنها مهمة . والمواد المضادة للأكسدة هي مركبات كيميائية تتواجد بكثرة في الأطعمة النباتية [16] .

وكلمة (مضاد للأكسدة) : يعني يمنع التأكسد ، والأكسدة تحدث عند تواجد الكثير من الجذور الحرة في جسم الكائن الحي . والجذور الحرة في الخلية تكون عبارة عن جزيئات تحتوي على أكسجين فقد إلكترون . ولاستبدال الإلكترون المفقود تأخذ من جزيء آخر، والذي يصبح بعد ذلك من الجزيئات الجذرية الحرة نفسها ، إنها حلقة مفرغة. حيث هنا المواد المضادة للأكسدة توفر الجذور الحرة مع الإلكترون المفقود حتى لا يوجد جزيء يأخذ من آخر، وبالتالي تتوقف الدورة [17; 7] .

وتعمل مضادات الأكسدة بالدرجة الأولى كمانحات للهيدروجين أو مستقبلات للجذور الحرة [18] ; أو أنها تتحد مع الجذر وتحوله إلى مركب مستقر كما هو موضح في الآلية التالية:

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

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

II. 2.2. *مصادر مضادات الأكسدة* :

لاشك 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 . نأخذ على سبيل المثال زيت الزيتون الذي يعتبر معالجا لتسمم الناتج عن تناول الأغذية الفاسدة أو الناتج عن عضة الأفعى ، و الرمان والزبيب على منح الجسم القوة والحيوية و إكساب الوجه نضارة وجمالا، وهناك قائمة طويلة من الأطعمة التي عرفها الناس منذ القدم واكتشفوا قيمتها واستعمالاتها الطبية [19] .

II. 3.2. تقسيم مضادات الأكسدة :

ويمكن تقسم مضادات الأكسدة من حيث مصادرها إلى الطبيعية والمصنعة.

مضادات الأكسدة الطبيعية :

مضادات الأكسدة الطبيعية هي الطريقة الأفضل لإمداد الجسم بالحماية اللازمة ضد ضرر الشوارد ومضادات الحرة منها وسائل دفاع طبيعية ذاتية داخلية مثل إنزيمات(Peroxydases, catalases) و مضادات أكسدة خارجية وهي عوامل مضادة للأكسدة تستخرج من الغذاء و ابرزها الفيتامينات نذكر منها : الفيتامين E، الفيتامين C ، الزنك ،السيلينيوم و البيتاكاروتين، ومما سبق يمكن أن نعرف مضادات الأكسدة بأنها مواد داخلية المصدر أو خارجية تستطيع أن تعدل أو تصلح الإتلاف الذي سببته الجذور الحرة [20] .

مضادات الأكسدة المصنعة :

تعتبر عنصر أساسي يجب إضافته للأطعمة المعلبة للتقليل من فسادها إلى أقصى حد وذلك لتأكسدها قبل غيرها، منها butylhydroxytoluene (BHT) tetra-α -butylhydroxyanisole (BHA) propylée gallate (PG) butylhydroquinone (TBHQ) المركبات واسعة الاستعمال في الصناعة الغذائية، لأنها فعالة وقليلة التكلفة بالمقارنة مع المضادات للأكسدة الطبيعية وغير السامة، و لكن لها أضرار جانبية على المدى البعيد لذلك تم التخلي عنها في كثير من الدول [20] .

II. 4.2. آلية عمل مضادات الأكسدة :

تعمل مضادات التأكسد الأولية على إعاقة وقطع تفاعلات الانتشار وبالتالي تبطئ عملية التأكسد وتعود لتتسارع عند نفاذه، تعد متعددات الفينول من أهم مضادات التأكسد وخاصة تلك التي تحمل زمرتي هيدروكسيل أو زمرة هيدروكسيل ومستبدل في المواقع اورتو(ortho) أو بار (para) ، وهي فعالة بالتراكيز المنخفضة .

حيث أن المراحل الأساسية للأكسدة عن طريق الجذور الحرة تظهر في سلسلة التفاعلات المتمثلة في المرحلة الابتدائية والانتشار والمرحلة النهائية[21]، ويتم التفاعل في وجود عوامل خارجية مثل الضوء والحرارة أو المواد الكيميائية[22] ،موضحة كما يلي:

مرحلة الابتدائية :

$$R^{\bullet} + O_2 \longrightarrow ROO^{\bullet}$$

مرحلة الانتشار :

$$ROO^{\bullet} + RH \longrightarrow ROOH + R^{\bullet}$$

$$RO^{\bullet} + RH \longrightarrow ROH + R^{\bullet}$$

مرحلة النهائية :

$$R^{\bullet} + R^{\bullet} \longrightarrow R{-}R$$

$$R^{\bullet} + ROO^{\bullet} \longrightarrow ROOR$$

$$ROO^{\bullet} + ROO^{\bullet} \longrightarrow ROOR + O_2$$

$$Antioxidants + O_2 \longrightarrow Oxidized\ antioxidans\ (Borek\ 1991)$$

II. 5.2. *الحالات* المرضية ذات العلاقة بالمواد المؤكسدة :

الاجهاد التاكسدي عبارة عن حالة من عدم التوازن بين العوامل المحثة للتاكسد و العوامل المضادة للاكسدة . في الحالة الطبيعية تكون العوامل المؤكسدة مثبطة بتأثير الدفعات ضد الاكسدة ،اما في حالة انتاج المواد المؤكسدة فيمكن ان يسبب اختلال في هذا التوازن مؤديا بذلك الى امراض عديدة امراض القلب و الاوعية الدموية والسرطان ... [15] . ويمكن تلخيص اهم الفوائد الاساسية لمضدات الاكسدة في النقاط التالية [23] :

- تحارب الاكتئاب.
- يمنع حدوث الطفرات في الخلايا، ويقي من السرطانات وتّكون الجلطات، والالتهابات.
- ينشط الدورة الدموية ، يزيد توارد الأكسجين للمخ وجميع أجزاء الجسم.
- إنقاص الوزن وحرق الدهون، كما يساعد على تنظيم سكر الدم ومستويات الأنسولين.
- يحمي جهاز المناعة عن طريق منع تكون الشقوق الحرة التي يمكن أن تسبب تلفاً وآثار بالجسم.
- يحافظ على حيوية البشرة.

II. 3. الفعالية المضادة للأكسدة :

قدرة إجمالي الفعالية المضادة للأكسدة (TAC) هي أداة صلة في تحقيق العلاقة بين مضادات الأكسدة الغذائية والأمراض الناجمة عن الأكسدة، هذا ما أكدته البيانات التي تم الحصول عليها من الدراسة الحديثة، وهناك العديد من الطرق التحليلية المختلفة لتقييم القدرة المضادة للأكسدة [24] .

- **طرق تقدير الفعالية المضادة للأكسدة:**

إزاء كل هذه المستجدات والأبحاث العلمية، تطلب الأمر إيجاد طرق جديدة لتقدير الفعالية المضادة للأكسدة تكمل الطرق الكلاسيكية دون أن تلغيها، هذه الطرق حددت في مختبرات التحليل[25] ; حيث اختيرت هذه الطرق حسب وصفها لطبيعة ووظيفة العينة. وبصورة عامة يمكن تصنيف الطرق الكلاسيكية [26] إلى :

- الطرق الكهربائية.
- الطرق الكروماتوغرافية.
- الطرق الطيفية.

وقد أمكن تحقيق ذلك بظهور طرق أخرى حديثة حساسة، ومجالات حدود الكشف فيها ضعيفة وتتطلب 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 واسعة في تطبيقاتها وبشكل سريع في شتى المجالات التكنولوجية[27 ;28].

الخاتمة:

في هذا الفصل تم التطرق إلى التعريف بالجذور الحرة وهي أصناف كيميائية ذرية أو جزيئية مشحونة بشحنة سالبة أو موجبة، تحتوي في تركيبها الالكتروني على إلكترون منفرد (غير مزدوج) أو أكثر، ويكون معظمها شديد الفعالية (تتفاعل بسرعة)محاولة اقتناص ما ينقصها من الكترونات لتصل إلى حالة الاستقرار الكيميائي، وهي تتعدد من حيث أنواعها و آلية تفاعلها.

كما تطرقنا إلي مضادات الأكسدة و التي لها دور مهم في كبح و تثبيط أكسدة الجذور الحرة ولها أنواع عديدة فمنها الطبيعية والمصنعة . فوائدها و طرق تقديرها .

المراجع

[2]. خضرة عزري ، دراسة الليبيدات والفينولات في بعض أنواع التمر المحلي ، مذكرة تخرج لنيل شهادة الماجستير ، الكيمياء جامعة قاصدي مرباح , ورقلة ، 2013 ،

[3]. د. علي عبد الحسن سعيد " كيمياء الجذور الحرة" دار المسيرة للنشر و التوزيع والطباعة - الأردن- 2001 الطبعة الأولى ص 192.

[5]. م. بوقوادة " دراسة فيتوكيميائية لليبيدات والفينولات في بعض أنواع نوى التمر المحلي" مذكرة ماجيستير، جامعة قاصدي مرباح ورقلة ، 2008.

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

[7]. د .ى.ل.على " الأسس الإلكتروني لميكانيكية التفاعلات العضوية " الطبعة الأولى 2002 دار الفجر للنشر و التوزيع.

[8]. الصديق قمولي دراسة كهروكيميائية لفينولات نوى التمر المحلي , مذكرة ماستر، كيمياء مطبقة ، جامعة قاصدي مرباح ورقلة (2011) .

[10] . د.ستانلي ه. باين، دونالدج.كرام، جيمس ب. هندريكس، جورج س. هاموند: ترجمة د. أحمدي عبد العزيز ياسين، جمال حسين تمام، محمد علي خليفة، الكيمياء العضوية-المجلد الثاني، دار ماكروهيل للنشر الطبعة الرابعة 1983.

[11]. ال دبليور.اوراند،اي اي وودز ،ترجمة د.عادل جورج ساجدي ،د. علاء يحي محمد على ،كيمياء الاغذية ، جامعة البصرة . الطبعة الاولى 1983 .

[12]. د .باسل كامل دلالي ،د. كمال الركابي ، كيمياء الاغذية ،دار الكتب للطباعة و النشر جامعة الموصل 1981 .

[13]. د.رضوان صدقي فرج ،كيمياء الليبيدات ،مركز النشر لجامعة القاهرة ،1991.

[14]. د.ب.كامل ،د.ك.الركابي، الكيمياء الغذائية ،،مكتبة الوطنية ببغداد ،1981.

[16]. نشرة علمية إعلامية فصلية، المجلد الثاني و العشرون، العدد 2010.

[19]. بن مرعاش ع ,.دراسة نواتج الأيض الثانوي الفلافونيدي و الفعالية المضادة الأكسدة للنبتة Convolvulus supinus Coss. & Kral. (Convolvulaceae) .مذكرة مقدمة لنيل شهادة

الماجستير في الكيمياء.جامعة منتوري قسنطية.الجزائر.2012. ص 136 .

[20]. د. بشرى بشير ، التغذية و الصحة ، الإدارة العامة للتغذية بوزارة الصحة السعودية 2003 .

[1] . C.Enrique, P.Lester."Handbook of Antioxidants",2éme ed , NewYork. Basel. Marcel Dekker ,Ine.2002.

[4]. Halliuell , B . and Gutteridge , J . M . C. , Oxygen toxicity , oxygen radicals transition metals and disease , REVEWARTICLE ,Biochem. J . 219 ; (1984),pp 1-14.

[9]. Re db, N. I., Le Goff, L .K., Had-Aisouni. L. (2005). Stress oxidatif cérébral : les astrocytes sont-ils vulnérable aux faibles concentrations intracellulaires de glatamate ? Implication sur la survie neuronale. Ann. Fr. Anesth. Réanim. 24, 502-509.

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

[17]. Litescu SC, Sandra AV, Eremia SAV, Diaconu M, Tache A, et al. (2011) Biosensors Applications on Assessment of Reactive Oxygen Species and Antioxidants. Environmental Biosensors. In Tech Rijeka Croatia.

[18]. HILCENT.R, « chimie organique hétérocyclique », (2003), EDP. Sciences.

[21]. Antolovic M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S and Robards K (2002) Methods for testing antioxidant activity. Analyst 127: 183–198.

[22]. Kanner J, German JB and Kinsella JE (1987) Initiation of lipid peroxidation in biological systems. Crit Rev Food Sci Nutr 25: 317-364.

[23]. C.BERSET, M.E. CUVELIER. Sci.Aliments, 16(1996)219-245.

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

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

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

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

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

الفصل الثالث

المركبات الفينولية الطبيعية

تمهيد :

في الآونة الأخيرة اهتم الكثير من الباحثين بالاستخلاص المواد الفعالة من النباتات لما لها من منفعة كبيرة [1]، ففي الوقت الراهن تشكلا حقلاً دراسيا شاسع الأطراف من ناحية تعددها وتباين استخدامها. إن هذه المركبات الكيميائية تنتمي إلى مجموعات كيميائية مختلفة جدا مثل القلويدات التربينات و الفينولات ... الخ، و كل من هذه الأخيرة لها العديد من الأقسام و التصنيفات [2].

تشكل المركبات الفينولية المستخلصة من النباتات حيزا كبيرا في حقل المنتجات الطبيعية نظرا لكثرة عددها و لتباين هياكلها ،[3] في بحثنا هذا سوف ينصب اهتمامنا بدراسة هذه المركبات و مدى فاعليتها .

III. 1. تعريف المركبات الفينولية الطبيعية :

المركبات الفينولية تراكيب متعددة حيث أنها تشكل مجموعة من العائلات يصعب تفكيكها إلى مركبات بسيطة و تشارك في الدفاع ضد الأخطار البيئية ، من أجل هذا فإن نسبة 80% من هذه المركبات توجد على مستوى أنسجة القشرة للفواكه. وعموما يرجع لون النبات والثمار إلى الصباغات في المركبات وهي المسؤولة عن ظهور الألوان (أصفر، أخضر، برتقالي، أحمر) في النبات [4] .

الفينولات ثاني مجموعة من المشتقات الثانوية للنبات وهى مواد تحمل في تركيبها وضيفة الهيدروكسيل واحدة على الأقل على حلقة البنزين العطرية،[5] 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 [6] .

البوليفينول "متعدد الفينول"هي مركبات التي لديها أكثر من وضيفة هيدروكسيل الفينولية مرتبطة بحلقة أو أكثر من حلقات البنزين . من ضمن البوليفينولات نجد الفلافونويد و أنثوسيان و بروسيانيدين ،

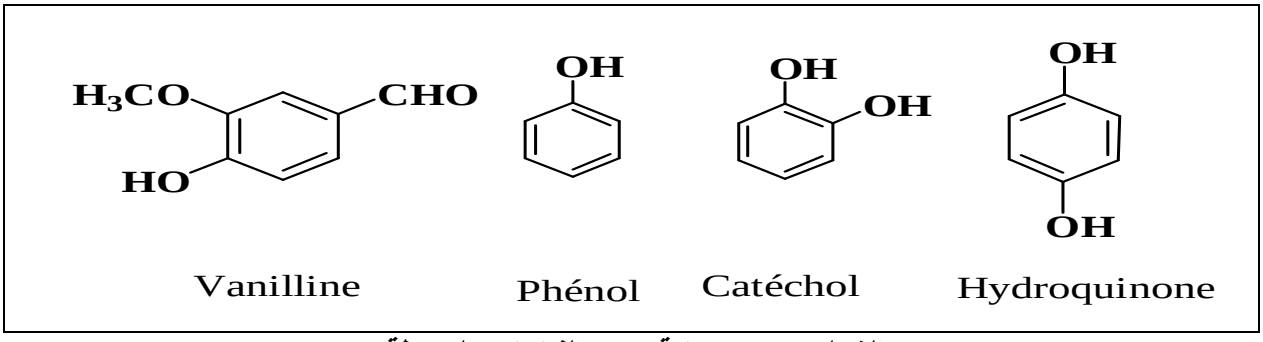
حيث تختلف أقسام عديدات الفينولات حسب درجة تشبعها و أكسدتها (وجود الأكسجين) في الحلقة الوسطى [7] . تشترك جميعها في وجود حلقة عطرية أو أكثر [8].

III. 2. دراسة تصنيف المركبات الفينولية الطبيعية (أقسامها):

الفينولات تغطي مجموعة كبيرة ومتنوعة من المركبات الكيميائية . هذه المركبات يمكن تصنيفها تبعا لتواجدها وتعقيداتها وحسب Harbone و Simmonds (1964) [11]. بحيث يضم قسم المركبات الفينولية حوالي 8000 مركب مقسمة إلى عدة أصناف منها مايلي: الفينولات البسيطة ، الأحماض الفينولية ، الكومارينات ، اللقنين، التانينات(العفصيات) والفلافونويدات تمثل المركبات الفينولية بهياكل كبيرة جدا وذات بني متعددة [12] .

III. 1.2. الفينولات البسيطة :

والتي تحوي حلقة عطرية مرتبطة بواحدة أو أكثر من مجموعات الهيدروكسيل ومن ضمنها الفينول نفسه ، ومركبات أخرى قليلة الانتشار في الطبيعة منها ما يلي [13]:



الشكل (1.III): بنية بعض الفينولات البسيطة.

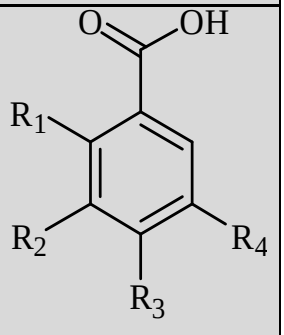
III. 2.2.الأحماض الفينولية :

اللفظة(acide phenol) يمكن أن يطلق على المركبات العضوية التي تمتلك على الأقل وظيفة كربوكسيلية ومجموعة هيدروكسيل فينولية. القسمين الأساسين في هذه المجموعة هما : أحماض الهيدروكسي بنزويك ، وأحماض الهيدروكسي سيناميك [5] .

الأحماض الفينولية المشتقة من حمض البنزويك :

تمتلك الأحماض الفينولية الهيكل (C_6-C_1) والمشتقات الهيدروكسيلية لحامض البنزويك تعد واسعة الانتشار سواء مرتبطة أو حرة أو في حالة سكريات أو أسترات (حمض الغاليك) [14].

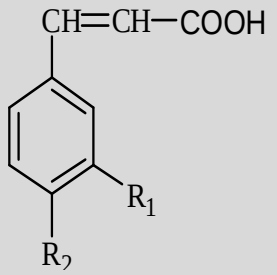
الجدول (1.III): الأحماض الفينولية المشتقة من حامض البنزويك.

الاحماض الفينولية	R4	R3	R2	R1	الهيكل الاساسي
Acide benzoïque	H	H	H	H	
Acide p hydroxylbenzoïque	H	OH	H	H	
Acide protocatechique	H	OH	OH	H	
Acide vanillique	H	OH	OCH_3	H	
Acide gallique	OH	OH	OH	H	
Acide salicylique	H	H	H	OH	

الأحماض الفينولية المشتقة من حمض السيناميك :

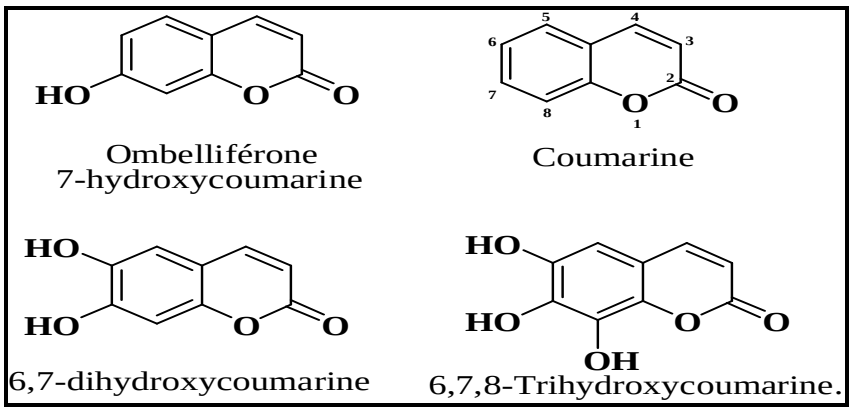
أغلبية الأحماض الفينولية من الهيكل(C_6-C_3) وهي أحماض الكوماريك ، الكافييك ، الفيريليك (Caféique, ferulique) ذات الانتشار الواسع ، أما بقية الأحماض الأخرى مثلp-coumarique تعد الاقل تكرارا ونادار ما تكون حرة ، وهي في اغلب الاحيان استرات مصنعة [15] .

الجدول (2.III): الأحماض الفينولية المشتقة من حامض السينامیك.

الأحماض الفينولية	R_2	R_1	الهيكلة الأساسية
Acide cinnamique	**H**	**H**	
Acide p coumarique	**OH**	**H**	
Acide caféique	**OH**	**OH**	
Acide férulique	**OH**	**OCH_3**	
Acide sinapique	**OCH_3**	**OH**	

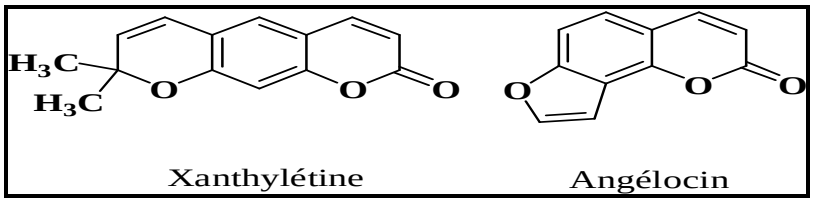
III. 3.2.الكومارينات :

الكومارينات هي عبارة نواة بنزينية وحلقة سداسية بها ذرة أكسجين ، الكومارينات الحرة تذوب في الكحولات والمذيبات العضوية ، كما هو الحال في مجموعات (dioxydes d'éthyles) أو المذيبات المحتوية على الكلور[16] .



الشكل (2.III): بعض النماذج الكومارينات.

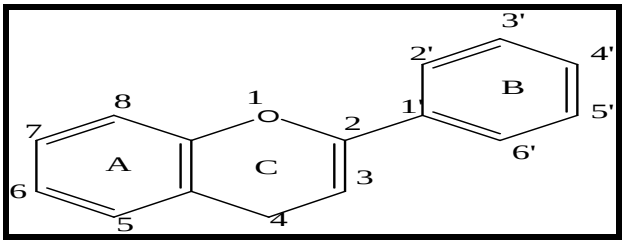
فيما يلي صيغ بعض الكومارينات:



الشكل (3.III): صيغ بعض الكومارينات.

III. 4.2.الفلافونويدات :

إن الفلافونويدات (أصل كلمة فلافونيد هي يونانية تعني اللون الأصفر(Flavus)) تعتبر من أهم مجموعات المركبات حيث تم عزل و تحديد أكثر من 6400 مركب فلافونويدي، وهذا من أنواع مختلفة من النباتات ، وهي عبارة عن صبغات متواجدة في النباتات و تنتشر في أجزائها النباتية المختلفة من جذور و خاصة الأوراق و الزهور إذ تنسب لها خاصية تلونها ، أما على مستوى الخلية فتتواجد بشكل إثيروزيدات ذوابة في الماء متمركزة في حويصلة الخلية، و بشكل أجليكونات في الأنسجة السطحية للأوراق، أما عديدة الميثوكسيل فتتواجد في سيتوبلازم الخلية تحتوي جميع الفلافونيدات على " 15 " ذرة كربون في هيكلها الأساسي موزعة على شكل " C_6-C_3-C_6 " حيث تمثل كل (C_6) حلقة بنزينية [17;5] .

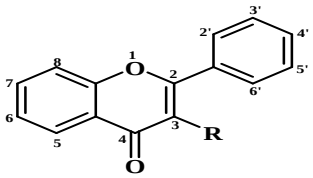
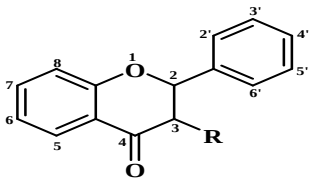
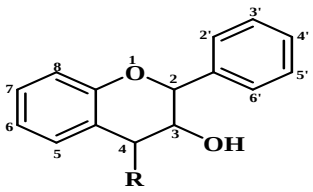
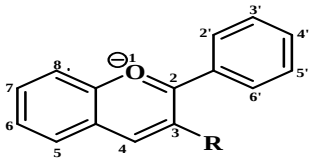


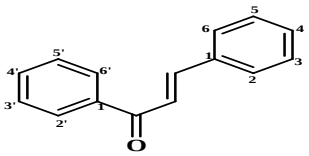
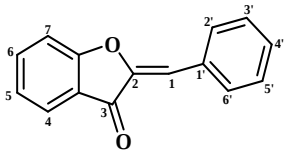
الشكل (4.III): الهيكلة الأساسية للفلافويد .

