II. طرق فصل الفلافونويدات والبوليفينول

II.1. تحضير المادة النباتية:

القطف:

تم قطف الجزء الهوائي للنبتة من منطقة بن يعقوب ولاية الجلفة خلال شهر أفريل 2015.

التجفيف:

بعد القطف يتم التجفيف في الظل بعيدا عن الرطوبة وبمكان جيد التهوية.

بعد التجفيف الجيد تطحن النبتة، ليتم الاحتفاظ بمسحوق النبتة في قارورات زجاجية محكمة الإغلاق، بعيدا عن الضوء والحرارة إلى حين استعمالها.

II.2. دراسة المسح الكيميائي:

المركبات غير الفينولية:

II.2.1. اختبار تواجد القلويدات :Alcaloïdes

نضع 0.1 غ من مسحوق النبتة في 10 مل من حمض الكبريت H_2SO_4 (10%)، نقوم بعملية التحريك لمدة دقيقتين.

بعد ذلك نرشح الخليط بواسطة ورق الترشيح. نقسم كمية المستخلص على أنبوبي اختبار. [28]

الأنبوب الأول: نضيف بضع قطرات من Réactif Dragendorff ظهور راسب برتقالي دلالة على وجود القلويد بالنبتة.

الأنبوب الثاني: نضيف بضع قطرات من Réactif Bouchard ظهور راسب أبيض دلالة على وجود القلويدات بالنبتة.

كيفية تحضير Réactif Bouchard:

2غ من اليود I_2+2 غ من KI في 100مل من الماء المقطر (H_2O)

II.2.2. اختبار تواجد الصابونينات:Saponines

داخل دورق سعته 125 مل نضع 4 غ من مسحوق المادة النباتية، نضيف 100 مل من الماء المقطر نقوم بعملية التسخين عند 100°C والتحريك جيدا، عند الغليان نحسب 15 دقيقة.

نرشح الخليط على ورق ترشيح، نأخذ 1.5 مل من المستخلص ونضيف 13.5 مل من الماء المقطر، نرج أنبوب الاختبار لمدة 15 ثانية، إذا لاحظنا رغوة بعد 10 دقائق ولم تختفي دلالة على وجود الصابونينات بالنبتة.

نقسم كمية المستخلص على 11 أنبوب اختبار مرقمة من 1 الى 11 (0، 1، 1.5، 2، 2.5، 3،..5 مل) (لاحظ الجدول 1) .

الجدول 1: تحضير المذيبات من أجل قياس معامل الرغوة

Tube N°	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**
Décocté (ml)	0.0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0
Eau (ml)	10	9.5	9.0	8.5	8.0	7.5	7.0	6.5	6.0	5.5	5.0

نغلق كل أنبوب اختبـار، ثم نحرك بقوة في الموضع الأُفقي حوالي 15 ثانية نترك الأنبوب على حدى لمدة 10 دقائق، نقيس ارتفاع الرغوة. نأخذ الأنبوب الذي ارتفاع رغوته 1 سم.

يحسب معامل الرغوة (***l'indice de mousse***) بالعلاقة التالية: [29]

$$\mathrm{IM} = \frac{1}{\frac{1}{100} \times \frac{V_D}{10}}$$

IM: معامل الرغوة.

V_D: حجم المستخلص في الأنبوب الذي ارتفاع الرغوة فيه 1 سم.

100/1: التركيز الابتدائي للمستخلص.

10: الحجم الكلي في كل أنبوب.

مركبات متعددة الفينول:

II.3.2. اختبار تواجد العفصيات:Les tanins

كيفية تحضير الكاشف:

40 مل من البيتا نول العادي + 10 مل من حمض كلور الماء (HCl)

- في أنبوب اختبار، نضع 0.1 غ من المادة النباتية نضيف 5 مل من الكاشف ثم ندخله حمام مائي(65°C) لمدة 10 دقائق، ظهور اللون الأحمر يدل على وجود العفصيات.
- في أنبـوب اختبـار، نضع 2 مـل من المستخلـص الإيثانـولي ونضيـف له 3 قطرات من $FeCl_3$ (2%)، تطـور اللـون الى أزرق مسود دلالة على وجود العفصيات. [30]

II.4.2. الكشف عن الزيوت الطيارة:

نبلل ورقـة ترشيح بالمستخلـص ثم نعرضـها للأشعـة فـوق البنفسجيـة، ظهور بقع رماديـة اللون تـدل على وجـود الزيـوت الأساسية. [31]

5.2.II. الكشف عن الكومارين:

نضع 5 مل من المستخلص في أنبوب اختبار، ندخل الأنبوب في حمام مائي (65°C) ، نبلل ورقة ترشيح بالـ NaOH ونضعها فوق الأنبوب لمدة 10 دقائق، ثم نعرضها للأشعة فوق البنفسجية، ظهور بقع لونها أصفر مخضر يدل على وجود الكومارينات. [32]

6.2.II. اختبار تواجد مركبات متعدد الفينول:

نضع في أنبوب اختبار 0.2 غ من المادة النباتية، نضيف 2 مل من الماء المقطر و6 مل من الأسيتون، ندخل الأنبوب في حمام مائي (60°C)، لمدة 5 دقائق، بعد ذلك نرشح الخليط ونأخذ 2 مل نضيف لها قطرتين من $FeCl_3$ (10%)، ظهور اللون الأزرق والأخضر مسود فاتح أو داكن يدل على وجود مركبات متعدد الفينول [31].

7.2.II. اختبار تواجد الفلافونويدات: Flavonoïdes

كيفية تحضير المستخلص:

في أنبوب اختبار نضع 0.3 غ من المادة النباتية في 5 مل من الإيثانول، ندخل الأنبوب في حمام مائي لمدة 10 دقائق (65°C)، نرشح الخليط وهو ساخن.

اختبار01:

في أنبوب اختبار نضع 2 مل من كل من المستخلص والماء المقطر و HCl ثم نضيف حبيبات من Mg وندخل الأنبوب في اناء زجاجي به ماء بارد وثلج لأن التفاعل ناشر للحرارة. ظهور اللون البرتقالي يدل على وجود الفلافون، اللون الأحمر البنفسجي يدل على وجود الفلافونون، واللون الأحمر يدل على وجود الفلافونول، والألوان الأقل كثافة هي جليكوسيدات الفلافونويدات[33].

اختبار 02 :

نأخذ بضع قطرات من كلوريد الألمنيوم $AlCl_3$ (1%) ونضيفها للمستخلص. ظهور اللون الأصفر يعني وجود فلافونويد [34].

اختبار 03:

كمية قدرها 4 مل من المستخلص تضاف لها 1 مل من الأمونياك NH_4OH المخفف. ظهور اللون الأصفر يثبت وجود الفلافونول [33].

اختبار 04:

نضع في أنبوب اختبار كمية قدرها 4 مل من المستخلص تضاف لها 1 مل من NH_3. ظهور لون أخضر مصفر يدل على وجود الفلافونويد [34].