- **أصناف الفلافونيدات:**

تنقسم الفلافونيدات إلى عدة أصناف . وأكثرها إنتشارا الفلافونات (Flavones) و الفلافونولات (Flavonols) وهي مركبات متماثلة في الهيكل الرئيسي ويكون الاختلاف في الموقع C_3 , إذا كان غير مستبدل فهنا يكون الفلافون أما إذا كان مستبدل ب OH أوOR فلافونول أو فلافونول مستبدل على الترتيب ، وفيها تكون الحلقة A مستبدلة بمجموعة هيدروكسي حرة في المواقع C_5 وC_7 بنسبة 90% أما الحلقة B فتكون مستبدلة في الموقع C_4 بنسبة 50% [18] . والجدول التالي يلخص أهم أنواع الفلافانويدات متواجدة في الطبيعة.

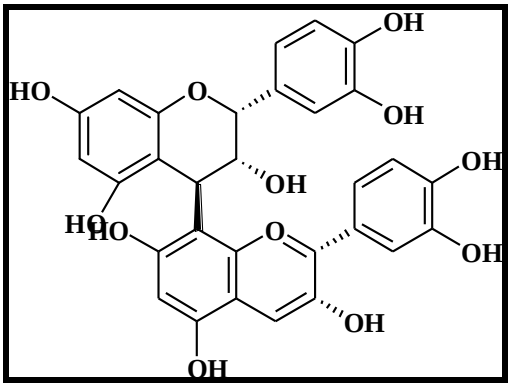
جدول (3.III): تصنيف الفلافونويدات.

المشتقات	البنية	اسم العائلة	توزيع الOH	الاسم
2-phenyl chromone		R = H Flavone	5, 7, 4’ 5, 7, 3’, 4’	Apigenin Luteolin
		R=OH Flavonol	5, 7, 4’ 5, 7, 3’, 4’	Kaempferol Quercetin
		R = H Flavanone (dihydroflavone)	5, 7, 4’ 7, 3’, 4’	Naringenin Butin
		R=OH Flavanonol (dihydroflavonol)	7, 3’, 4’ 5, 7, 3’, 4’	Fustin Taxifolin
2-phenyl chromanes		R = H Catechin (flavonol-3)	5, 7, 3’, 4’, 5’ 5, 7, 3’, 4’	Gallocatechin Catechin
		R=OH Leucoanthocyan din (flavandiol-3,4)	5, 7, 3’, 4’ 5, 7, 3’, 4’	Leucocyanidi n Leucodelphini din
Flavyliums		R = H Flavylium (Anthocyan)	5, 7, 4’ 5, 7, 3’, 4’	Apigenidin Luteolidin
		R=OH (Anthocyanidin)		Cyanidin Delphinidin

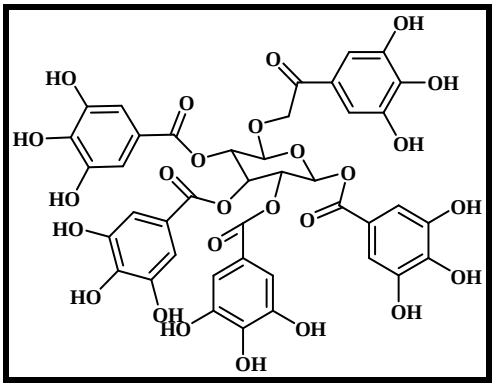
Chalcone		Chalcone	2', 4', 3, 4 2', 3', 4', 3, 4	Butein Okanin
Aurone		Aurone	6, 3', 4' 6, 7, 3',4'	Sulphuretin Maritimetin

III. 5.2. التانينات(العفصيات) :

التانينات هي المركبات المستخدمة في الدباغة والتي لها خاصية تحويل جلود الحيوانات الطرية إلى الجلود غير قابل للتعفن وقليلة النفاذية ويعزى ذلك على قدرتها على الإتحاد مع البروتينات،[19] وهي نوعان: التانينات المتراكمة هي الأكثر إنتشارا وهي ناتجة من البلمرة لجزيئات أولية تمتلك البنية العامة للفلافونيدات[20] ، التانينات المتحللة هي عبارة عن جزيئات متعددة أسترات لسكر(عديد الهيدروكسي)وعدد متغير من جزيئات حمض الفينول .



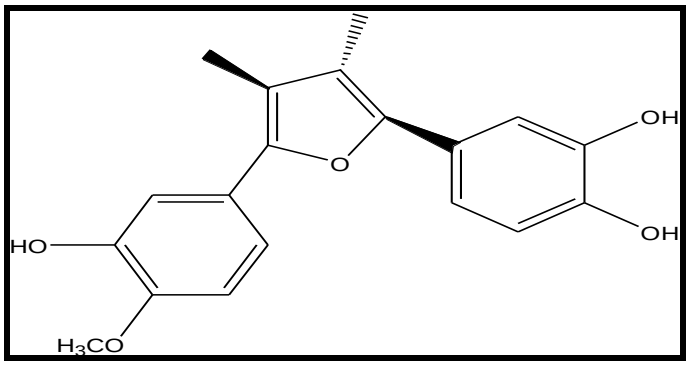
الشكل (5.III): وحدة التانينات المتراكمة.



الشكل (6.III): وحدة التانينات المتحللة.

III. 6.2. الليقنين :

هي بوليميرات ذات بنية منتظمة غير أنها كارهة للماء بشدة ,مكونة أساسا من وحدات فينيل بروبان $C_6 - C_3$وهي كذلك شق غير سكري للأغشية الخلوية وهي قليلة التواجد في الخضر والفواكه والأنسجة النباتية المتناولة من قبل الإنسان [21] .



3,3,4- trihydroxy- 7,7- epoxylignane

الشكل (7.III): التركيب البنائي للقنين .

III. 3.أهمية الفينولات و الفلافونيدات:

الفينولات :

يمكن تلخيصاهم فوائد الفينولات في النقاط التالية :

لها دور مهم الوقاية من الأمراض التي تسببها البكتيريا و الفطريات فهي مضادات حيوية ،وبعض النباتات تفرز مركبات فينولية على مستوى الأوراق والجذور كمواد سامة ضد نمو النبتات المتطفلة. [19]

لها أهمية كبيرة في الصناعات الغذائية حيث تستعمل كمضادات للتأكسد ومثبطات للإنزيمات ، كما يتم استعماله في صناعة مواد التجميل حيث تحمي البشرة الخارجية من الأشعة فوق البنفسجية [22] .

تملك خصائص علاجية متنوعة إذ تؤدي دورا كبير في ميدان الطب والصيدلة لما لها من تأثيرات ايجابيق فهي مضادة للالتهابات، منها مثبطة ومنها محفز للإنزيمات، مضادة للأورام [23] .

الفلافونيدات :

تم إجراء دراسات مكثفة حولها، ففي المجال الطبي أظهرت فعاليات مختلفة منها ما هو مضاد للسرطان، مضادة للفيروسات، معالجة العلل الخاصة بالمرض السكري، حيث تعمل على تقوية الجهاز المناعي وزيادة في النشاط المضاد للورم، هذه الميزات العلاجية أعطتها أهمية بالغة في الصناعة الصيدلانية [24].

III.4.الخصائص الكهروكيميائية للفينولات :

ان النشاط المضاد للأكسدة عند الفينولات يعتمد على الخاصية الإرجاعية لهذه المركبات والمرتبطة بدورها بعدد مجموعات الهيدروكسيل التي يمتلكها الجزئي ووجود مجموعة الكربوكسيل ،حيث تتأكسد مجموعة لتعطي زوج الكتروني وذرتي هيدروجين [25].

$$Red \longleftrightarrow Ox + H^{+} + é$$

حيث :

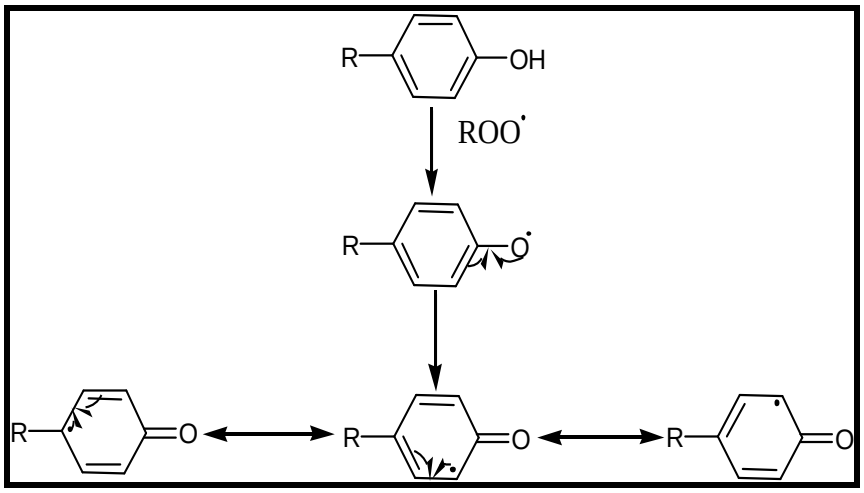
Red : المركب الفينولي المضاد للأكسدة (عامل مرجع) .

Ox : الناتج (المؤكسد) .

إذ هناك علاقة تداخل بين الإلكترونات المتحركة للحلقة وإلكترونات الأزواج الحرة لذرة الأكسجين حيث يلعب الأكسجين دورا ميزوميريا مانح (M+) للإلكترونات، وعليه فنقصان الكثافة الالكترونية تعمل على اجتذاب إلكترونات الربط الهيدروكسيلية نحو الأكسجين، وكنتيجة لذلك فإن الحلقة البنزينية تعمل على تسهيل انفصام الرابطة بين O وH بخلاف انفصام الرابطة بين O وC التي تكون أكثر صعوبة.

فسهولة الرابطة بين H-O تجعل هيدروجين الوظيفة الفينولية متحرك مما يمنحه الخاصية الحمضية شأنه شأن الحمض الضعيف. وحامضية الوظائف الفينولية يمكن أن تتغير كثيرا تبعا للبنية العامة للجزئية فعلى سبيل المثال: 2,4,6 trinitrophénol يعتبر حمضا قويا (pH=0.71) وهكذا نجد أن مجموعة الكربونيل (C=O) في المركبات (flavonol وFlovone) ذات تأثير ميزوميري ساحب (M-) لإلكترونات الحلقة البنزينية تزيد من استقطاب الرابطة O-H وبالتالي حركية H أي خاصية الحمضية [5]، كما أن وجود مستبدلات مختلفة في الحلقة سوف يؤثر على استقطاب الرابطة O-H ويغير من قيمة القدرة الإرجاعية.

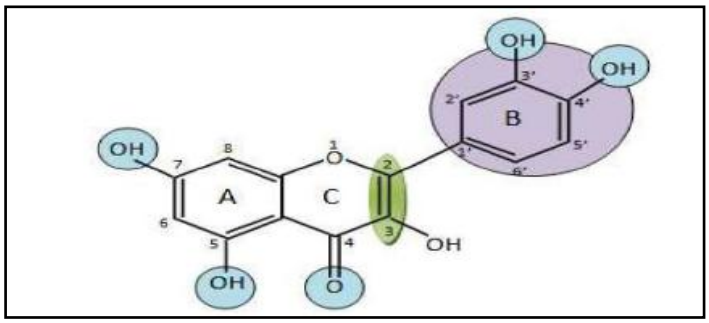
بصفة عامة إن أول خطوة في أكسدة المركب الفينولي هي تشكل جذر الفينوكسيل (phenoxyl) الغير مستقر والذي يلعب دور مركب وسيط يمكنه أن يشارك في تفاعلات اقتران، إعطاء البروتونات أو هجوم نيكلوفيلي الشكل **(8.III)**[27;26].



الشكل (8.III): اكسدة المركبات الفينولية .

III. 5. الفلافونيدات والنشاط المضاد للأكسدة :

يعود التأثير المضاد للأكسدة للفلافونيدات إلى وجود علاقة بين البنية الكيميائية للفلافونيد ونشاطها المضاد للأكسدة، و قد أدت الأبحاث التي أجريت على النماذج المخبرية و التي اهتمت بالعلاقة بين البنية الكيميائية للفلافونيد و نشاطه المضاد للأكسدة إلى التوصل و التعرف على المجاميع و المواقع النشطة في الآلية المضادة للأكسدة [28] .



الشكل (9.III): المواقع الفعالة في النشاط المضادة للأكسدة للفلافونويدات [29].

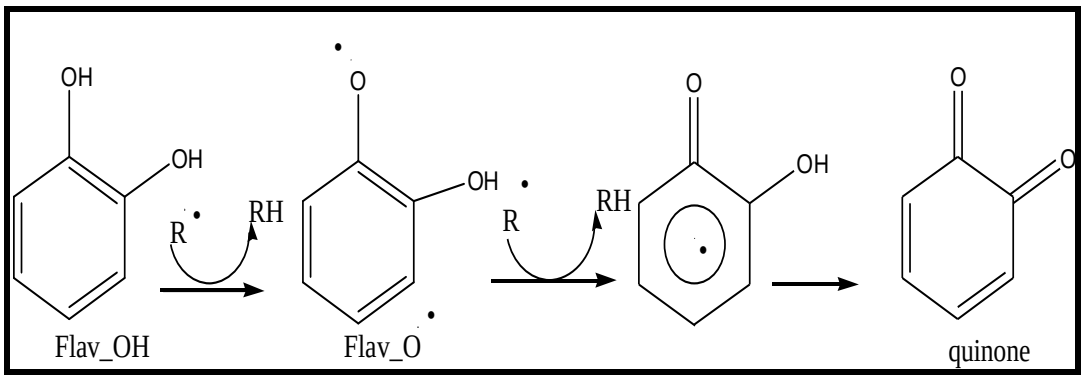
آلية الفلافونيدات المضادة للأكسدة :

تعمل الفلافونيدات على الوقاية من الإجهاد التأكسدي و بإمكانها أن تمنع الإصابات الناتجة عن الجذور الحرة بعدة طرق منها :

- الاقتناص المباشر للجذور الحرة .
- تثبيط الإنزيمات المولدة للجذور الحرة .
- تنشيط و تجديد الأنظمة المضادة للأكسدة.

تفاعل الفلافونيدات مع الجذور الحرة :

تملك الفلافونيدات بنية خاصة تمكنها من التفاعل مع الأنواع الجذرية و إعطائها إستقرارية أكبر،حيث تقوم الفلافونويدات (Flavon-OH) بإرجاع الجذور الاكسجينية (R•) مثل :· 02 – · LOO – · OH – · LO و ذلك بنقل الهيدروجين أو إلكترون **الشكل** (8.III) ، تتفاعل النواتج الجذور (الفلافونويدية) كما تتعرض الفلافونويدات المؤكسدة مع بعضها لإنتاج بنية quinine مستقرة إلى عدة تغيرات بعد امتصاصها منتجة بذلك أشكال مختلفة التي بإمكانها أن تعمل كعوامل مرجعة و مزيحة للجذور الحرة [30] .



الشكل (10.III): *آلية تفاعل الفلافنويدات مع الجذور الحرة .*

الخاتمة :

في هذا الفصل تم التعرف على المركبات الفينولية و هي مواد تحمل في تركيبها وظيفة هيدروكسيل واحدة على الأقل على حلقة عطرية ، كما أنها تنقسم إلى عدة أصناف مختلفة منها الأحماض الفينولية، الكومارينات، الفلافانويدات بمختلف أقسامها ... ، تتواجد الفينولات في معظم الأصناف النباتية خاصة منها الفواكه و الخضر ... .

إن المركبات الفينولية لها أهمية كبيرة فهي من بين مضادات الأكسدة والتي لها خصائص علاجية هامة، كما يتم استعماله في الصناعات الغذائية و صناعة مواد التجميل حيث تحمي البشرة الخارجية من الأشعة فوق البنفسجية .

المراجع

[1]. بوبلوطة حورية، النشاط المضاد للتاكسدوامكانية وقاية المستخلصين الميثانولي لنبتتي Centaurea incana و Matricaria pubescens على السمية الكبدية، رسالة مقدمة لنيل شهادة الماجيستير جامعة منتوري قسنطينة (2008/2009).

[2]. د. بشرى البشير، التغذية والصحة، الإدارة العامة للتغذية بوزارة الصحة السعودية 2003.

[3]. ربيعي عبد الكريم، المساهمة في دراسة الفعالية المضادة للأكسدة لمستخلصات بروبوليس جنوب الجزائر بالطرق الكيميائية و الكهروكيميائية، رسالة ماجستير جامعة قاصدي مرباح ورقلة (2009).

[4]. بن عاشورة صابرينة البتول , الفاعلية المضادة للأكسدة للزيوت الطيارة والمركبات الفينولية ل «Deverra scoparia» مذكرة ماجستر في الهندسة الكيميائية , جامعة قاصدي مرباح ورقلة. 2006

[6]. مصطفى بوقوادة . دراسة فيتوكيميئية للبيبيدات و الفينولات في بعض أنواع نوى التمر المحلي ، مذكرة تخرج ماجستير ، جامعة ورقلة 2007 .

[8] . جرموني مريم، النشاطية المضادة للأكسدة لمستخلصات نبتة الخياطة Teucrium polum ، رسالة ماجستير جامعة فرحات عباس(2009).

[12]. ص.عكال، البحث عن الفلافونويدات عند ثلاث انواع للجنس سانتوريا الجزائري C.Fulfuracea, C.Pullata, C.Napifolia الفعالية البيولوجية، رسالة دكتوراة جامعة منتوري قسنطينة (2001).

[22] . علاوي مسعودة، مساهمة في دراسة بعض المركبات الفعالة في نبات الرمث (Haloxylon Scoparium)، مذكرة ماجستير، جتمعة ورقلة، ماي 2003.

[24]. ميثاق الجبر , بحث وتحديد نواتج الأيض الثانوي لنبات القات cathaedulis من العائلة (celastraceae) ونبات البوليكاريا pulicaria jaubertu من العائلة(Asteraceae) وتقييم الفعالية البيولوجية , مذكرة دكتوراه علوم في الكيمياء العضوية ، فرع كيمياء النباتات , جامعة منتوري – قسنطينة (2010).

[5]. WILFRED, vermerris , RALPH nicholson. phenolic compounds Biochemstry , Published by Springer, 2006,284p.

[7]. Ez-zohra NKHILI. Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxidant. Diplôme de Doctorat UNIVERSITÉ D'AVIGNON ET DES PAYS DE VAUCLUSE 2009 .

[9]. Harborne J.B., 1980. Plant Phenolics: Encyclopedia of Plant Physiology, New series ,8, 329-402.

[10]. K. Robards, M. Antolovich, J.Analyst.; 122,11–34(1997).

[11]. Satyajit, D. John Wiley&Sons Chemistry for Pharmacy Students, Ltd, England. .(2007)

[12]. J.BRUNATON, Pharmacognosie. 3eme edition, TEC. et DOC. , Paris, 1999.

[13]. DONATIEN KONE, Enquéte ethnobotanique de six plantes médicinales maliennes, extraction; identification d'alcaloïdes, caractérisation,quantification de polyphénols: Etude de

leur activité antioxydante, L'université Paul Verlaine de Metz, UPV, M (France) Docteur de L'Université de Bamako (2008/2009).

[14]. Zeghad Nadia-Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (Thymus vulgaris, Rosmarinus officinalis) et évaluation de leur activité antibactérienne-le diplôme de magister (Ecole doctorale) UNIVERSITE MENTOURI DE CONSTANTINE (2008/2009).

[15]. Beta, T. Nam, S. Dexter, L.E. Sapirstein, H.D. (2005). Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and roller-milled fractions. Cereal. chem. 82, 390-393.

[16]. Jean Bruneton, pharmacognnosie phytochimie planates médicinales, 3eme edition Technique.et Documention, paris 1999.

[17]. R. O'Kennedy, R.D .Thornes, Coumarins- Biology, Applications and Mode of Action, Eds.John Wiley et Sons Ltd, Chichester(1997) .

[18]. Bruneton . j , pharmacognosie et phytochimie des plant medicinal
"3eme èdition technique et docum la voisier paris 1999, pp: 310- 312.

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

[20]. E.MIDLETON , The flavonoides trends pharmacol Science. Art. Sci. 5(1984)335-338.

[21]. Dalene de beer , The antioxidant activty of south african wrines indiffrent test systen as affected by cultivarand ageing . mémoire Master , university of stellenbosch , March (2002) .

[23]. Bruneton . j , pharmacognosie et phytochimie des plant medicinal "3eme èdition technique et docum la voisier paris 1999, pp: 310- 312.

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

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

[27]. S.K.Trabelsi; N.B.Tahar; R.Abdlhedi, Electrochim. Acta, 49(2004)1647.

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

[29]. CAZAROLLI L. H., ZANATTA L., ALBERTON E .H., FIGUEIREDO M. S., FOLADOR P., DAMAZIO R. G., PIZZOLATTI M. G. AND SILVA F. R. 2008- Flavonoids: prospective drug candidates. Mini Rev Med Chem. 8: 1429- 1440.

[30]. N. Kacem .Contribution phytochimique à l'étude des composes flavoniques de la plante Teucrium Flavum (L) (Labiées). Thése de Magister, Universite Mentouri .Constantine .(2005).

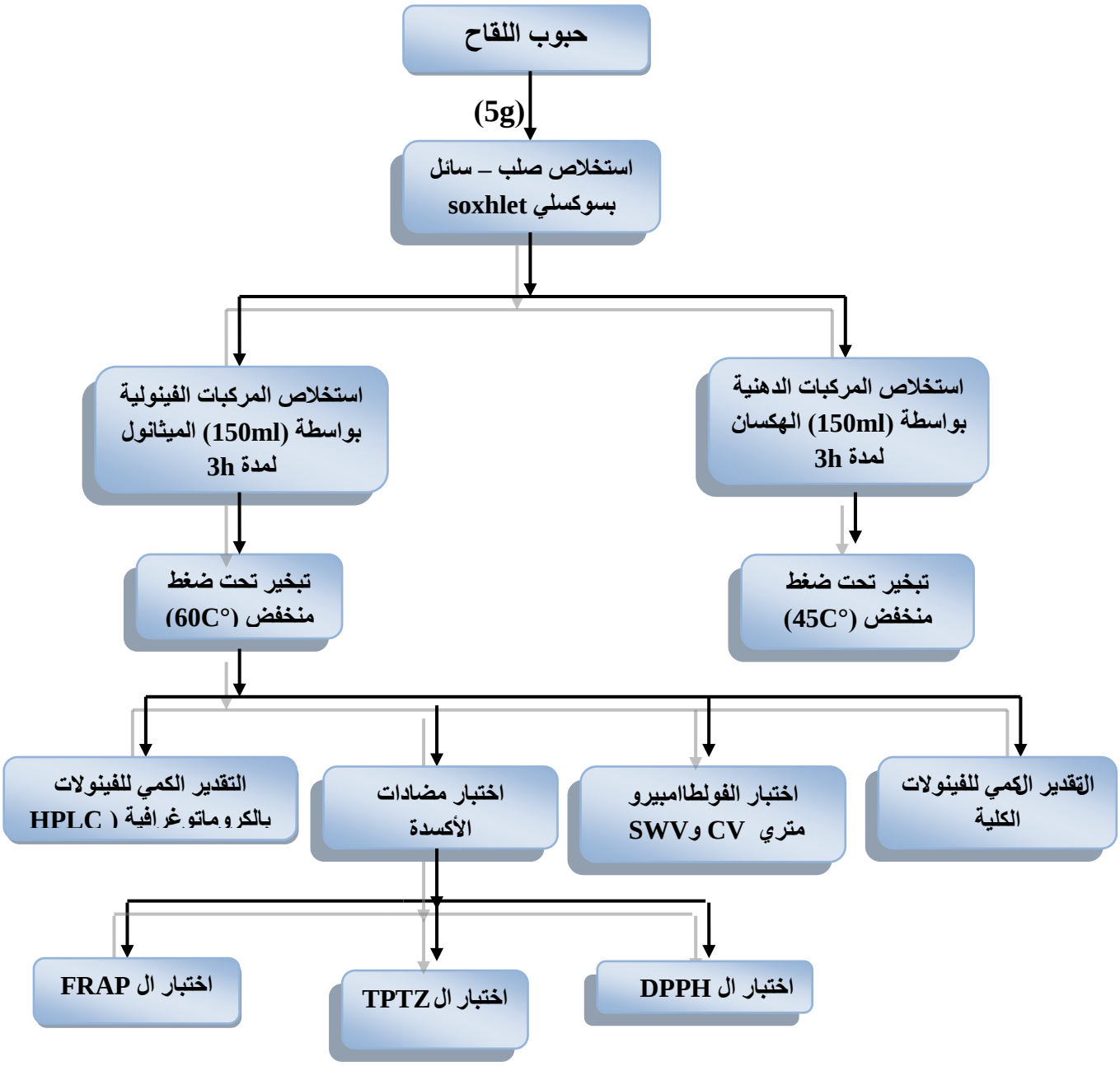
الجزء التطبيقي

الفصل الرابع

مواد وطرق العمل

تمهيد:

أظهرت الكثير من الدراسات و الأبحاث أن حبوب اللقاح غنية بالمواد الفعالة و من أهمها نذكر: السكريات،البروتينات،الأحماض الأمنية، المعادن، الفيتامينات. كما تحتوي على مركبات فينولية بكميات معتبرة ولهذا قمنا في هذه الدراسة بالتقدير الكمي للمركبات الفينولية الطبيعية و باختبار مدى فعالية المضادة للأكسدة لحبوب الطلع بالعديد من الطرق المخبرية. و ستتم هذه الدراسة وفقا للمخطط التالي :



الشكل(IV .1):تمثيل تخطيطي لدارسة المنجزة .

1.IV . تحضير العينات :

1.1.IV. جني العينات :

إن التركيب الكيميائي لحبوب الطلع يتأثر بالعديد من الظروف سواء كانت متعلقة بموقع الجني أو المناخ السائد، وهذا الاخير بدوره يؤثر على تنوع الغطاء النباتي وبالتالي فإنه يؤثر بشكل غير مباشر على التركيب الكيميائي لحبوب الطلع، لذلك ارتاينا جمع عينات من أماكن و ولايات مختلفة، والجدول التالي يوضح ترميز وتاريخ جني كل عينة .

الجدول (1.IV):مناطق وتاريخ الجني لحبوب الطلع المدروسة .

رمز العينة	منطقة الانتاج	تاريخ الجني
P1	تيبازة	مارس 2015
P2	الشلف	فيفري 2015
P3	الوادي (الدبيلة)	مارس –افريل 2015
P4	بجاية	2015
P5	البليدة	افريل 2015
P6	تيزي وزو	مارس 2015
P7	تلمسان	2015
P8	سطيف	فيفري 2015
P9	الوادي (تغزوت)	2015

2.1.IV. المواد و الأجهزة المستعملة :

- **المواد الكيميائية المستعملة :**

✍ الميثانول (CH_3OH) ،ذو نقاوة (99%) انتاج (BIOCHEM CHEMOPHAEMA).

✍ الهكسان Hexane (C_6H_{14}) ،انتاج (BIOCHEM CHEMOPHAEMA) .

✍ كربونات الصوديوم (Na_2CO_3) ذات نقاوة (99%) انتاج (MERCK).

✍ الكاشف فولن (Réactif de Folin Ciocaltau)

($3H_2O,P_2O_5,13WO_3,5MoO_3,10H_2O$) انتاج (BIOCHEM CHEMOPHAEMA).

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

- ثلاثي كلور الألمنيوم ($AlCl_3$) بنقاوة (99%) إنتاج (MERCK).
- حمض الغاليك ($(OH)_3C_6H_2COOH,H_2O$) (acid gallique)، (99%) إنتاج (PROLABO).
- حمض الأسكوربيك (C6H8O6) (acid ascorbic)، (99%) إنتاج (MERCK).
- الروتين ($C_{27}H_{30}O_{16}$) (Rutin trihydraté) ، (97%) إنتاج (MERCK).
- موليبدات الامونيوم (molybdate d' ammonium).
- حمض الكلور الماء (HCl) .
- مركبات فينولية (حمض الكلورجينيك، حمض الفانيليك، حمض الكافييك، الفانيلين، الكومارين، النارجنين، الكريستين).

- **الاجهزة المستخدمة :**

أثناء إجرائنا لهذا العمل تم الإستعانة بمجموعة من تجهيزات المخبرية على مستوى مخبر الكيمياء التحليلية، ومخبر ترقية وتثمين الموارد الصحراوية والمتمثلة في :

- جهاز المجهرالضوئي مرفق بحاسوب: نوع B-350 OPTIKA .
- تركيب سوكسلي montage soxhlet .
- جهاز (UV-Visible) نوع UV-1800 240Vصنع في Japan .
- جهاز كروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC).
  - صنع من طرف (SHIMADZU).
  - مرفق ببرنامج تشغيل (LC solution) مبرمج في جهاز كمبيوتر متصل بالجهاز لتسجيل منحنيات المساحة بدلالة الزمن.
- جهاز التحليل الكهرو كيميائي (VOLTALAP 40)(PGZ 301 POTENTIOSTAT TYPE) .
  - صنع من طرف (RadiometerAnalytical SAS).
  - مرفق ببرنامج تشغيل (VoltaMaster 4).
  - مرفق بخلية كهروكيميائية مصنوعة من زجاج .
  - مرفق بثلاث أقطاب يتم شرحها في الأتي .

قطب العمل:

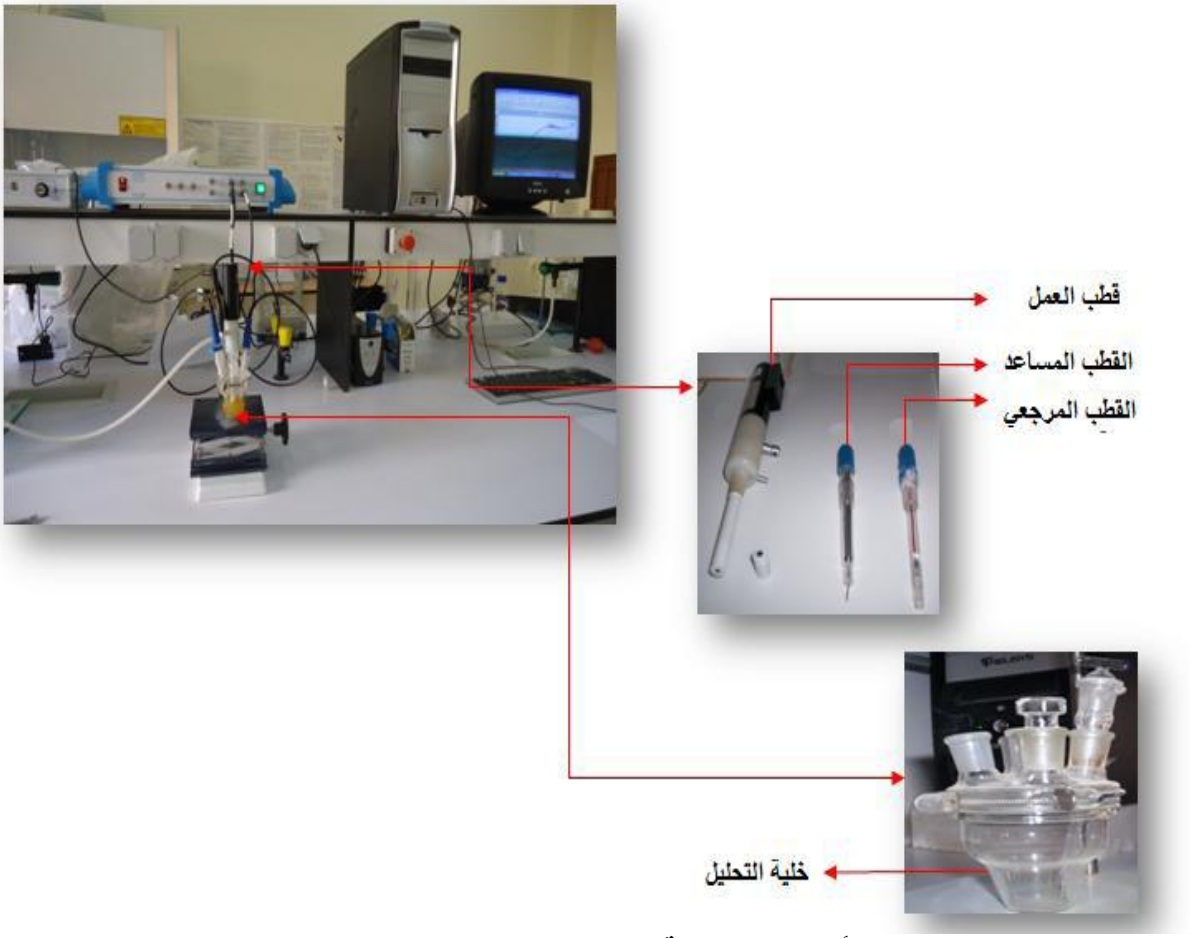
وهو عبارة عن اسطوانة من الكربون الغرافيتي قطرها 3mm ،يتم تنظيف هذا الاخير بعد كل عملية باستعمال ورق خاص (ECSCILG,P54) يحتوي على مادة كاشطة بعدها ينظف بالماء المقطر ثم بالاسيتون ويجفف ، وهو القطب الذي تتم عليه تفاعلات الأكسدة و الأرجاع .

قطب مساعد:

وهو عبارة عن سلك من البلاتين قطره 0.5mm، وظيفته اغلاق الدارة.

قطب مرجعي:

هو قطب الكالومال المشبع بكلوريد البوتاسيوم .



الشكل (2.IV): الأجهزة المستعملة لجهاز (VOLTALAB 40، PGZ 301).

IV.1 .3 . الدراسة المجهرية لبعض عينات حبوب الطلع :

بهدف التعرف على بعض الخصائص البنيوية لحبوب الطلع لبعض العينات المدروسة خاصة ما تعلق بالشكل، الحجم [1]، قمنا بمشاهداتها تحت المجهر الضوئي **الشكل (4.IV)**.

- **طريقة العمل :**

تم اختيار العينات من مراعي مختلفة لتربية النحل في الجزائر كما قمنا بفرز هذه العينات وفقا لألوان حبوب الطلع لكل عينة ، و هذه عينة الوادي و مختلف الألوان التي تم فرزها منها :

الشكل (3.IV): مختلف الألوان التي تم فرزها من عينة الوادي .

IV.1 .4. استخلاص المواد الفعالة :

إن عملية استخلاص المركبات الفينولية من حبوب الطلع تعتبرمن أهم الخطوات في دراسته كمصدر للمواد الفعالة ، وقد تم إجراء الكثير من الدرسات حول أحسن طرق الاستخلاص المستخدمة من حيث المردود الناتج، ولهذا اعتمدنا على الطريقة الاكثر استخداما وهي استخلاص (صلب - سائل) وذلك بإستخدام تركيب سوكسلي[2] .

- **استخلاص المكونات الغير قطبية :**

بعد جمع العينات يتم أخذ كمية قدرها 10g من كل عينة ويتم تجفيفها في فرن التجفيف .

اخذنا كمية قدره ا 5g من كل عينة و تمت عملية الاستخلاص بواسطة سوكسلي .

من اجل استخلاص المواد الدهنية نستخدم الهكسان كمذيب نأخذ (150ml)، و لمدة 3 ساعات في تركيب سوكسلي**الشكل (4.IV)**، ثم تتم عملية الترشيح والتبخير للهكسان تحت التفريغ عند درجة حرارة 45C°

بواسطة جهاز المبخر الدوار نتحصل على المستخلص الجاف ومن ثم نقوم بحساب المردود للمستخلص لكل عينة والذي يحسب بالطريقة التالية :

مردود الاستخلاص% = (me×100%)/5g

حيث :me هو كتلة المادة الجافة بعد الاستخلاص مباشرة .

استخلاص المكونات القطبية :

في حالة استخلاص الفينولات لنفس العينات السابقة وبنفس الخطوات مع استبدال الهكسان بالميثانول (150 ml) [2].

الشكل (4.IV): عملية الاستخلاص في تركيب سوكسلي.

2.IV . تقدير كمية الفينولات الكلية والفلافونويدات :

تقدير كمية الفينولات الكلية بطريقة :

يتم تقدير المركبات الفينولية بواسطة طريقة **Single ton-Ross** (1956)) بمساعدة كاشف الفولن، الذي يتغير لونه من الأصفر الى الأزرق بالأكسدة .

حيث ان هذا الكاشف يتكون من حمض فوسفوتنغستنيك ($H_3PW_{12}O_{40}$) و حمض فوسفوموليبديك ($H_3PMo_{12}O_{40}$) والذي يرجع يرجع بواسطة الفينولات الى اكسيد (W_8O_{23}) و الموليبدين(Mo_8O_{23}) .

المركبات الفينولية تقدر كميا بواسطة جهاز Spectroscopie UV-visible حيث يستعمل حمض الغاليك كمركب فينولي مرجعي (λ_{max}=760nm) [4;3] .

أ - رسم المنحنى القياسي لحمض الغاليك :

- **تحضير المحاليل :**

ويتم ذلك عمليا بتحضير محاليل ممددة لحمض الغاليك ذو تراكيز مختلفة محصورة ما بين (0,3-0,03)mg/ml، وبإضافة 1ml من كاشف الفولين المخفف و0.8ml من محلول كربونات الصوديوم Na_2CO_3 لمدة (3min) بتركيز 20% لكل 100 µl من التراكيز المحضرة و بمزجها بواسطة جهاز المزج الكهربائي ثم تركها في الظلام لمدة 30 min، تتم بعد ذلك قراءة الإمتصاصية الضوئية لها بواسطة جهاز UV عند الطول الموجي **(λ_{max}=760nm)** [5] .

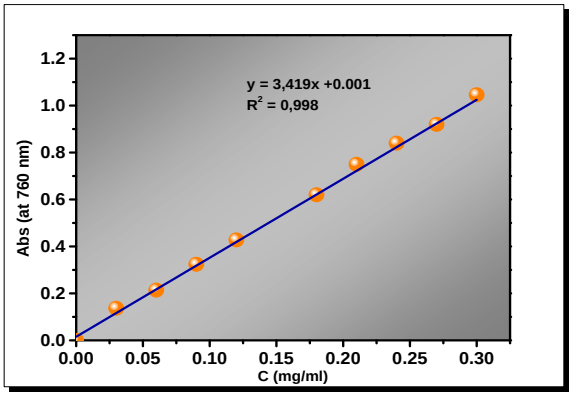
نتحصل على المنحنى القياسي لكل من حمض الغاليك و برسم تغير الامتصاصية الضوئية بدلالة التركيز A=f(C) ، كما هو موضح في **المنحنى(1.IV)** تعامل المحاليل المحضرة لعينات حبوب الطلع بنفس معاملة السابقة ، نستخدم المنحنى القياسي لحمض الغاليك **(AG)** لحساب تراكيز الفينولات في مختلف المستخلصات وذلك بإسقاط هذه النتائج على المنحنى القياسي. نحدد تركيز العينات بالنسبة لحمض الغاليك حيث تقدر بوحدة **(mg/g)** وتحسب وفقا لقانون بيير لامبيرت: $A = K * C$ $/ K = \varepsilon * l$

حيث: **K**: ميل المنحنى القياسي لحمض الغاليك K=3.419.

A: الامتصاصية (nm). - **C**: التركيز (g/l).

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

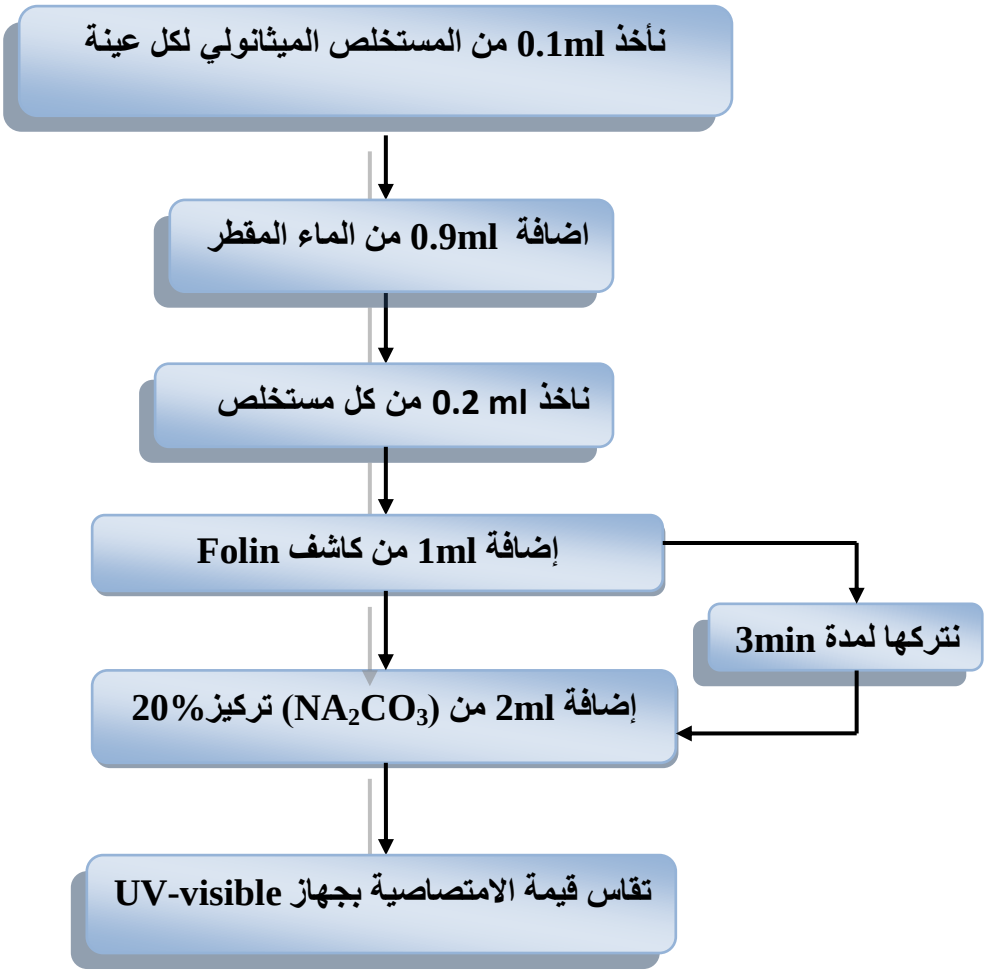
$$C = \frac{A * N_d * V}{K * m} \quad \text{..... (1.IV)}$$



المنحنى *(1.IV)*: المنحنى *القياسي لحمض الغاليك*.

تقدير كمية الفينولات الكلية في المستخلصات:

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



الشكل (5.IV): مخطط تقدير الفينولات الكلية في المستخلصات.

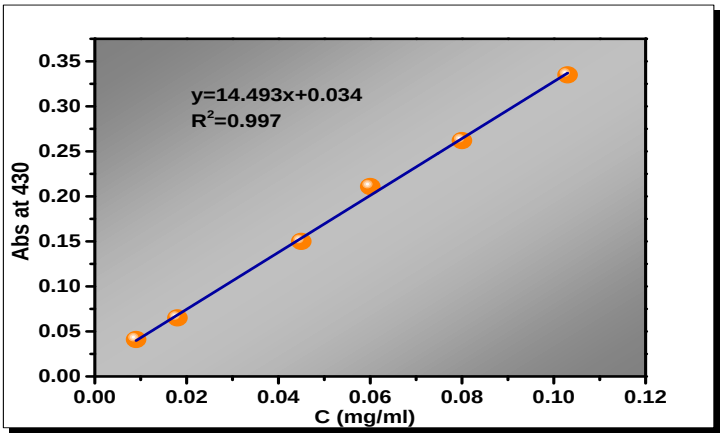
تقدير كمية الفلافونويدات :

يعتمد في تقدير الفلافونويدات على قدرة تكوين المعقد الأصفر بين ثلاثي كلور الألمنيوم ($AlCl_3$) مع مجموعة الهيدروكسيل (OH^-) الموجودة على الحلقات البنزينية للفلافونويدات، حيث يشكل معقدا ثابتا بين مجموعة الكربونيل و هيدركسي الموقع 5 و 3، كما يشكل معقدات غير ثابتة مع مجموعتي اورثو هيدركسي، ذو معامل إمتصاص عال. ويمتص عند طول موجة λ_{max}=**430nm** [6].

نستعمل في هذه التجربة فلافـونويد الروتين (Rutine) كأساس مرجعي (قياسي) لرسم المنحنى القياسي [7].

●تحضير المحاليل :

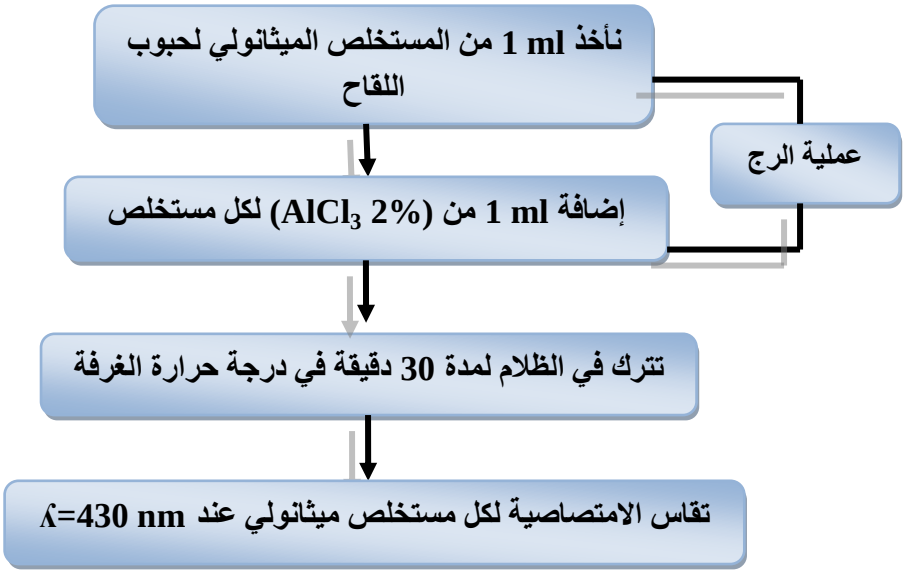
ويتم ذلك عمليا بتحضير محاليل بتواكيز مختلفة للروتين محصورة ما بين (0,1-0,02) mg/ml، وبإضافة 1ml من محلول ثلاثي كلور الألمنيوم $AlCl_3$ ذو تركيز 2% لكل 1ml من التراكيز المحضرة و بمزجها بواسطة جهاز الرج الكهربائي ثم تركها في الظلام لمدة 30 min، تتم بعد ذلك قراءة الامتصاصية الضوئية لها عند الطول الموجي λ_{max}=430nm [2]. نتحصل على المنحنى القياسي للروتين برسم تغير الإمتصاصية الضوئية بدلالة التركيز A=f(C) ، كما هو موضح في **المنحنى** ***(2.IV)*** ، تعامل المحاليل المحضرة لعينات حبوب الطلع بنفس معاملة الروتين.



المنحنى (2.IV): المنحنى القياسي روتين .

تقدير كمية الفلافونويدات في المستخلصات:

لتقدير كمية الفلافونويدات نعامل المستخلصات الممددة لحبوب اللقاح بنفس الطريقة التي عاملنا بها الروتين **Ru** كما هو موضح في المخطط التالي:



الشكل (6.IV): مخطط تقدير الفلافونويدات الكلية في المستخلصات .

تقدير بعض الأحماض الفينولية و الفلافونويدات بالكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) **:**

في هذه الدراسة تم إختيار طريقة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC)التي تعتبر من أفضل طرق الفصل وذلك لما تتميز به من بساطة و سرعة عالية في الفصل ودقة متناهية، وهذه الطريقة كروماتوجرافيا الإمتزاز(الرجوع للملحق).

تم تقدير بعض المركبات الفينولية بواسطة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) وفقا للشروط المحسنة الموضحة في ***الجدول (2.IV)*** حيث تم فصل المكونات و تقديرها بالاستعانة بالمنحنيات القياسية المتحصل عليها من خلال تحسين شروط الطريقة.

الجدول (2.IV): **الشروط التجريبية لجهاز (HPLC) لفصل المركبات الفينولية المدروسة.**

العامل	الشروط
النظام	الطور المعكوس RP-HPLC
العمود	(25 cm x 46 nm) C18
حجم المحقن	20µl
معدل التدفق	1ml/min
طول الموجة	λ = 268 nm
الزمن	50 min
درجة الحرارة	25 °C
الطور المتحرك	(A) أسيتونتريل (acetonitrile).
	(B) حمض الخل (0.2% acid acetique) H_2O

و ***الجدول (3.IV)*** يوضح تغيرات نسبة الطور المتحرك A و B بدلالة الزمن:

الجدول (3.IV)تغيرات نسبة الطور المتحرك بدلالة الزمن.

الزمن (*min*)	نسبة (A)	نسبة (B)
0.00	10	90
2.00	10	90
6.00	14	86
16.00	17	83
23.00	19	81
28.00	23	77
30.00	10	60
50.00	10	90

يعتمد تقدير الفينولات في العينات على إستعمال المنحنيات القياسية للمركبات الفينولية المراد تقديرها.والشكل التالي يوضح جهاز ال HPLC.

الشكل (IV.7): الجهاز (HPLC).

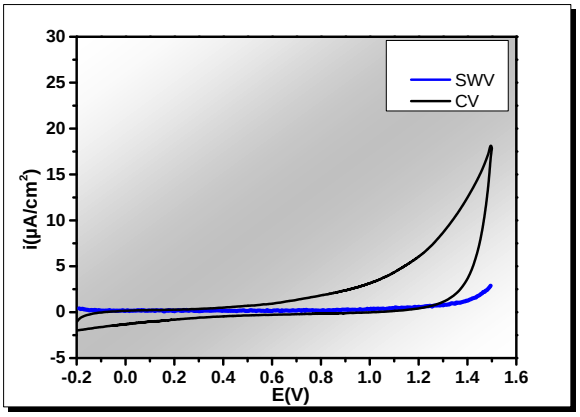
تم تحضير العينات وذلك باذابة 10mg من المستخلص الميثانولي الجاف في 1ml من المذيب المحضر من 80% الميثانول و 20% ماء، بعدها تم ترشيح العينة المحضر بحقنة ترشيح 0.45µm وحقنها في جهاز (HPLC) .

3.IV دراسة السلوك الكهروكيميائي للمستخلصات و المركبات الفينولية :

يتم العمل بالطريقة الفولطامترية الحلقية والموجة المربعة وبمساعدة التجهيز والمواد المذكورة سابقا وهذا بعد تحضير العينات المدروسة (الرجوع للملحق).

الالكتروليت المساعد:

قبل مباشرة الدراسة، قمنا بتحديد مجال الكهروفعالية للكهروليت المساعد مع المذيب على مسري الكربون الغرافيتي، حيث حدد المجال من (1200) mV/ECS)-(-200)) في الجهة المصعدية، سرعة مسح تساوي $100\ mV.s^{-1}$ كما هو موضح في المنحنى التالي .



المنحنى (3.IV): المنحنيات الفولتامترية الحلقي و الموجة المربعة لوسط الدراسة

من الملاحظ أن المجال المختار و اسع و لا يتأثر بأي مكون من مكونات الخلية و هو المطلوب.

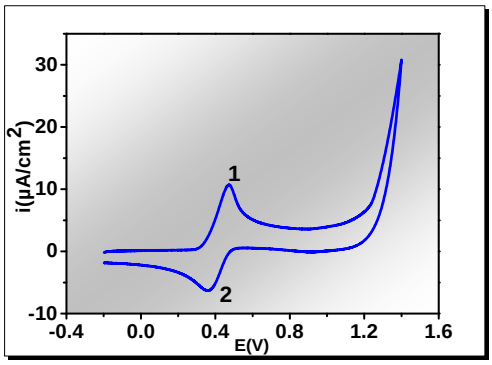
رسم المنحنيات الفولطامترية لبعض المركبات القياسية:

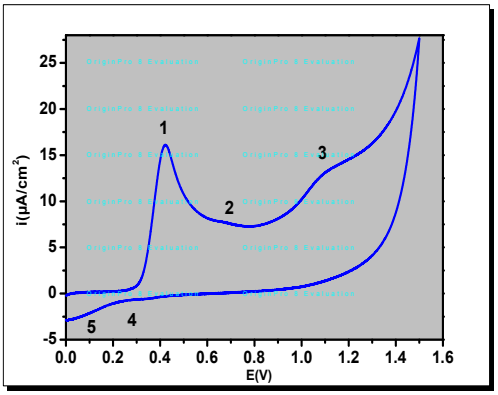
يتم تحضير محاليل المركبات القياسية بتراكيز معلومة، بعدها يتم رسم المنحنيات الفولطامترية في نفس الشروط السابقة و بتركيز محددة .

الشروط التجريبية:

- الشروط التجريبية لرسم المنحنيات الفولتامترية الحلقية.
  - سرعة المسح $100\ mV.s^{-1}$
  - مجال المسح mV [(1400)- (-200)]
- الشروط التجريبية لرسم المنحنيات فولتامتري الموجة المربعة.
  - سرعة المسح $15\ mV.s^{-1}$
  - مجال المسح mV[(1400)-(- 200)]

تم الحصول على المنحنيات القياسية التالية لكل من الكافييك و الروتين و التي سيتم مقارنتها مع منحنيات المتحصل للمستخلصات :





المنحنى *(4.IV)*: المنحنى الفولطامتري لحمض الكافيك . **المنحنى *(5.IV)*: المنحنى الفولتامتري للرتين .**

✍ رسم المنحنيات الفولطامترية لبعض للمستخلصات الفينولية :

يتم تحضير العينات بتركيز4mg/g وبعدها يتم رسم المنحنيات الفولطامترية بنفس الشروط السابقة.

4.IV الاختبارات المضادة للأكسدة:

هي قياس لقدرة المستخلص أو المركب على تثبيط الجذر الحر أو توقيف عملية الأكسدة، تقدر الفاعلية المضادة للأكسدة بعدة طرق نذكر منها: إختبار (DPPH)، أو إختبار (FRAP)، أو إختبار (ABTS)، أو إختبار (TRAP)، أو إختبار القدرة الإرجاعية (PR)، اختبار إجمالي فعالية المضادات الأكسدة (TAC)، هذه الطرق تعتمد على التلوين ونزع التلوين في طول موجي معين [9;8].

في دراستنا هذه قمنا بإختبار (DPPH) ، اختبار (FRAP) و اختبار إجمالي الفعالية المضادة للأكسدة (TAC).

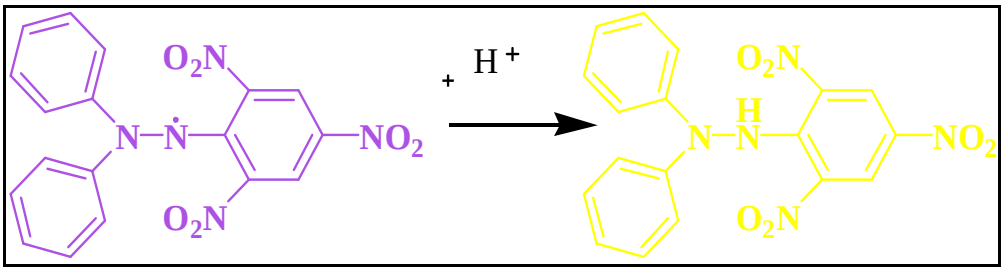
1) اختبار DPPH:

المبدأ :

في سنة 1958م قام العالم (بولواز) باختبار مضاد الجذور الحرة ولقد أجرى بعض الحسابات المتعلقة بمضادات الأكسدة [10] .

لغرض تقدير فعل الآسر للجزيئات المضادة للتأكسد للمستخلص الميثانولي لكل من العينات تم استعمال اختبار الـ (DPPH) ثنائي فينيل بكريل هايدرازيل (diphenyl picrylhydrazyl) الذي يعتبر من أكثر الطرق استعمالا في تقدير التأثير الإزاحي للجزيئات المضادة للتأكسد [12;11] ،

حيث تتناسب قدرة أسر الجذور الحرة بدلالة القدرة على إرجاع هذا الجذر ، وذلك اعتمادا على قابلية إعطاء المستخلصات (مضادات الأكسدة) لذرة الهيدروجين[13]، حيث تكون الجزيئات التي تملك هذه الخاصية قادرة على إرجاع جذر الـ DPPH (2,2 '-diphenyl-1-picrylhydrazyl) الذي يعتبر مادة صلبة لونها بنفسجي – مسود إلى (2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazine) (DPPH-H) غير جذرية لونها أصفر [14]، وهذا باستعمال جهاز الطيف اللوني وذلك بقياس مقدار الانخفاض في الامتصاصية، هذا الانخفاض في الامتصاصية يمكننا من معرفة قدرة وكفاءة المستخلصات من تثبيط الجذور [15].



الشكل (IV. 8):يوضح آلية تثبيط العامل المضاد للأكسدة مع الجذر الثابت $DPPH^{\cdot}$.

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) طول الموجة الأعظمية λ_{max}= **517nm**.

إن قدرة مضادات الجذور الحرة تحدد بعبارة كمية حسابية بدلالة تركيز المحلول لتثبيط 50% من الجذور الحرة، النتيجة نعبر عنها بـ - IC_{50} و هي معرفة بتركيز المحلول بوحدة (g/l) بالنسبة للمستخلصات الخام أو للمركبات النقية معلومة الكتلة المولية لتثبيط 50% من جذور (DPPH)، وتحسب انطلاقا من منحنيات التغير في نسب التثبيط المئوي% بدلالة تركيز المحلول(**موجودة في الملحق**) ، كلما كانت قيمة IC_{50} صغيرة كانت فعالية المضادات الجذرية كبيرة[12].

❖ **تحضير المواد وطريقة العمل:**

قمنا بتحضر 0.1 mM من محلول (DPPH) في الميثانول ثم تراكيز مختلفة من مستخلصات حبوب الطلع المخففة في الميثانول من كل تركيز نأخذ 1ml نضيف لها 1ml من (DPPH) نرج المحلول ليتجانس، و نتركه 30 دقيقة في الظلام بعدها تتم القراءة في جهاز Spectroscopie UV-Visble عند طول الموجة الأعظمي λ_{max}=517nm.

● **نتائج الاختبار:**

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

$$I\% = ((A_0 - A_I)/A_0) * 100 \quad \text{.....(2.IV)}$$

حيث أن :

$\mathbf{A_0}$: الامتصاصية الضوئية للجذر الحر في غياب المستخلصات.

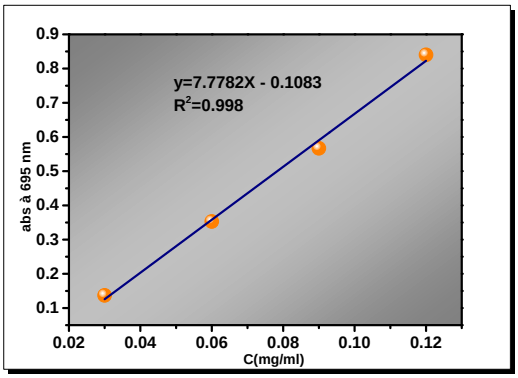
$\mathbf{A_i}$: الامتصاصية الضوئية للخليط (الجذر + المستخلصات) بعد مرور30 دقيقة.

نرسم المنحنى البياني للنسبة المئوية للتثبيط بدلالة التركيز، و يمكن ان نستخرج قيمة IC_{50} .

2) إختبار موليبدات الفوسفات (MP):

تم تقدير الفعالية المضادة للأكسدة حسب طريقة Prieto بعد بعض التعديلات التي تتضمن مايلي، 0.2 ml من تراكيز ممددة من مستتخلصات العينات المدروسة نضيف لها 2 ml من الكاشف و هو محلول محضر يحتوي على 4 mM من موليبدات الامونيوم، 28 mM من فوسفات الصوديوم، 0.6 M من حمض الكبريت، يتم حضن الخليط في حمام مائي بدرجة حرارة 95 °C و لمدة 90 min ، بعد انقضاء المدة تترك العينات تبرد في درجة حرارة الغرفة. تتم قراءة الامتصاصية بجهاز (UV-Visible) عند طول الموجة $\lambda_{MAX} = 695nm$ [14;2].

تم استعمال حمض الغاليك كمركب قياسي بتراكيز محصورة بين (0.03 g/ml و0.250 g/ml) و تمت معاملة التراكيز بنفس الكاشف و الطريقة، انطلاقا من قيم الامتصاصية (A) لحمض الغاليك، نرسم المنحنى القياسي الذي يبين تغير الامتصاصية (A) بدلالة التركيز بـ(mg/ml) .

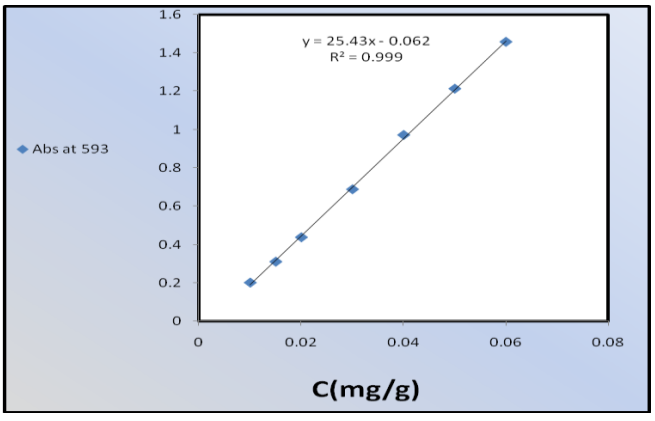


المنحنى (*6.IV*): القياسي لحمض الغاليك

3) اختبار FRAP (Frric Reducing Antioxidant power):

وهو اختبار مضاد للأكسدة يدرس فعالية مضادات الأكسدة الإرجاعية ويعتمد على تفاعل الإرجاع اللوني ، أي يدرس مدى قدرة المستخلصات كمثبطات لعملية الأكسدة، بحيث يتم قياس التغيرات التي تحدث في الامتصاصية عند طول موجي λ= 539nm بسبب ظهور اللون الأزرق الناتج على إرجاع مركب Fe^{+3}-TPTZ(ثلاثي بيريديل ثلاثي ازين فريك 2,4,6-tripyridyl-s-triazine ferrique) إلى Fe^{+2}-TPTZ [17;16].

يتم مزج 0.1ml من العينة المختبرة مع 0.9ml من محلول FRAP الذي يتكون من 2.5ml من TPTZ (0.031g) +10ml(HCl 4mM)) وـ2.5ml من محلول $FeCl_3$ (3.24 g/l) مع 25ml من محلول موقى لخلات الصوديوم (pH= 3.6 ; C =300mM)،يحفظ هذا المحلول عند درجة حرارة 37C° لمدة 30 min . لتحديد قيم الفعالية تم استعمال حمض الاسكوربيك لتحديد منحنى القياسي بعد الدقيقة 4 د [18]. نقوم برسم المنحنى القياسي لحمض الاسكوربيك :



المنحنى (IV. 7): المنحنى القياسي لحمض الاسكوربيك Acid Ascorbic (AA).

خاتمة :

في هذا الفصل تم طرح مختلف الخطوات التي قمنا بيها خلال العمل التطبيقي لهذا البحث، بحيث تم استخدام مجموعة من المواد والتجهيزات المختلفة وهذا بغرض التعرف على التركيب الفينولي لحبوب اللقاح، و تثمينه من خلال التقدير الكمي للفعالية المضادة للاكسدة لمستخلصات العينات المدروسة، و يمكن تلخيص ما تم القيام به في النقاط التالية :

- تم جمع حوالي تسعة عينات من وليات مختلفة والتي ذكرت سابقا .
- اجراء عملية الاستخلاص لكافة العينات و هذا بستخدام تركيب سوكسلي .
- التقدير الكمي للفينولات الكلية و التقدير الكمي للفلافانويدات .
- تقدير بعض المركبات الفينولية باستخدام الكروماتوغرافية ذات الكفاءة العالية .
- الدراسة السلوك الكهروكيميائي للمركبات الفينولية في المستخلصات .
- تقدير الفعالية المضادة للاكسدة لمستخلصات حبوب اللقاح .

المراجع

[1]. سوزان روس، م.م. بسام البركات، ا.د. موسى السمارة، هوية العسل السوري، الجمهورية العربية السورية وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي مشروع تطوير تربية النحل والحرير، تصميم م.م. هدى شلش، دمشق، 2005 .

[5]. بن عاشورة صابرينة البتول ،الفاعلية المضادة للاكسدة للزيوت الطيارة والمركبات الفينولية ،مذكرة ماجستير في الهندسة الكيميائية ،جامعة قاصدي مرباح ورقلة ،2007.

[8] . عبد الرحيم بن سلامة. النشطات المضادة للاكسدة للكزانيث لمستخلصات اوراق Heria chéirifolial . مذكرة تخرج ماجستير بيوكيمياء، جامعة فرحات عباس سطيف . 1012، ص38 .

[2]. A,REBIAI .,T,LANEZ. CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF APIS MELLIFERA BEE POLEN FROM NORTHE ALGERIA.jornal of .Fund .App.Sci. 2012;p.

[3]. KARABEGOVIÜ, Ivana., NIKOLOVA, Milena., VELIÞKOVIÜ, Dragan., et al. Comparison of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Methanolic Extracts of the Artemisiasp. Recovered by Different Extraction Techniques . Journal of Chemical Engineering, (2011), n° 19,p. 504-511.

4.J.B.RORSSELL.,MEASUREMENT of racidity;In:ranciditiy in foods.J.C.Allen and R.J Hamilton (eds) Elsevier.Amsterdan,(1989) 23,25.

6.J.B.RORSSELL.,MEASUREMENT of racidity;In:ranciditiy in foods.J.C.Allen and R.J Hamilton (eds) Elsevier.Amsterdan,(1989) 23,25.

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

9. Rebiai A, Lanez T, Belfar ML. In vitro Evaluation of Antioxidant Capacity of Algerian Propolis by Spectrophotometrical and Electrochemical Assays. Int J Pharm. 2011; 7: 113-118.

10. Keyrouz R, Abasq ML, Bourvellec CL, Blanc N, Audibert L, ArGall E, et al. Total phenolic contents, radical scavenging and cyclic voltammetry of seaweeds from Brittany. Food Chem. 2011; 126(3): 831-836

11. Chevion S, Roberts MA, Chevion M. The use of cyclic voltammetry for the evaluation of antioxidant capacity. Free Radic Biol Med.2000; 28(6): 860-870.

12. Uchiyama, Suzuki .Y, et fukuzawa Etude biochimiaues de K."de la fonction physiologique du tcopherolacotome Yakgaku Zasshi 88,1968,PP:68-683.

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

14 .P.Molyneux,song klana karin J.SIC tchnol., 26(2004) 211-219.

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

16.W.Brand WILLIAMS.,C.B,C.Berset.,M.E.Cuvelier.Wissen.U.Tech,28(1995)25-30.

17. BLOIS, Détermination antioxydants de M.S. par l'utilisation d'un radical libre stable nature, 181(1959) 1199-2000.

18. M.UCHIYAMA, Y.Suzuki., K.fukuzawa, Etud biochimiques de la fonction physiologique du tcopherolactom. Yakgku Zasshi 88(1968)680,683.

الفصل الخامس

نتائج ومناقشة

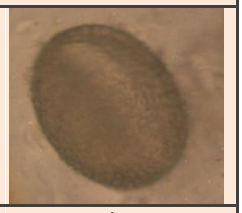
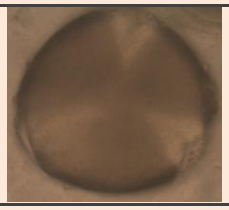
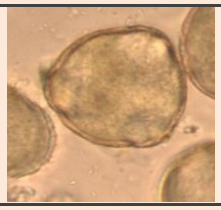
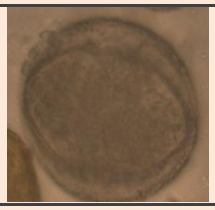
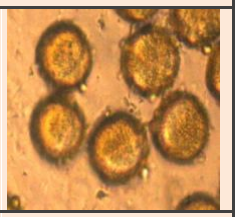
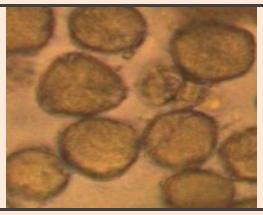
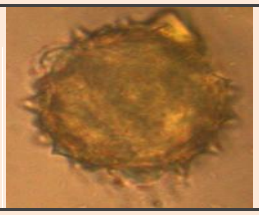
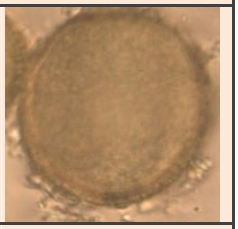
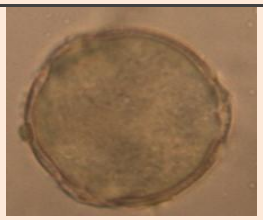
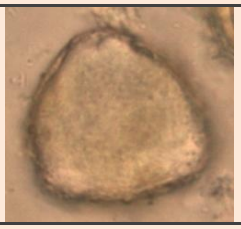
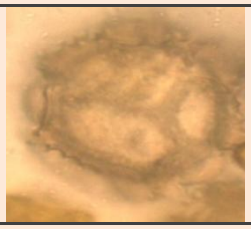
تمهيد :

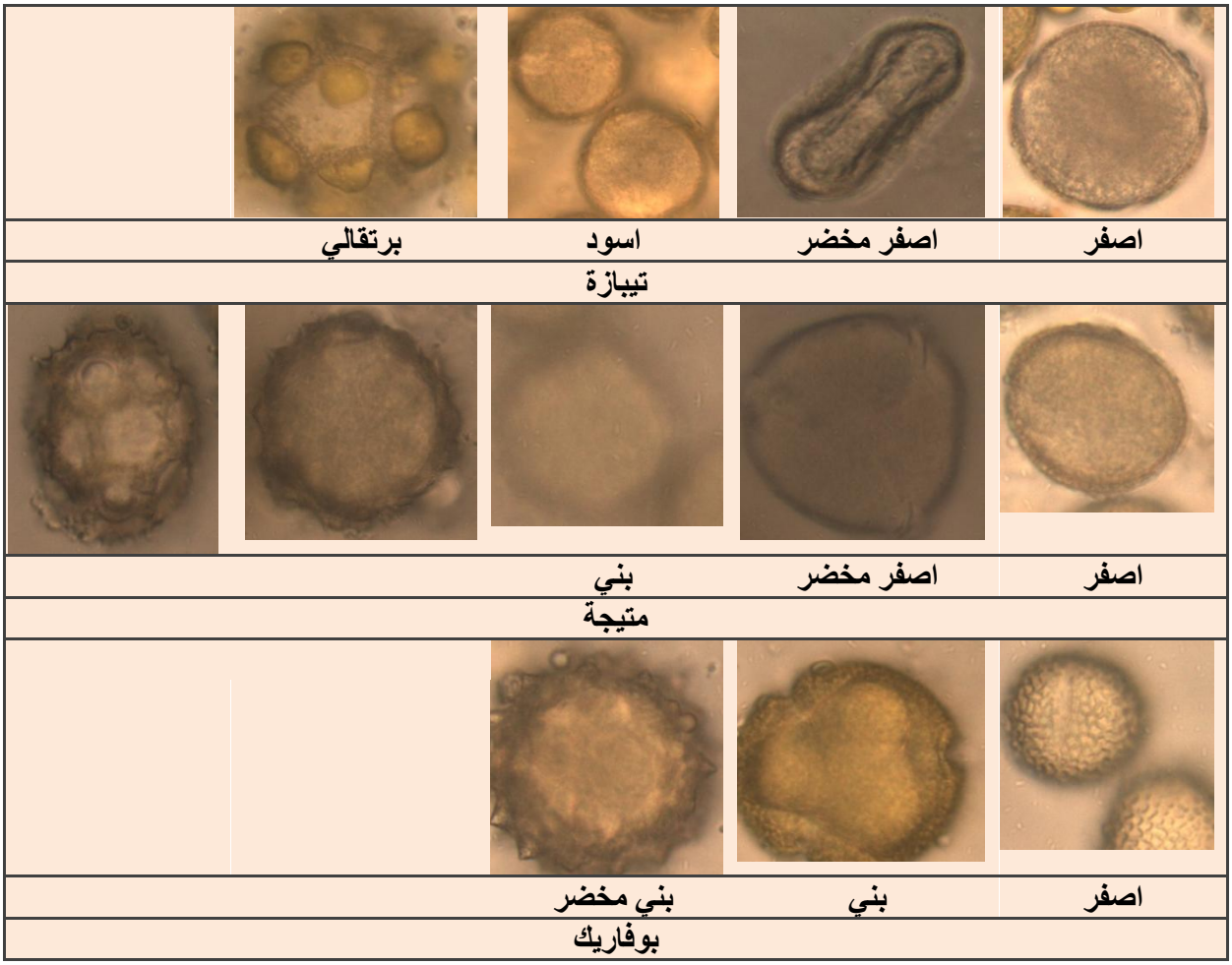
كما ذكرنا سابقا قمنا في هذه الدراسة بإجراء مجموعة من الاختبارات و التجارب على المستخلص الميثانولي لعينات حبوب الطلع، وفقا للخطوات التالية :

- الدراسة المجهرية لبعض عينات حبوب الطلع .
- التقدير الكمي للمركبات الفينولية الطبيعية ، كما قمنا باختبار الـ - **DPPH** ، اختبار الموليبدات واختبار FRAP ؛ وهذا لمعرفة الفعالية المضادات لأكسدة للمستخلصات .
- دراسة السلوك الكهروكيميائي للمستخلاصات وهذا بمقارنتها مع سلوك المركبات القياسية ، عن طريق الفولطامتري الحلقي **(CV)** وفولطامتري الموجة المربعة **(SWV) .**
- التحليل الكيفي والكمي للمستخلصات باستعمال الكروماتوغرافيا السائلة (HPLC).

V.1. نتائج الدراسة المجهرية لحبوب الطلع:

من خلال الدراسة المجهرية التي قمنا بيها على عينات حبوب الطلع تأكد لدينا أن هناك تنوع كبير لحبوب اللقاح لتعدد مصادرها ، هذا يدل على ثراء الغطاء النباتي للمنطقة .

الصور المجهرية				
				
اصفر	بني	اسود	برتقالي	احمر
الوادي				
				
اصفر	اصفر مخضر	اسود	برتقالي	
الشلف				
				
اصفر	بني	اسود	برتقالي	
تلمسان				



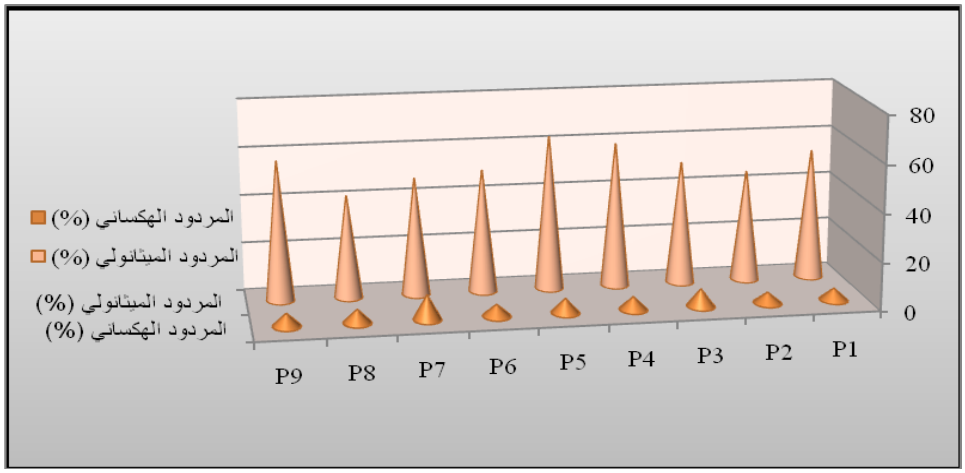
الشكل (1.V):يوضح صور الدراسة المجهرية للعينات.

2.V. نتائج مردود الاستخلاص لعينات حبوب الطلع:

النتائج المحصل عليها مدونة في الجدول **(2.V)** وتمثيلها بالمنحنى **(1.V)**:

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

العينات	مردود المستخلص الهكساني(%)	مردود المستخلص الميثانولي (%)
P1	4.84	53.69
P2	4.48	45.97
P3	7.21	50.75
P4	5.30	59.64
P5	5.94	63.60
P6	4.83	50.75
P7	10.04	48.43
P8	5.53	42.39
P9	5.25	57.67



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

مناقشة النتائج:

نلاحظ من خلال النتائج المتحصل عليها أن المردود الميثانولي و كذا الهكساني يتغير من عينة لأخرى ويفسر ذلك بتنوع الغطاء النباتي للمناطق التي أخذت منها العينات فنجد مثلا أن أعلى مردود سجلناه في عينة P5 (**63.60%**) وهي لمنطقة البليدة المعروفة بتنوع و كثافة غطائها النباتي، كما سجلنا أدنى مردود للعينة P8(**42.39%**) و P2(**45.97%**) وتعودان لمنطقتي سطيف و الشلف على التوالي ، هذا بالنسبة للمستخلص الميثانولي

في حين أن مردود مستخلص الهيكساني يكون بنسبة مرتفعة في عينة تلمسان P7 (**10.04%**) تليها عينة الوادي (الدبيلة) P3 (**7.21%**) وأقلها مردودا هي عينة الشلف P2 بنسبة (**4.48%**).

ومنه يمكننا نستنتج أن المحتوى الميثانولي لحبوب الطلع متغير من عينة لأخرى ونفس الشيء بالنسبة لمركبات الدهنية وهذا راجع لنوع و مصادر حبوب اللقاح التي يجمعها النحل من محيطه الجغرافي .

V.3. مقارنة المحتوى الفينولي للمستخلصات:

1. تقدير كمية الفينولات الكلية :

تم تطبيق طريقة (Single ton, Ross 1965) لتقدير الفينولات الكلية في المستخلصات، والتي تتميز بسهولتها وفعاليتها، وباستعمال حمض الغاليك كفينول قياسي ، حيث أظهر هذا التحليل أن الكثافة الضوئية تتناسب طردا مع تركيز GA (0.03g/l و0.3g/l) ورسم منحنى(**1 .IV**) بشكل خطي (R^2=0.993) وهو يعبر عن المحتوى الفينولي في كل مستخلص بعدد (mg) لكل 1g من الوزن الجاف للعينة.

الجدول (2.V):قيم الامتصاصية لكل عينة والتقدير الكمي للفينولات .

العينة	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
A(nm)	0.056	0.102	0.076	0.205	0.098	0.127	0.104	0.113	0.139
كميةالفينولات الكلية(mg/g)	32.17	59.08	43.87	119.33	56.74	73.70	60.25	65.51	80.70

مناقشة النتائج :

نلاحظ من خلال النتائج المتحصل عليها أن كمية الفينولات تختلف من منطقة لأخرى فنجد أن عينة ولاية بجاية P4 تحوي على النسبة الأكبر(**119.33mg/g**) تليها عينة الوادي P9 (**80.70 mg/g**) و أدناها عينة تيبازة بنسبة (**32.17 mg/g**) ، إن هذا الاختلاف يعود بالطبيعة إلى المصدر النباتي أو نوع الأزهار .

2. تقدير كمية الفلافونويدات الكلية :

اعتمدنا في تقدير الفلافونويدات على قدرة تكوين المعقد الأصفر بين ثلاثي كلور الألمنيو م (**$AlCl_3$**) مع مجموعة الهيدروكسيل (**OH^-**) الموجودة على الحلقات البنزينية للفلافانويدات . وباستعمال الروتين كفينول مرجعي، حيث أظهر هذا التقدير أن هناك تناسب طردي بين زيادة الكثافة الضوئية وتركيز الروتين (**0.03g/l** و**0.3g/l**) حيث تم رسم المنحنى (**2.IV**) بشكل خطي (**R^2=0.999**) وهو يعبر عن كمية الفلافونويدات في كل مستخلص بعدد (**mg**) لكل **1g** من الوزن الجاف للعينة.

الجدول (3.V): قيم الامتصاصية لكل عينة والتقدير الكمي الفلافونويدات .

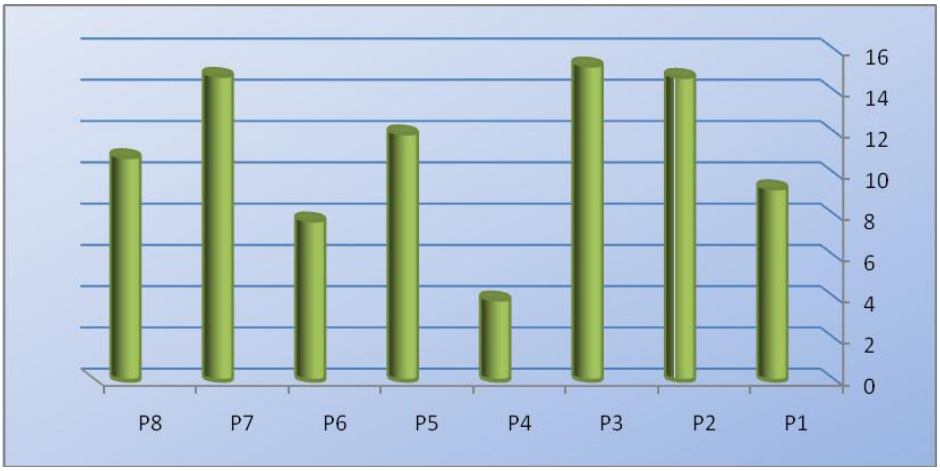
العينة	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
A(nm)	0.480	1.295	1.01	0.714	1.023	1.08	1.328	1.066	0.978
كميةالفلافونويدات الكلية(mg/g)	3	8.70	6.70	4.70	6.80	7.20	8.90	7.10	6.50

مناقشة النتائج :

من خلال هذه النتائج نلاحظ أن كمية الفلافونويدات تكون بنسبة معتبرة في عينة تلمسان ب(**8.90mg/g**) تليها عينة منطقة الشلف (**8.70mg/g**) وأقل كمية نجدها في عينة تيبازة (**3mg/g**) .

3. مقارنة بين التقدير الكمي للفينولات و الفلافانويدات :

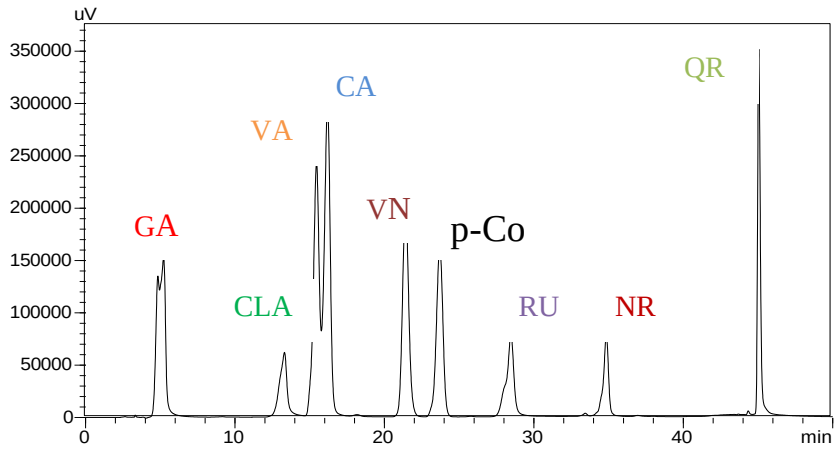
انطلاقا من نتائج التقدير الكمي للفينولات و الفلافانويدات في المستخلصات الميثانولية نرسم المنحنى **(5.V)** الذي يمثل المقارنة بين كمية الفينولات و الفلافونويدات في المستخلصات حيث نجد أن نسبة الفينولي الفلافنويدات قليلة مقارنة مع دراسات سابقة، هذه النسب تراوحت بين (3.93% و 15.27%) لعينات الوادي P3 وP4



المنحنى (2.V): يوضح النسبة بين كل من الفينولات و الفلافونويدات .

4.V نتائج تقدير بعض الأحماض الفينولية و الفلافونويدات بالكروماتوغرافيا السائلة عالية الاداء (HPLC):

بعد عملية الحقن مزيج من المحاليل القياسية في جهاز (HPLC)، حصلنا على أزمنة مكوث مختلفة للمركبات الفينولية و المنحنى ()التالي يوضح ذلك

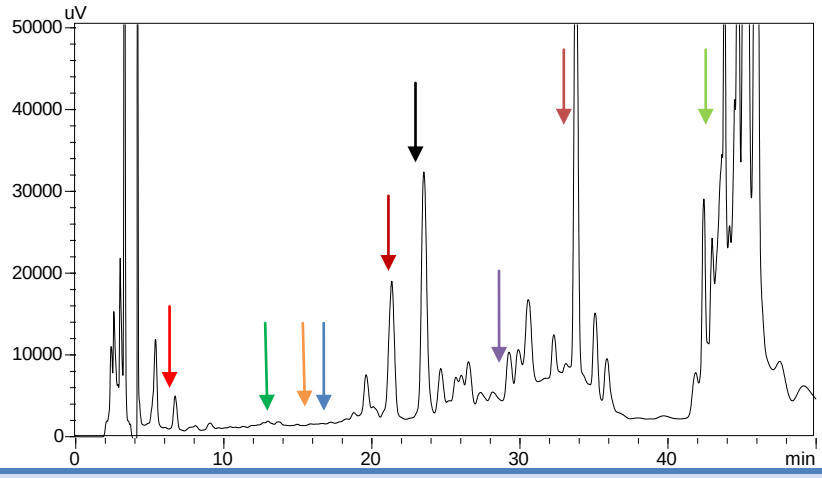


المنحنى (3.V): الكروماتوغرام الممثل للفينولات المرجعية المدروسة

من خلال المنحنى القياسي يمكن استنتاج الجدول التالي والذي يوضح مختلف أزمنة المكوث للمركبات القياسية .

الجدول (4.V): زمن المكوث لكل مركب فينولي .

المركبات الفينولية	زمن الخروج T_R (min)
حمض الغاليك	5.29
حمض الكلورجينيك	13.392
حمض الفانيليك	15.531
حمض الكافييك	16.277
الفانيلين	21.46
كومارين	23.817
روتين	28.37
النارجين	34.788
الكريستين	45.047



المنحنى (4.V): الكروماتوغرام الممثل لفينولات العينة P3

التحليل الكيفي:

من خلال المنحنيات الكروماتوغرافية المتحصل عليها لمستخلصات حبوب اللقاح نستطيع إثبات وجود الفينولات والفلافونويدات فيها وهذا لظهور قمم موافقة لنفس زمن المكوث لكل مركب فينولي ، حيث نجد أن

جميع العينات المدروسة تحتوي على المركبات الفينولية القياسية عدى عينة تيبازة والتي نلاحظ أنها لا تحوي حمض الكفاييك كما هو موضح في المنحنيات (الرجوع للملحق) .

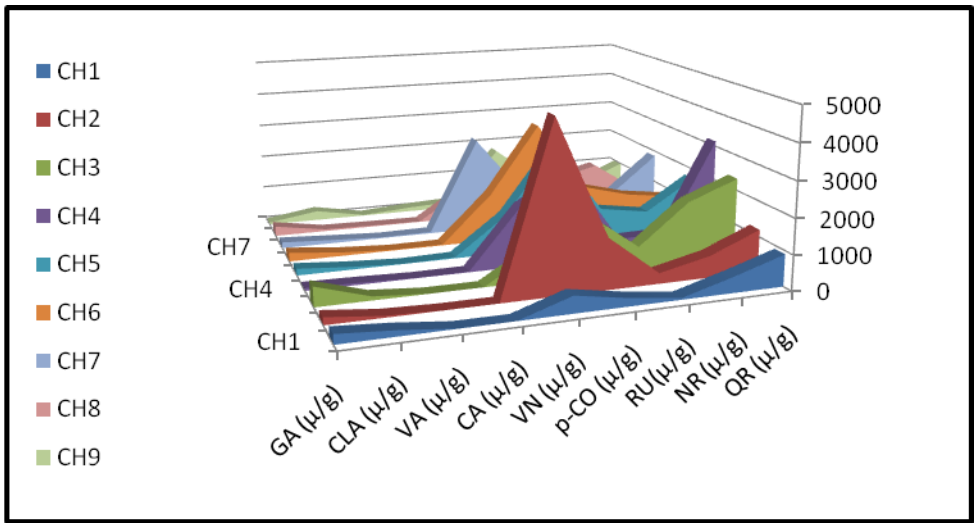
التقدير الكمي :

بعد معرفة أنواع الفينولات الموجودة في كل عينة يمكن حساب نسبتها بإستعمال المنحنيات القياسية، و النتائج ملخصة في ***الجدول (5.V)*** والممثلة في المنحنى***(5.V)***.

الجدول (5.V):تقدير كمي للمركبات الفينولية في مستخلصات حبوب اللقاح .

عمود1	GA (µ/g)	CLA (µ/g)	VA (µ/g)	CA (µ/g)	VN (µ/g)	p-CO (µ/g)	RU(µ/g)	NR (µ/g)	QR(µ/g)
CH1	270.646	165.709	6.888	ND	482.102	232.395	50.121	455.245	902.238
CH2	211.241	53.561	7.7861	5.528	4799.855	1453.722	300.821	621.915	1209.786
CH3	563.122	113.247	2.563	1.573	872.263	1715.203	646.731	1796.202	2337.591
CH4	78.281	54.959	11.567	18.611	1727.237	2591.411	489.997	520.475	3144.638
CH5	196.108	81.357	5.522	36.081	1110.084	2989.851	1042.684	820.109	1720.545
CH6	255.125	104.329	22.442	27.734	1414.179	3403.529	1391.888	1014.257	824.276
CH7	177.275	95.698	23.487	39.944	2783.521	991.665	919.649	701.532	1843.591
CH8	292.95368	54.793446	29.50966	11.80739	948.3217	481.4951	1002.69	1339.13	396.2581
CH9	56.814981	286.90053	16.07941	123.8348	188.6951	1781.293	690.8933	406.4812	996.9302

من خلال النتائج المتحصل عليها من الجدول (6.V) نقوم بتمثيل المنحنى التالي والذي يعبر على المحتوى الفينولي لمستخلصات حبوب اللقاح .



***المنحنى (5.V)*:التمثيل البياني لتقدير الكمي للمركبات الفينولية للمستخلصات .**

مناقشة النتائج :

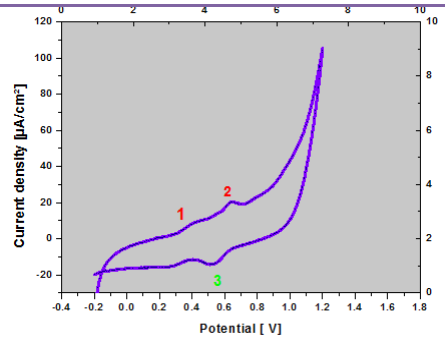
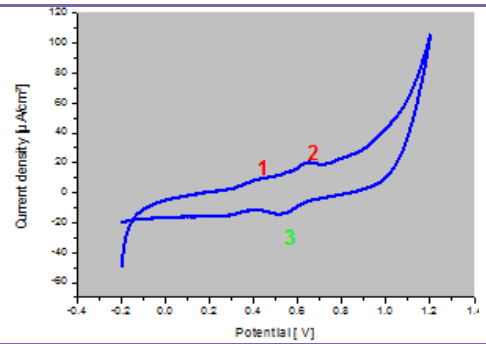
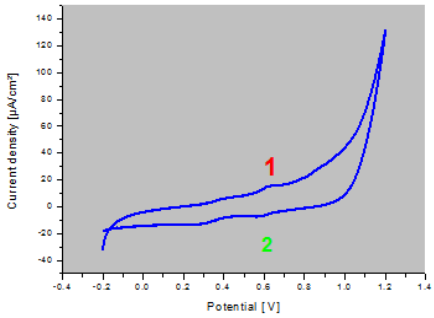
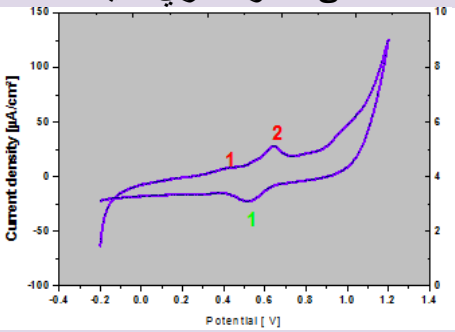
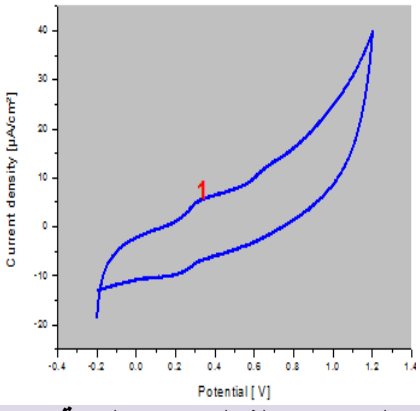
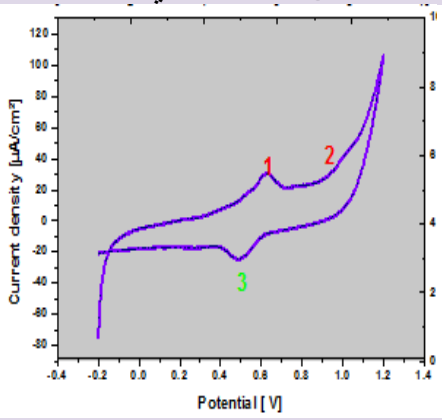
من خلال المنحنى السابق و الجدول (6.V) نجد أن كمية الاحماض فينولية في أغلب المستخلصات جد ضعيفة مقارنة الفلافانويدات، يرجع سبب ذلك الى محدودية المركبات القياسية المستعملة والتي يعتبر جزء ضئيل امام الكم الهائل من المركبات الفينولية الموجودة في المستخلاص .

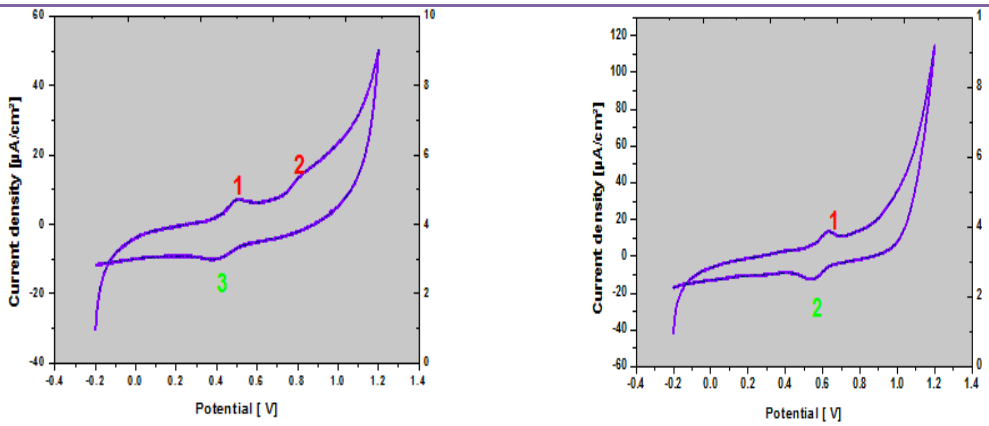
V .5. نتائج الدراسة الكهروكيميائية.

رسم المنحنيات الفولطامترية الحلقية للعينات:

بنفس الطريقة التي عاملنا بيها المحاليل القياسية (حمض الكافييك والروتين) و نفس الشروط التجريبية نعامل مستخلصات حبوب اللقاح و نرسم المنحنيات الفولطامترية الحلقية وفولطامترية الموجة المربعة وكانت النتائج كالتالي كالتالي :

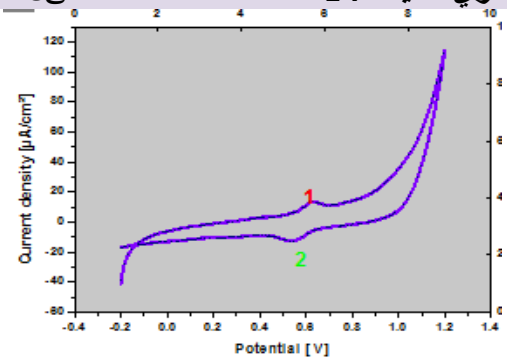
الجدول (6.V):جدول يوضح المنحنيات الفولطامترية للعينات المدروسة.

	
المنحنى1 الفولتامتري للعينة P1	المنحنى2 الفولتامتري العينة P2
	
المنحنى3 الفولتامتري العينة P3	المنحنى4 الفولتامتري العينة P4
	
المنحنى5 الفولتامتري العينة P5	المنحنى6 الفولتامتري العينة P6



المنحنى7 الفولتامتري العينة P7

المنحنى8 الفولتامتري العينة P8



المنحنى9 الفولتامتري العينة P9

من خلال المنحنيات المتحصل عليها يمكننا استخلاص كمونات الاكسدة و الارجاع لمستخلصات العينات المدروسة ومقارنتها بكمونات الاكسدة والارجاع للمركبين القياسيين وهما حمض الكافييك و الروتين مثل ما هو ممثل في الجدول التالي :

الجدول (7.V):قيم كمونات الاكسدة والارجاع للمحاليل القياسية و المستخلصات.

	E_{Pc}	E_{Pa}
حمض الكافييك	0.48	0.41
الروتين	0.42	0.28
	0.7	0.08
	1.11	
P1	0.42	0.56
	0.62	0.28
P2	0.44	0.53
	0.66	
P3	0.42	0.57
	0.62	0.3
P4	0.4	0.51

	0.63	
P5	0.3	0.56
	0.7	0.18
P6	0.6	0.4
P7	0.63	0.48
P8	0.64	0.53
P9	0.64	0.54

تمكننا مقارنة السلوك الكهروكيميائي للمستخلصات بالسلوك الكهروكيميائي للمركبات القياسية من معرفة مدى التقارب بينهما حيث يمكن أن يعكس هذا التقارب المركبات الغالبة في هذه المستخلصات فمثلا نجد أن اقرب عينة للروتين في سلوكها الكهروكيميائي هي P3 وهي عينة الوادي حيث نلاحظ التطابق في قيمة كمون الأكسدة الأول والتقارب في كمون الأكسدة الثاني و كمون الإرجاع الثاني.

الملاحظ أن المستخلصات أيضا P1-P2-P3-P4-P5 لها كموني أكسدة وكموني إرجاع بينما العينات P6-P7-P8-P9 لها كمون أكسدة وكمون إرجاع، وهذا يدل على أن المجموعة الأولى أكثر تنوعا من المجموعة الثانية .

كما يمكن أن تفسر الملاحظة السابقة بغالبية نوع معين من المركبات الفينولية ، حيث أن اغلب الأحماض الفينولية تحوي كمون أكسدة واحد و كمون إرجاع واحد ،بينما تحوي الفلافونويدات على أكثر من كمون أكسدة وأكثر من كمون إرجاع .

V.6. نتائج تقدير الفاعلية المضادة للأكسدة :

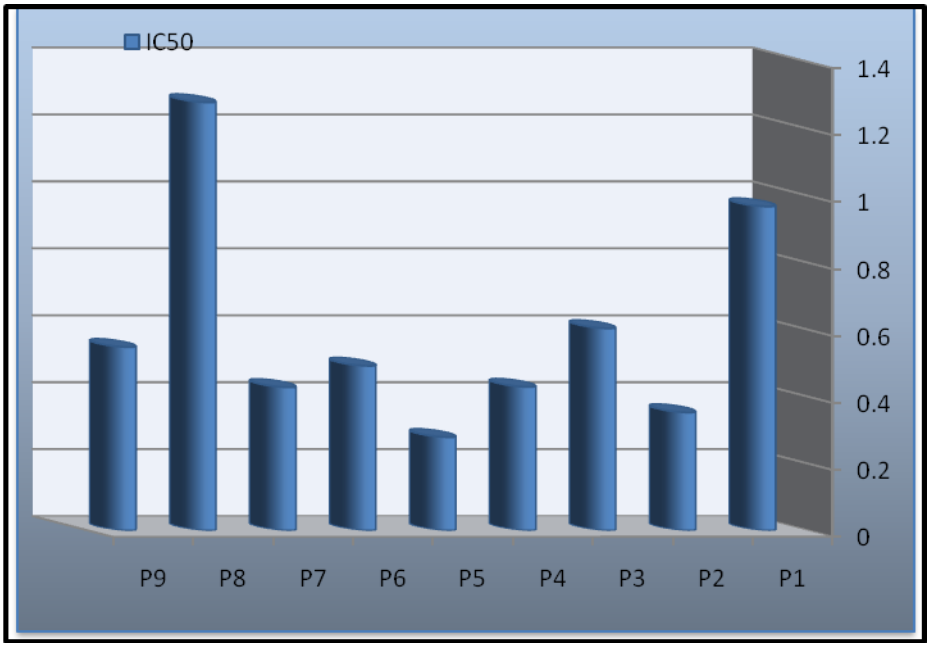
هي قياس لقدرة المستخلص أو المركب لتثبيط الجذر الحر أو توقيف عملية الأكسدة، تقدر الفاعلية المضادة للأكسدة بعدة طرق . و في دراستنا هذه قمنا باختبار (DPPH) ، اختبار إجمالي فعالية مضادات الأكسدة الكلية (TAC) باستعمال موليبدات الامنيوم و اختبار TBTS .

1. إختبارDPPH:

من منحنيات تغير النسبة المئوية للتثبيط بدلالة التركيز لكل من مستخلصات حبوب الطلع ولحمض الأسكوربيك (AA) نحسب قيم IC_{50} والتي دونت في الجدول (***8.V***).

الجدول (8.V):قيم IC50 و ARP .

العينة	قيم IC_{50} (mg/ml)	قيم $ARP(IC_{50})$
حمض الاسكوربيك	0.00918	108.932
P1	0.968	1.033
P2	0.353	2.832
P3	0.604	1.655
P4	0.429	2.331
P5	0.279	3.584
P6	0.492	2.032
P7	0.428	2.336
P8	1.279	0.781
P9	0.548	1.824

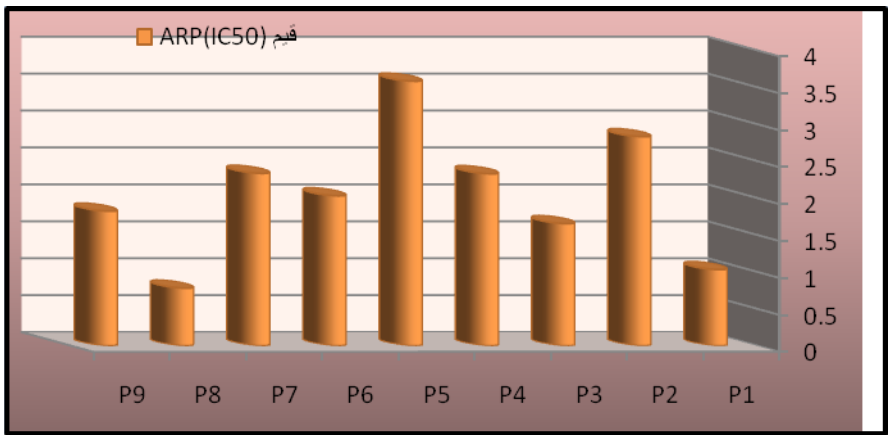


المنحنى (V. 6):التركيز المثبط ل% IC_{50}

- **مناقشة النتائج المتحصل عليها :**

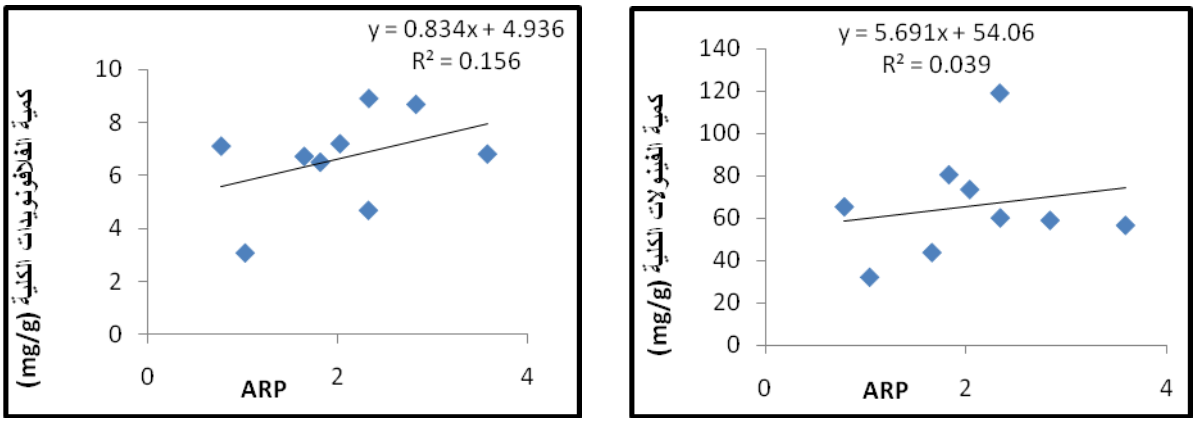
يتضح من خلال قيم % IC_{50} في الجدول ***(8.V)*** والمنحنى ***(6.V)*** أن الفعالية المضادة للأكسدة لمستخلصات حبوب الطلع ضعيفة نسبيا مقارنة بفاعلية حمض الأسكوربيك، حيث كانت P5 أكثر فعالية من بقية العينات رغم أنها لا تمتلك الكمية الاكبر من الفينولات، و قد يفسر ذلك بنوعية المركبات الفينولية المتواجدة بالعينة حيث يمكن أن تكون كمية المركبات معتبر لكنها لا تمتلك فعالية كبيرة .

كما يمكن استعمال قيمة (ARP) التي تزيد بزيادة الفعالية المضادة للأكسدة كما يوضحه **المنحنى (7.V)** :



المنحنى (7 .V): قيم $ARP(IC_{50})$

من خلال هذه النتائج وما توصلنا إليه سابقا من هذا الفصل يمكن معرفة ما مدى قوة العلاقة التي تربط بين قيم الفعالية المضادة للأكسدة والتقدير الكمي للفينولات و الفلافونويدات **المنحنى *(8.V)***)



المنحنى (8.V): يوضح علاقة الارتباط بين كمية الفينولات والفلافون ودات ونتائج اختبار القوة الفعالية المضادة للأكسدة (DPPH) للمستخلصات عند IC_{50}.

و من خلال المنحنى نلاحظ أن هذه العلاقة ضعيفة جدا و الذي يمكن تفسيره بنوعية المركبات الفينولية التي تحتوي عليها المستخلصات خاصة وان هذه العينات جمعت من مناطق متعددة من الوطن و بالتالي تنوع المصدر والتركيب الكيميائي لها .

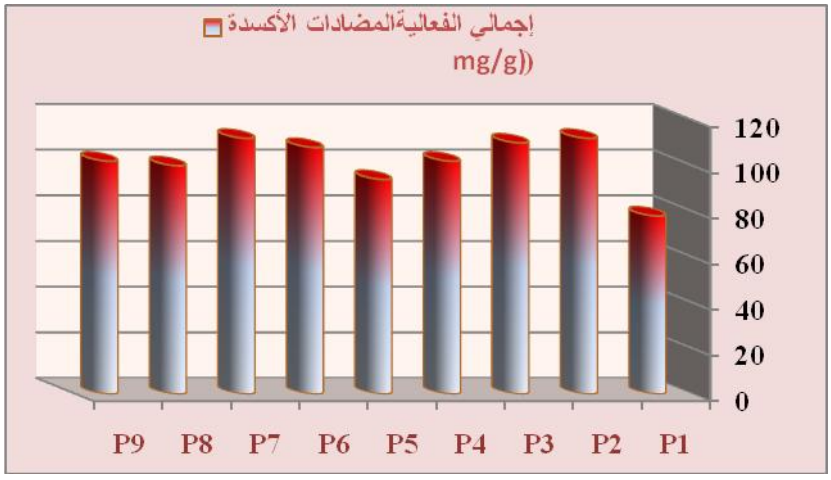
1. اختبار إجمالي فعالية مضادات الأكسدة (TAC) باستعمال موليبدات الامنيوم:

اعتمدنا في تقدير الفعالية المضادة للأكسدة على طريقة (The phosphomolybdenum method) على قدرة تشكيل معقد phosphate/Mo(V) ذو اللون الأخضر وذلك بإرجاع Mo(VI) إلى Mo(V) في المستخلصات الميثانولية . وباستعمال حمض الغاليك كفينول مرجعي، لحساب التراكيز في مختلف المستخلصات وذلك بإسقاط هذه النتائج على المنحنى القياسي، من اجل حساب كمية المضادات الأكسدة في كل مستخلص. حيث أظهر هذا التقدير أن هناك تناسب طردي بين زيادة الكثافة الضوئية وتركيز حمض الغاليك **(0.03 g/ml و0.250 g/ml)**، تم رسم المنحنى *(V. 9)* بشكل خطي **(R^2=0.996)** وهو يعبر عن الفعالية المضادة للأكسدة في كل مستخلص بعدد **(mg)** لكل **1g** من الوزن الجاف للعينة.

2. دونا نتائج إجمالي فعالية المضادات الأكسدة المتحصل عليها في الجدول التالي:

3. الجدول (V.9):تقدير اجمالي الفعالية المضادة للاكسدة.

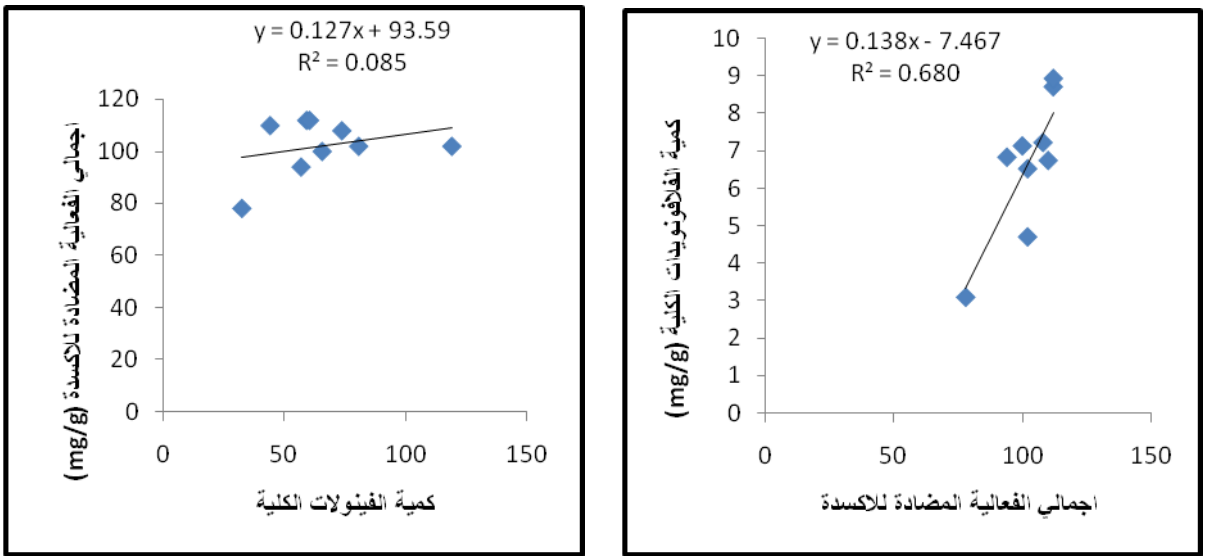
العينة	إجمالي الفعالية المضادات الأكسدة (mg/g)
P1	78
P2	112
P3	110
P4	102
P5	94
P6	108
P7	112
P8	100
P9	102



المنحنى (V. 9): مقارنة نتائج اختبار TAC لمستخلصات حبوب اللقاح.

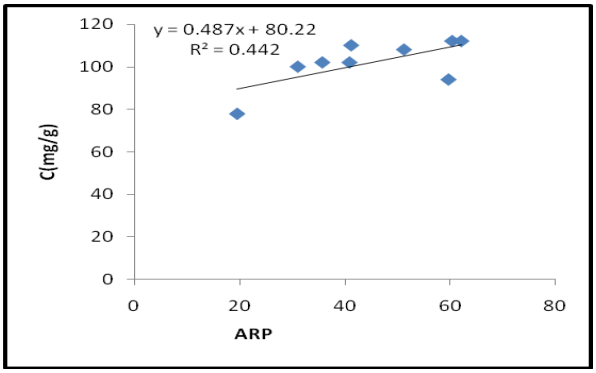
مناقشة النتائج المتحصل عليها :

يتضح من خلال النتائج المتحصل عليها والممثلة أعلاه أن إجمالي الفعالية المضادة للأكسدة للمستخلصات جاءت مختلفة فيما بينها في مستخلصات حبوب اللقاح من عينة لأخرى، حيث كانت اعلى قيمة للعينتين P2 و P7 والتي قدرت ب **(112mg/g)** ، فيما كانت قيم ة الفعالية المضادة للأكسدة لعينة تيبازة ضعيفة **(78mg/g)** . يمكن تفسير النتائج المتحصل عليها و ذلك بناءا على علاقتها بكمية الفينولات والفلافونويدات ممثلة في المنحنى **(10.V).**



المنحنى (V. 10): يوضح علاقة الارتباط بين كمية الفينولات والفلافانويدات ونتائج اختبار الفعالية المضادة للأكسدة للمستخلصات.

من خلال المنحنى أعلاه يظهر جليا قوة الترابط بين نتائج اختبار الفعالية المضادة للأكسدة وكمية الفلافونويدات حيث نجد **(R^2=0.680)**، كذلك نلاحظ أن علاقة ترابط ضعيفة بين الفعالية المضادة للأكسدة وكمية الفينولات حيث لدينا **(R^2=0,085)**، كما يمكن معرفة مدى العلاقة بين كل من الاختبارين السابقين من خلال رسم منحنى التالي :



المنحنى (V. 11):يوضح علاقة الارتباط بين ال ARP و اجمالي الفعالية المضادة للاكسدة .

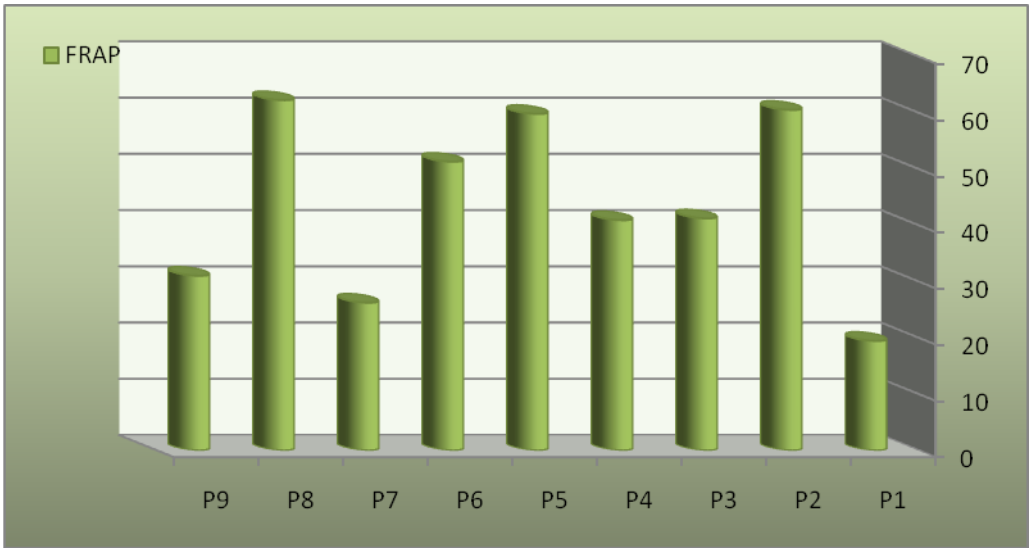
نلاحظ من خلال المنحنى أن هذه العلاقة ضعيفة ويظهر ذلك من قيمة R^2 التي تعبر عن هذا الارتباط $R^2 = 0.442$ وهي قيمة جد ضعيفة .

4. اختبار إجمالي فعالية مضادات الأكسدة الكلية FRAP :

يعتبر حمض الاسكوربيك مركب مرجعي في اختبار FRAP حيث تكون النتائج النهائية لهذا الاختبار بما يكافئ فعاليته ، الجدول التالي يوضح التقدير الإجمالي للفاعلية المضادة للأكسدة للمستخلصات .

الجدول (V. 10): يوضح التقدير الاجمالي للفعالية .

العينة	(mgAAE/g)FRAP
P1	19.476
P2	60.539
P3	41.248
P4	40.933
P5	59.830
P6	51.326
P7	62.271
P8	31.051
P9	35.736



المنحنى (V.12): مقارنة نتائج اختبار FRAP لمستخلصات حبوب اللقاح .

مناقشة النتائج :

نلاحظ بان الفعالية المضادة للأكسدة للعينة P8 مرتفعة مقارنة ببقية العينات ، وقد يرجع ذلك إلى احتوائها على اكبر قيمة من الفلافونويدات ، كما يلاحظ أن العينة P1 اقل فعالية ويمكن أن يكون ذلك بسبب أنها تحتوي على اصغر كمية من الفينولات .

الخاتمة :

من خلال الدراسة المجهرية لبعض العينات المدروسة نستنتج أن حبوب اللقاح تتعدد و تختلف من عينة لأخرى من حيث الخصائص الفيزيائية (اللون، الشكل، ....) وهذا راجع إلى المصدر النباتي لها.

إن التقدير الكمي للفينولات الكلية للعينات اثبت أن كمية الفينولات تختلف من عينة لأخرى ونفس الشيء بالنسبة لتقدير الفلافانويدات ، وهذا ما تؤكده تقنية الكروماتوغرافية ذات الكفاءة العالية .و من خلال دراسة السلوك الكهروكيميائي للمستخلصات اتضح لدينا أن لها صفات مشتركة مع الفينولات والفلافانويدات .

كما أظهرت اختبارات الفعالية المضادة للأكسدة أن المستخلصات تملك فعالية مضادة للأكسدة جد عالية، أن العلاقة بين كمية الفينولات أو الفلافانويدات جد ضعيفة و يمكن تفسير ذلك بأن الفعالية المضادة للأكسدة تتعلق بنوعية المركبات الفينولية الموجودة بالمستخلصات أكثر من الكمية .

خلاصة عامة

خلاصة عامة

منتجات نحل العسل سواء كان: عسل، حبوب الطلع، شمع النحل، سم النحل ... ، فهي ذات فائدة كبيرة للإنسان وذلك لاحتوائها على مركبات فعالة طبيعية تختلف فيما بينها في البنية والتأثيرات البيولوجية وكذلك آليات التأثير، وتعتبر عديدات الفينول وخاصة الفلافونويدات والأحماض الفينولية ذات تأثيرات مزيحة للجذور الحرة ومضادة للأكسدة.

إرتأينا من خلال هذا العمل إلى تثمين أحد أهم منتجات النحل وهي حبوب اللقاح، لهذا تم جمع تسع عينات من حبوب الطلع لمناطق مختلفة من الوطن ، وشملت هذه الدراسة مقارنة المحتوى الكمي للمواد الفعالة وهنا أخذنا المركبات الفينولية مع الفعالية المضادة للأكسدة أي القدرة على تثبط الجذور الحرة، كما تم من جهة أخرى أجراء دراسة مبدئية للسلوك الكهروكيميائي للعينات وربطه بالسلوك الكهروكيميائي للمركبات الفينولية، هذا وقد إعتمدنا على كروماتوغرافية ذات الكفاءة العالية لإبراز البصمة الفينولية في حبوب الطلع .

كخطوة أولى في هذا العمل قمنا بعملية الاستخلاص بحيث اعتمدنا تركيب سوكسلي والتي استطعنا من خلالها الحصول على مردود معتبر من المركبات الفينولية، حيث قدرت كميتها 63.60% بالنسبة لعينة البليدة أما أقل مردود فنجد عينة سطيف بنسبة 42.39% .

وبعد عملية الإستخلاص تم تقدير كمية الفينولات والتي كانت كميتها في مستخلص بجاية أعظمية وقدرت ب 119.33mg/g ، تليها الوادي (تغزوت) بمقدار 80.70mg/g واقلها عينة تيبازة بكمية 32.17mg/g . أما تقدير الكمي الفلافونويدات فقد كانت عينة تلمسان سجلت أكبر كمية ب 8.90mg/g وتليها الشلف بمقدار 8.70mg/g و الأقل هي عينة تيبازة ب 3mg/g . من خلال هذه النتائج يظهر جليا غنى حبوب الطلع بالمركبات الفينولية. أما الاختلاف في الكميات من منطقة لأخرى فسببه تنوع الغطاء النباتي في الجزائر.

في المرحلة الثانية قمنا بدارسة الفعالية المضادة للأكسدة للمستخلصات وذلك بالاعتماد على الاختبارات التالية: اختبار (DPPH)، اختبار المولبيدات (TAC)، اختبار FRAP . بحيث أخذنا كل من حمض الاسكوربيك و الغاليك كمركبات قياسية، ولقد أظهرت النتائج أن جميع المستخلصات تملك فعالية معتبرة وخاصة عينة سطيف، تلمسان و الشلف .

ومن خلال النتائج تم المقارنة بين اختبار (DPPH)، اختبار المولبيدات (TAC)، اختبار FRAP حيث أظهرت هذه النتائج أن العلاقة بين كمية الفينولات أو الفلافانويدات جد ضعيفة و يمكن تفسير ذلك بأن الفعالية المضادة للأكسدة تتعلق بنوعية المركبات الفينولية الموجودة بالمستخلصات أكثر من الكمية .

كما قمنا بالتحليل الكروماتوغرافي (HPLC) والذي اظهر أن غالبية المستخلصات جد غنية بالمركبات الفينولية من نوع الفلافونويدات أكثر من الأحماض الفينولية .

أثناء الدراسة الكهروكيميائية لإبراز بصمة المركبات الفينولية في حبوب اللقاح اكتفينا مبدئيا بمقارنة السلوك الكهروكيميائي لمركبين احدهما فينول و الأخر فلافونويد بالسلوك الكهروكيميائي للمستخلصات وعليه فان هاته المقارنة قد أعطت انطباع ايجابيا يشجع على دراسات مستقبلية معمقة.

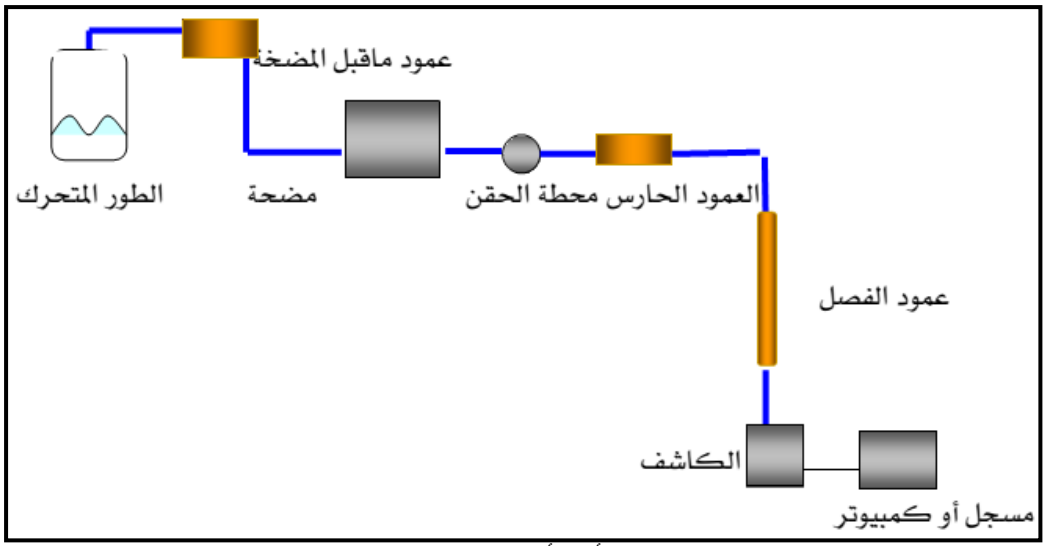
المملوحة

1. الكروماتوغرافية السائلة عالية الاداء (HPLC):

طريقة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء بجهاز HPLC الذي يعتبر من أفضل أجهزة الفصل المستخدمة، وذلك لما يتميز به من بساطة و سرعة عالية في الفصل ودقة متناهية بإستخدام مادة صلبة ذات قابلية عالية لإمتزاز المركبات أو ما يسمى بكروماتوغرافيا الإمتزاز الشكل (1) يوضح أهم أجزاء الجهاز.

- **كاشف Détecteur:** وهو لاقط UV، الذي يعتبر من أبسط أنواع الكواشف المستعملة، تصل حساسيته إلى ما يقارب 10^{-8} M، وهو ذو طول موجة متغير أي أنه لا يحدد بنفسه الطول الموجي المخصص للعينة المراد فصلها، كما يتم في هذا النوع من الكواشف تقدير المواد المفصولة كميًا ونوعيًا وذلك بتحديد الناتج من المواد المذابة في العمود وإعطاء إشارة تتناسب مع كمية كل من المواد المذابة في الخليط.
- **الطور الثابت Column:** أو ما يسمى بالعمود، يعتبر عمود الفصل القلب النابض في الجهاز المثبت داخل فرن مغلق معبأ من الداخل بحبيبات المادة الصلبة ، وهو الذي يعيق الحركة ويعمل على فصل مكونات الخليط.
- **وحدة الحقن Injection:** يتم فيها حقن العينات المراد فصلها بواسطة إبرة خاصة ذات حجم (25µℓ)، تقوم وحدة الحقن بتأمين حجم حقن ثابت حيث يخرج الفائض منها إلى الخارج.
- **الـخـزان (الطور المتحرك):** خزان الطور المتحرك مكون من خزانين (أي أنه يمكن إستعمال مذيب واحد فقط أو إثنين كطور متحرك) مصنوعين من الزجاج و متوسط سعتهما 2.5L.
- **الطور المتحرك:** وهو الذي يزود المكونات بقوة الدفع والحركة، يستخدم في بعض الحالات مذيب واحد لفصل كل مكونات الخليط، وأحيانًا يستخدم خليط من مذيبات مختلفة لفصل هذه المكونات.

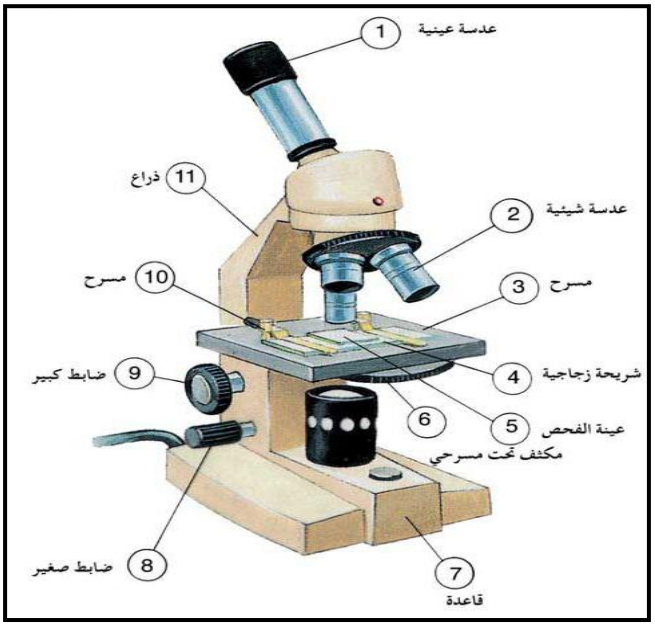
و الشكل التالي يوضح مخطط لمختلف مكونات جهاز HPLC .



الشكل (1) أهم أجزاء جهاز ال HPLC .

2. طريقة العمل بالمجهر الضوئي :

لرؤية الكائنات الحية الصغيرة والخلايا يستعمل علماء الأحياء عادة مجهراً ضوئياً مركباً كما يظهر في الشكل **(2)** الذي يوضح أهم مكونات المجهر الضوئي ،



الشكل(2): المجهر الضوئي و مختلف أجزائه .

1. توضع العينة المحضرة على الشريحة في المسرح ثم يحرك المسرح يمينا ويسارا حتى تتوسط العينة فتحة المسرح.
2. تشغيل المصدر الضوئي.
3. الفحص المبدئي باستخدام القوة الصغرى.
4. يستعمل الضابط الدقيق حتى تظهر العينة بوضوح.
5. إذا أريد الفحص بالعدسة الكبرى40 xتحرك القطعة الأنفية إلى العدسة الكبرى. ثم يستعمل الضابط الدقيق حتى تظهر بوضوح.
6. إذا أريد فحص العينة بالعدسة الزيتية x100 توضع نقطة زيت سيدر على العينة وتحرك القطعة الأنفية إلى العدسة الزيتية. ثم يستعمل الضابط الدقيق حتى تظهر بوضوح.

3. الطرق الكهروكيميائية التحليلية :

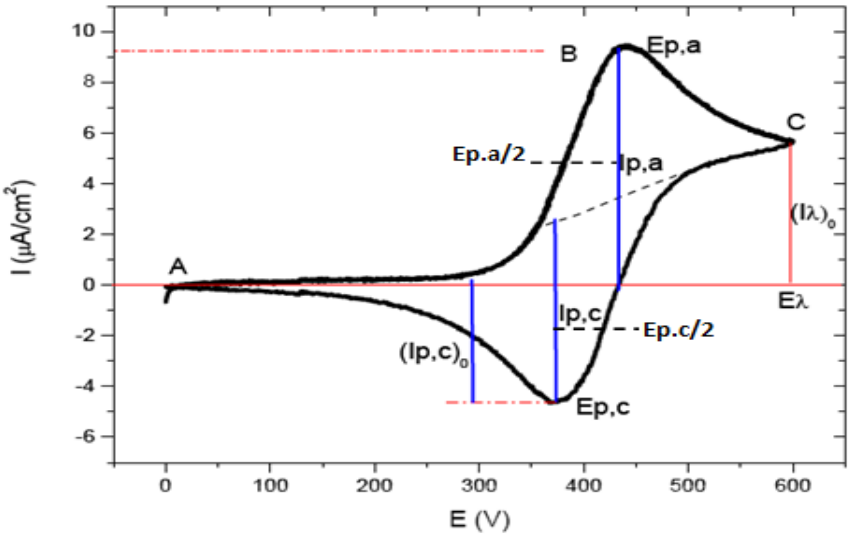
تقنيات التحليل الكهروكيميائي تعد من بين أكثر الطرق المستعملة مخبريا خاصة في مجال التقدير الكمي، وهي تعتمد على القياسات الكهروكيميائية التي تشمل التيار ، المقاومة ، و الجهد .والتي لها علاقة مباشرة مع خصائص المكون الكيميائي المدروس و بشكل عام فان الطرق الكهروكيميائية ذات حساسية وانتقائية عاليتين ، كما أنها غير مكلفة وسهلة الاستعمال.

✍ **الفولطامتري الحلقي Voltamétrie cyclique :**

الفولطامتري الحلقي هو نوع خاص من القياس الالكتروكيميائي لديناميكية الكمون، ومن أجل الحصول على رسم تخطيطي له يغير الكمون المطبق في المحلول، والتغير في التيار الكهربائي يقاس نسبة إلى هذا الكمون.

✍ **مبدأ عمل الفولطامتري الحلقي :** يتغير الكمون خطيا بالنسبة للزمن في الفولطامتري الحلقي. وفيها يطبق فرق الكمون المتغير على الكترود العمل بالنسبة للالكترود المرجعي ويقاس التيار بين الكترود العمل و الالكترود المساعد.

والمنحنى العام للمنحنيات الفولطامترية الحلقية ممثل في الشكل (3) للحالة الأكثر بساطة التي تحدث فيها عملية إرجاع واحدة متبوعة بعملية أكسدة في المجال المدروس. مميز بنتوء للتيار المهبطي يليه نتوء مصعدي ،هذه النتوءات I=f(E) إن المنحنى تميّز بالمقادير التجريبية التالية الممثلة في



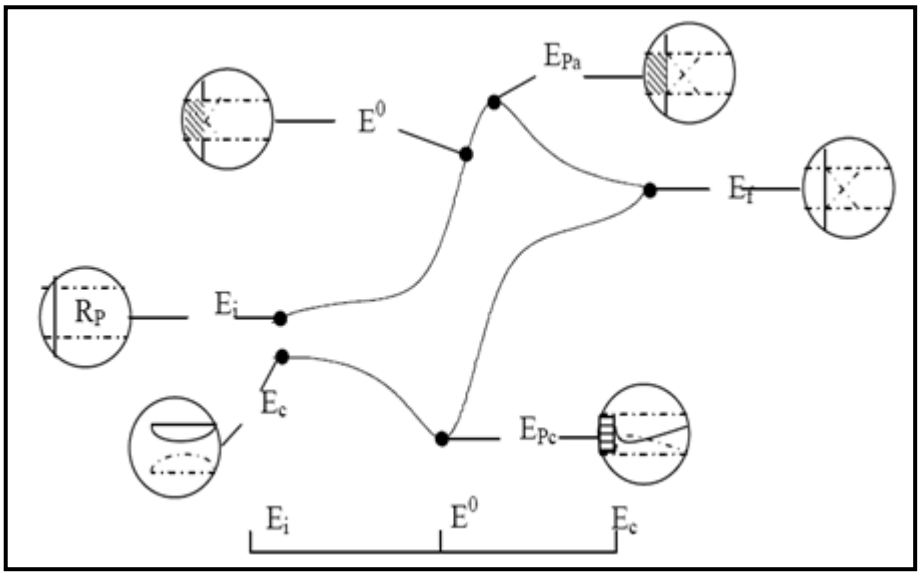
الشكل (3): الفولتاموغرام الدوري المتحصل عليه بواسطة تقنية الفولتامتري الحلقي (C.V).

I_{pc} , I_{pa} تيارات النتوءات المصعدية و المهبطية على الترتيب .
E_{pc} , E_{pa} كمونات النتوءات المصعدية و المهبطية على الترتيب .
$E_{pc/2}$, $E_{pa/2}$ كمونات نصف النتوءات المصعدية و المهبطية على الترتيب .
ΔE_p = التغير في الكمونات بين E_{pa} و E_{pc}

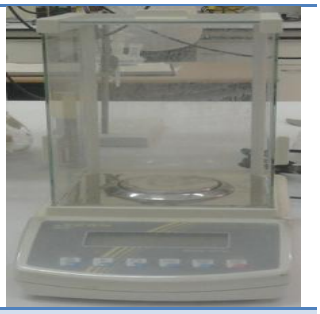
✍ **تفسير منحنى الفولطاأمبيرومتري الحلقي:** إن تركيز المواد المتفاعلة R والمواد الناتجة P مشار إليه في منحنى الفولطامتري الحلقي المعطى بالشكل (4)، عند فروق كمونات مختلفة. تمثل Epc وEpa فرق الكمون ألمهبطي و المصعدي على التوالي:

- **عند فرق الكمون E_i**: ليس هناك أيّة مادة كهروفعّالة ويكون تركيز المادة المتفاعلة R مساويا C_0 في المحلول وكذلك عند المسرى، أما تركيز ناتج التفاعل P فمن البديهي أن يكون مساويا للصفر.

- **عند فرق الكمون E^0**: تكون المادة الكهروفعّالة R عند المسرى في تناقص، بينما المادة الناتجة P يزداد.
- **عند فرق الكمون Ep_a**: يتناهى تركيز المادة المتفاعلة R للصفر في جوار المسرى، في حين أن تركيز المادة الناتجة P يؤول إلى C_0. وهو ما نفسره بظاهرة استهلاك المادة الكهروفعّالة R في جوار المسرى نتيجة لسرعة المسح العالية.
- **عند فرق الكمون E_f**: يزداد سمك طبقة الانتشار لأن المادة الناتجة تنتشر في المحلول ويتناقص مقدار التركيز إلى أن يتناهى إلى مقدار ثابت، ثم يعكس اتجاه المسح لفرق الكمونات.
- **عند فرق الكمون Ep_c**: في هذه الحالة فإن المادة الناتجة P الكهروفعّالة هي التي تكون موجودة عند المسرى، وهي التي تخضع للاستهلاك فيتناقص تركيزها عند المسرى متناهيا للصفر. في حين أن تركيز المادة R يقترب مرّة أخرى من C_0 ونعود من جديد إلى فرق الكمون الابتدائي.



الشكل (4): مخطط بياني مفصل للمنحنى I=f(E) لانتقال إلكترون واحد.



ميزان حساس

جهاز قياس الحموضة الـ pH-mètre

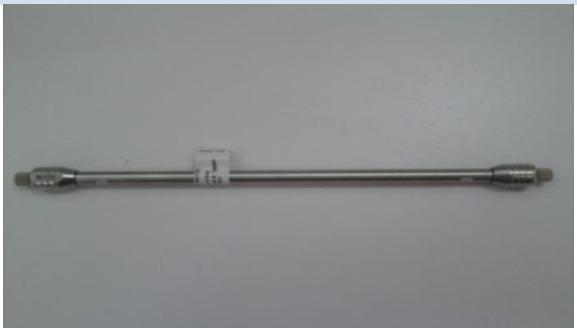
جهاز المزج الكهربائي

جهاز المزج المغناطيسي

فرن

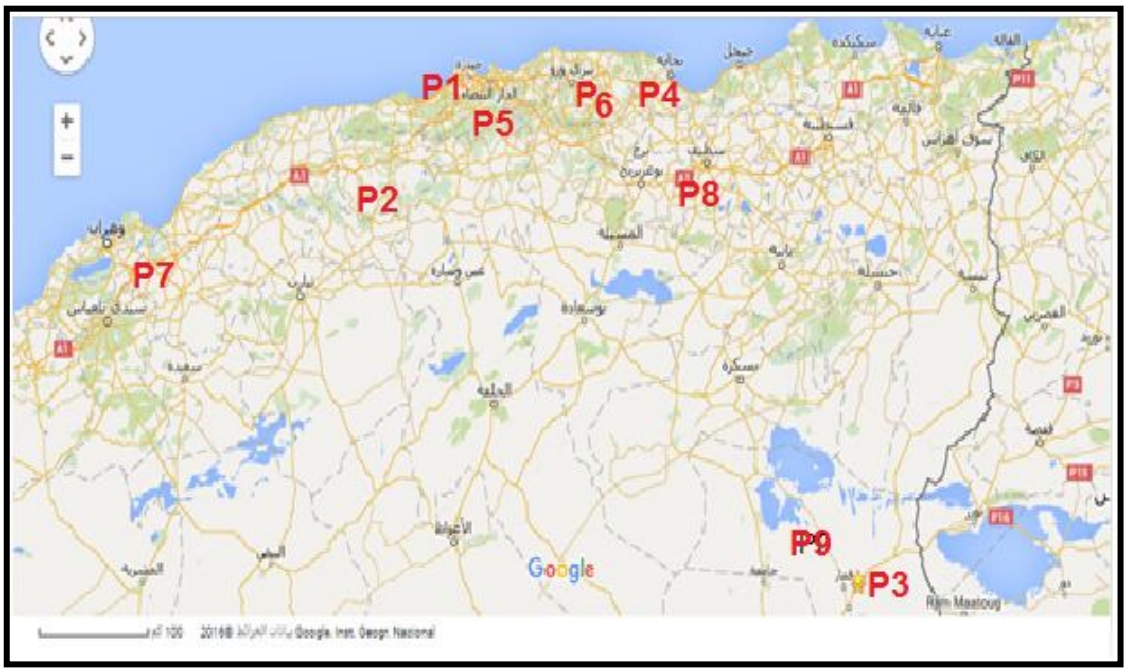
جهاز UVspectrophotometer

إبرة الحقن

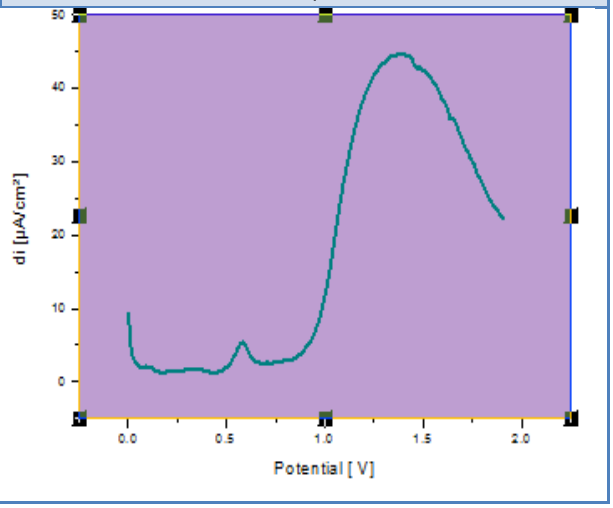
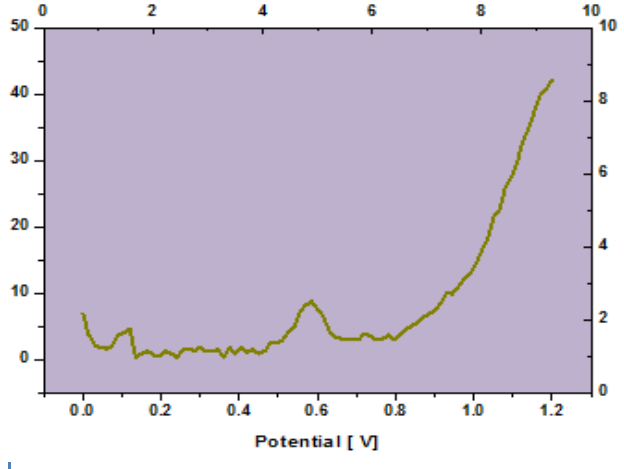


العمود المستعمل في HPLC

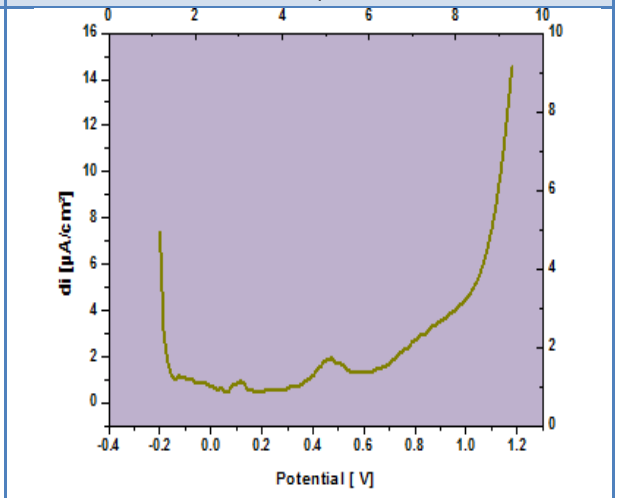
1- صورة مأخوذة من (Google Earth) تبين مواقع التي اخذت منها العينات المدروسة .



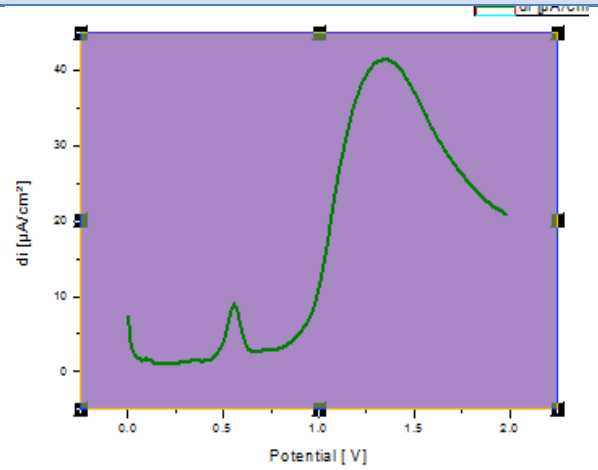
2- جدول يحوي منحنيات الفولطاومتري الموجة المربعة SWV لمستخلصات حبوب اللقاح .

العينة 1	العينة 2
	

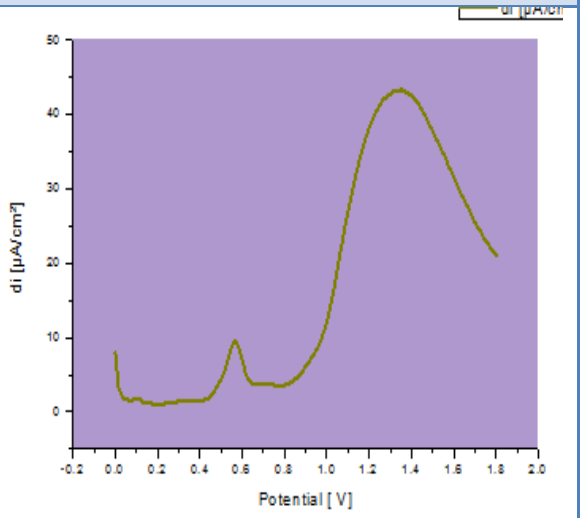
العينة 3



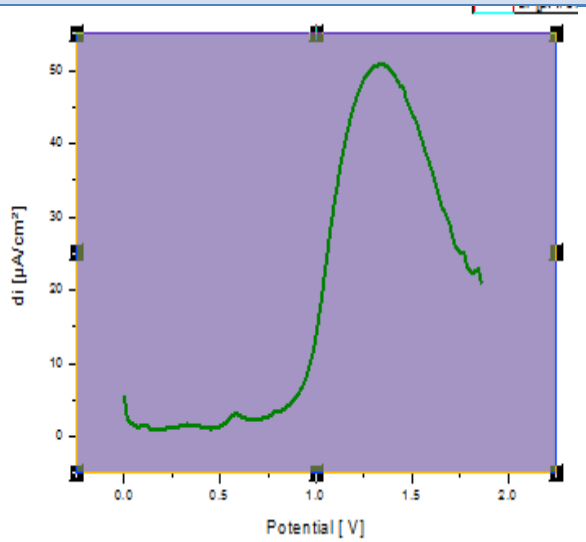
العينة 4



العينة 5

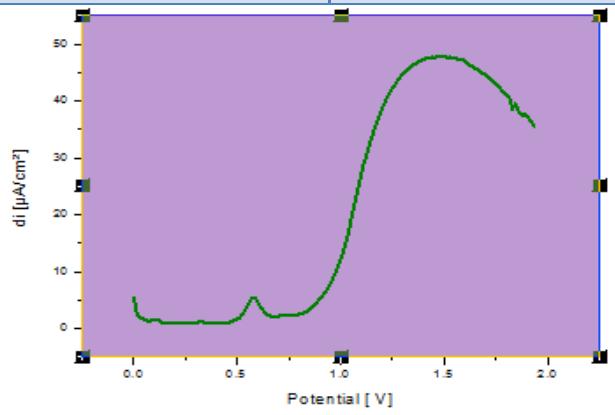


العينة 6



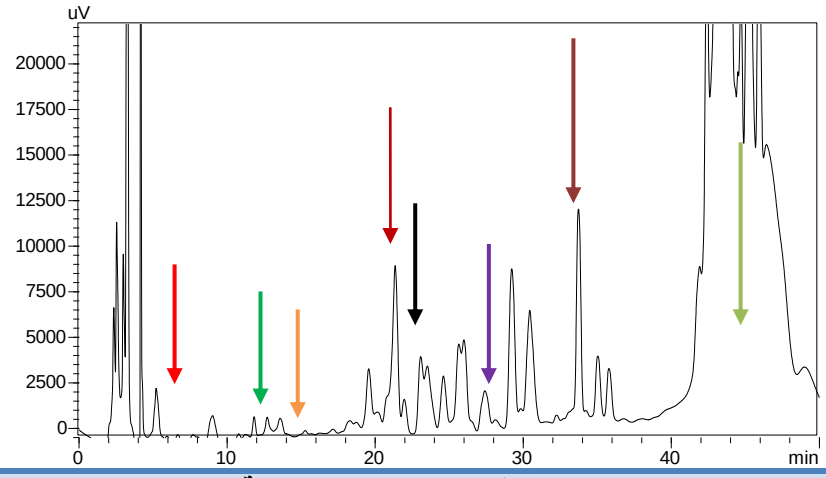
العينة 7

العينة 8

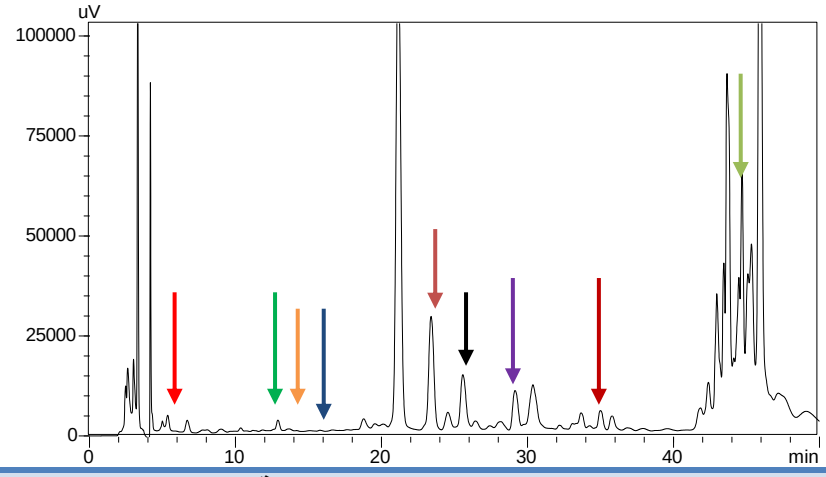


العينة 9

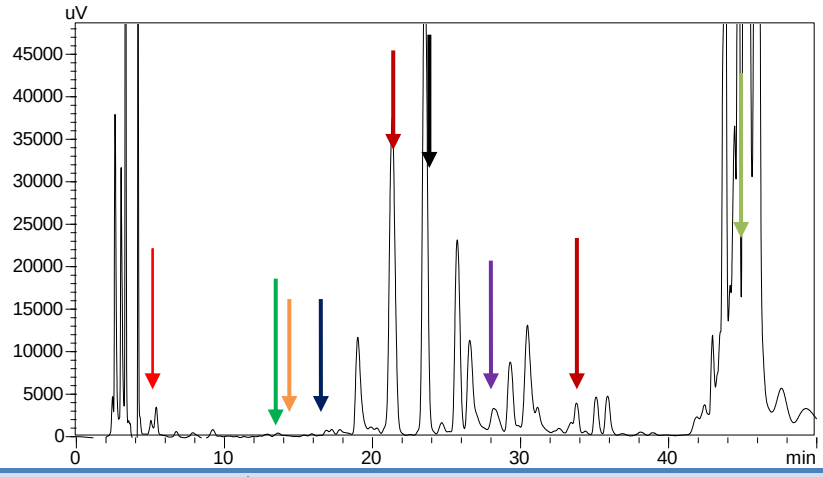
3- الكروماتوغرام لنتائج ال HPLC للمستخلصات :



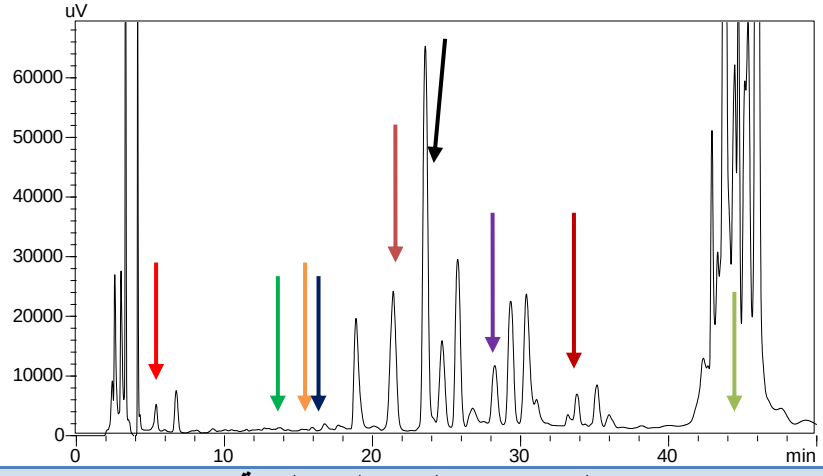
الكروماتوغرام لمستخلص العينة P1



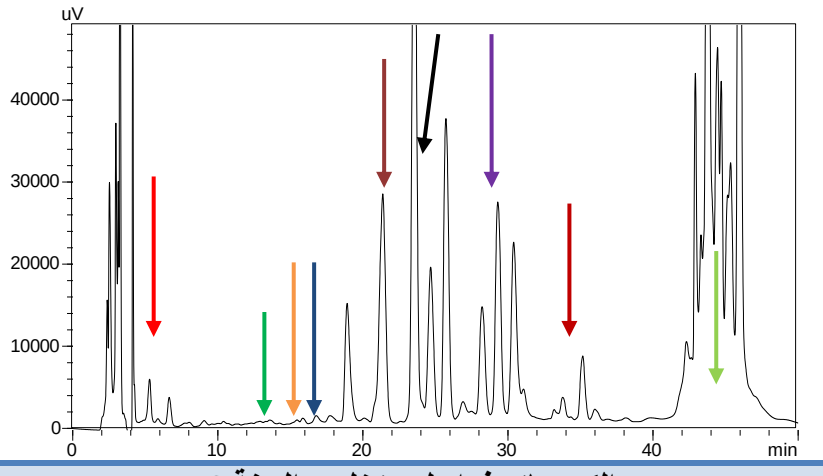
الكروماتغرام لمستخلص العينة P2



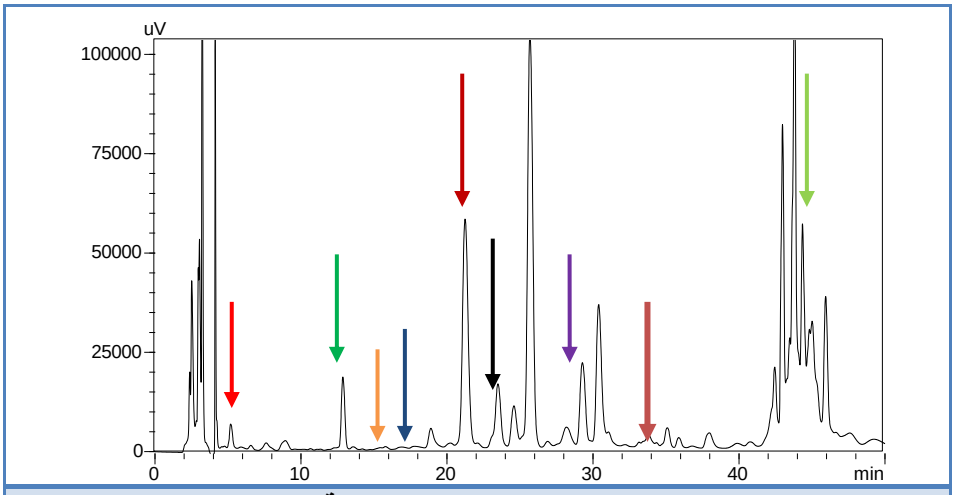
الكروماتغرام لمستخلص العينة P4



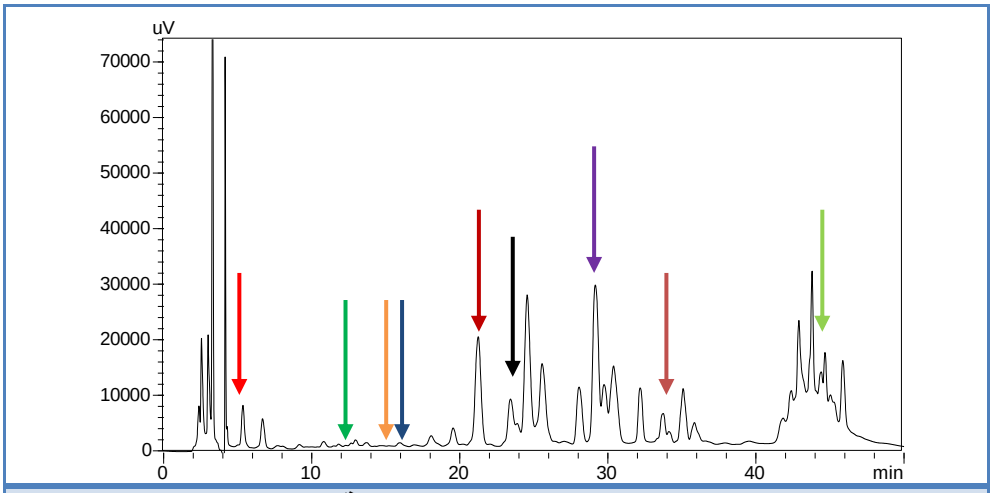
الكروماتغرام لمستخلص العينة P5



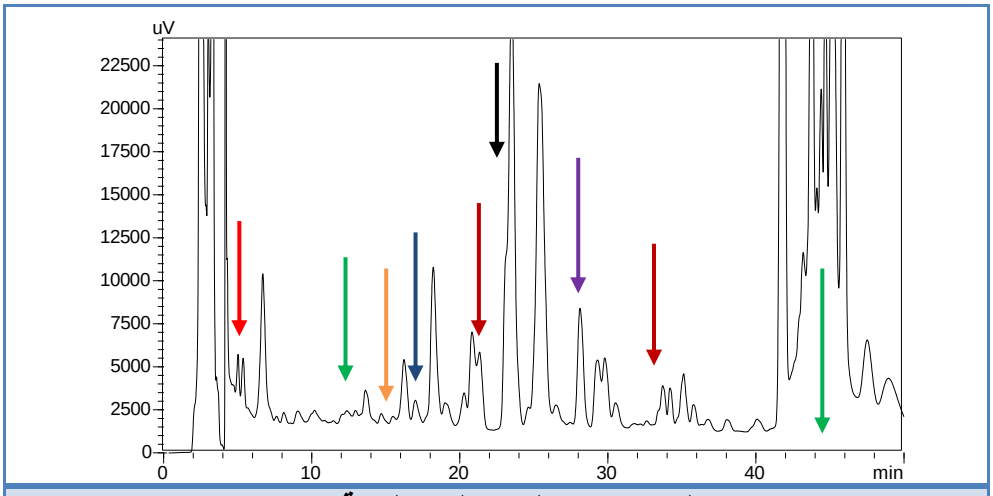
الكروماتوغرام لمستخلص العينة P6



الكروماتغرام لمستخلص العينة P7

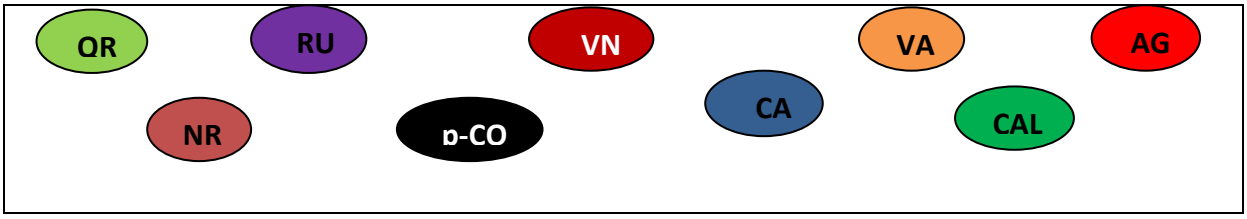


الكروماتغرام لمستخلص العينة P8

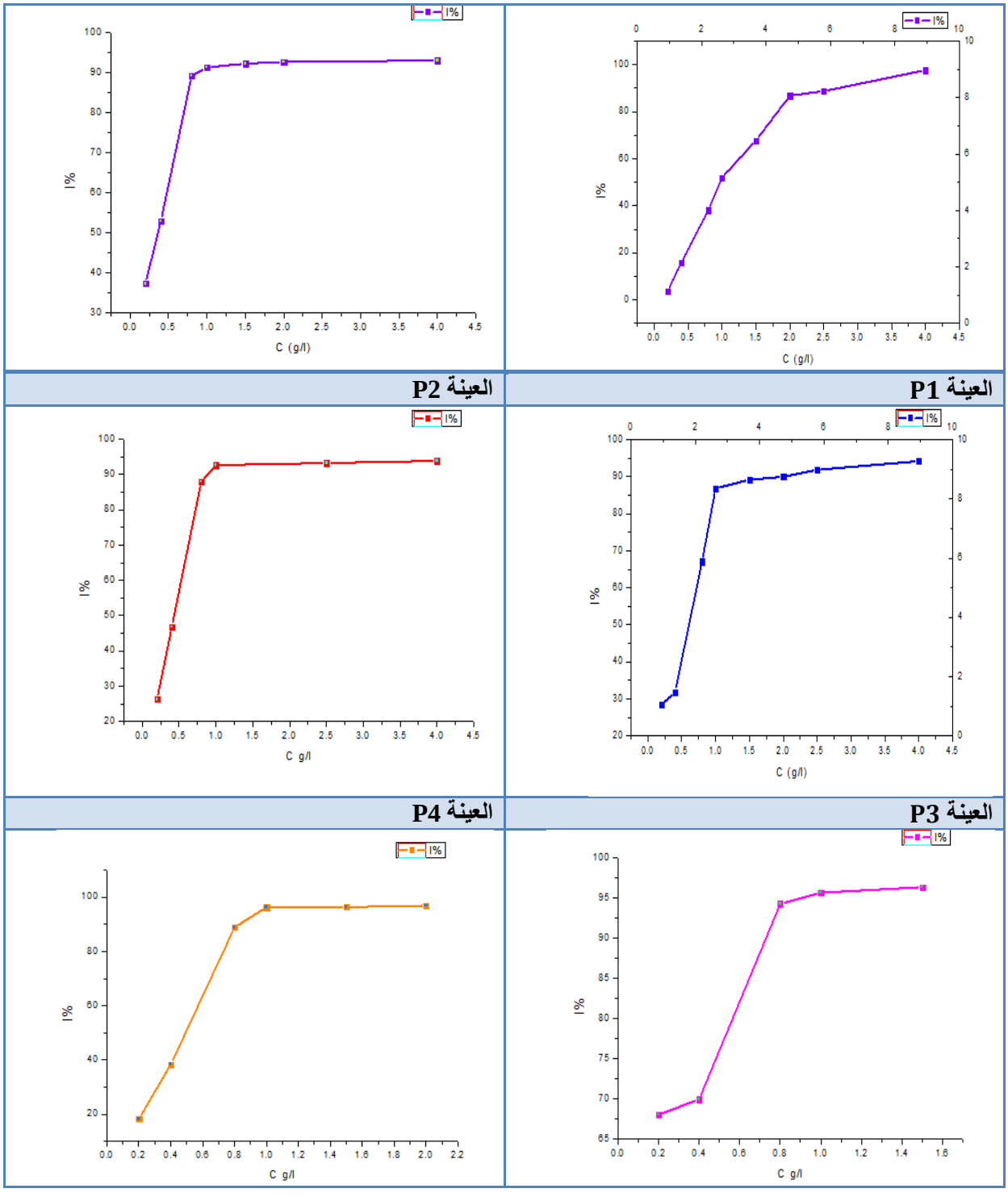


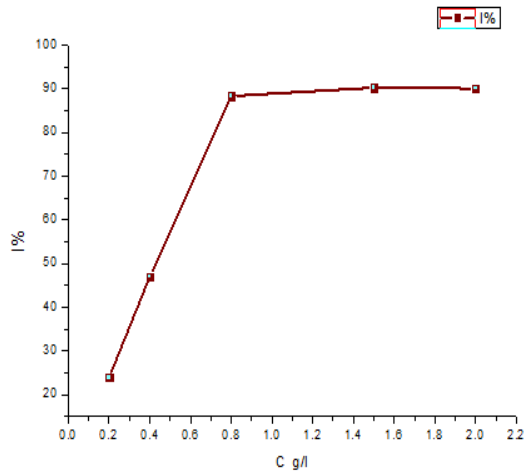
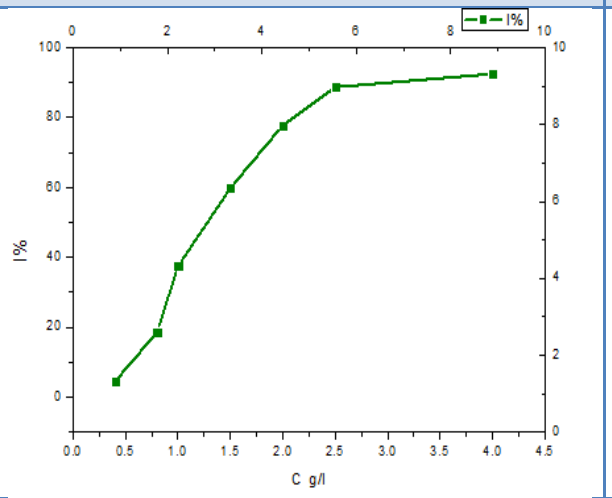
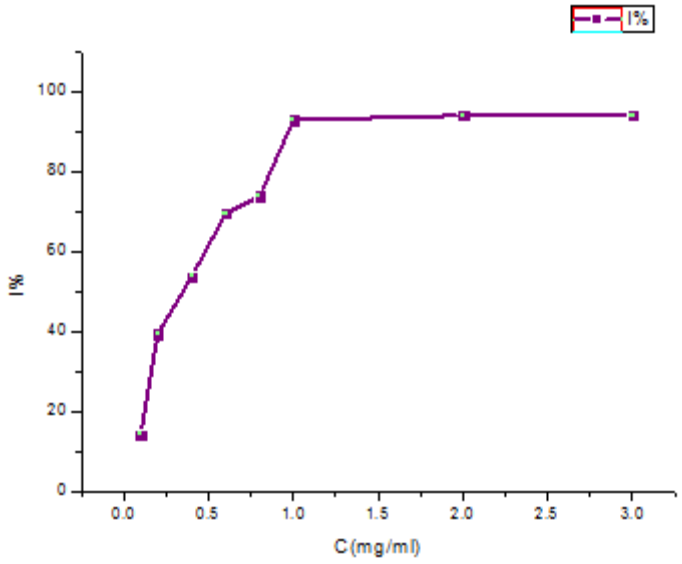
الكروماتغرام لمستخلص العينة P9

بحيث لدينا :



4 : منحنيات التغير في نسب التثبيط المئوي% بدلالة تركيز المحلول المستخلصات .



العينة P5	العينة P6
	
العينة P7	**العينة P8**
	
العينة P9	

الملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تثمين مادة حبوب الطلع، و ذلك من خلال تقدير الفعالية المضادة للأكسدة و المحتوى الكمي من المركبات الفينولية الفعالة لحوالي تسعة عينات من مراعي نحل مختلفة من ولايات الوطن .

قمنا في بداية عملنا بعملية الاستخلاص للمركبات الفينولية وهذا باعتماد طريقة سوكسلي، ومن ثم تقدير المركبات الفينولية بطريقة (Folin-Ciocalteu) بحيث كان المردود مختلفا من منطقة لأخرى وهذا بسبب اختلاف المصدر النباتي لحبوب اللقاح، أما الفعالية المضادة للأكسدة تم تقديرها بثلاث اختبارات مختلفة وهي على التوالي: اختبار (DPPH)، طريقة (TAC) وطريقة (FRAP) و من خلال هذه النتائج تبينا لنا ان للمستخلصات فعالية مضادة للأكسدة عالية . كما تم دراسة السلوك الكهروكيميائي للعينات بواسطة الطريقة الفولطامترية الحلقية و مقارنتها بسلوك بعض المركبات الفينولية المرجعية و لإثراء التجارب التي قمنا بها أجرينا التقدير الكمي للمركبات الفينولية وهذا بتقنية الكروماتوغرافيا السائلة والتي أظهرت أن المستخلصات تحوي نسبة معتبرة من الفلافونودات .

الكلمات الدالة : حبوب الطلع، الفعالية المضادة للأكسدة، المركبات الفينولية ،الفولطاأمتري الحلقي.

Réumé

L’objectif de la présent étude était de l'évaluationde la capacité antioxydant et la quantité des composes phénolique sur environ neuf échantillons différentes de la pollen , Ces l' échantillons différentes régions d'Algérie.

l'extraction de composés phénoliques a été faite par le méthanol(montage de soxlet), la teneur en composés phénoliques totaux des extrait a été analysée par la méthode de (Folin-Ciocalteu).

Tandis que l activité antioxydant a été mesurée par les test du radical 2,2'-diphényle-l-picryle hydrazyle (DPPH), pouvoir réductrice (TAC) et la méthode (FRAP) et à travers ces résultats a identifié le nous qui extrait haute anti-oxydant efficace. Comme cela a été l'étude du comportement électrochimique des échantillons par la méthode voltamétre cyclique(CV) et comparer le comportement de certains composés phénoliques et référence pour enrichir les expériences que nous avons faites, nous avons mené une estimation quantitative des composés phénoliques et la technologie de la chromatographie en phase liquide, qui a montré que les extraits contiennent proportion considérable de Flavanouide.

Mot clés: pollen; capacité antioxydant; composes phénolique; voltamétre cyclique

summary

The main purpose of this Study is to appraisal the pollen by determine antioxidant Activity and the quantitative content of Active phenolic compounds for nine samples of Various bees leys from Alwatan State. At First we Extracted the phenolic compounds by soxhlet Method and determined the quantitative content of them by Folin-Viocalteu Method, Different Yields have been Noticed caused by Different plants sources of pollen. the Antioxidant Activity has been determined by Three Method which respectively DPPH Test, TAC Method, FRAP Method, And from this results we noticed that the Extractions had high antioxidant Activity. the electrochemical behavior for the samples has been studied by cyclic Volta metric method and compared the behavior of Them with some reference phenolic compounds, and to enrich our experiments quantitative content of phenolic compounds has been determined by Liquid chromatography which showed that the Extractions had considerable quantity of flavonoids.

Key words: pollen; antioxidant capacity; phenolic compounds; cyclic voltammetry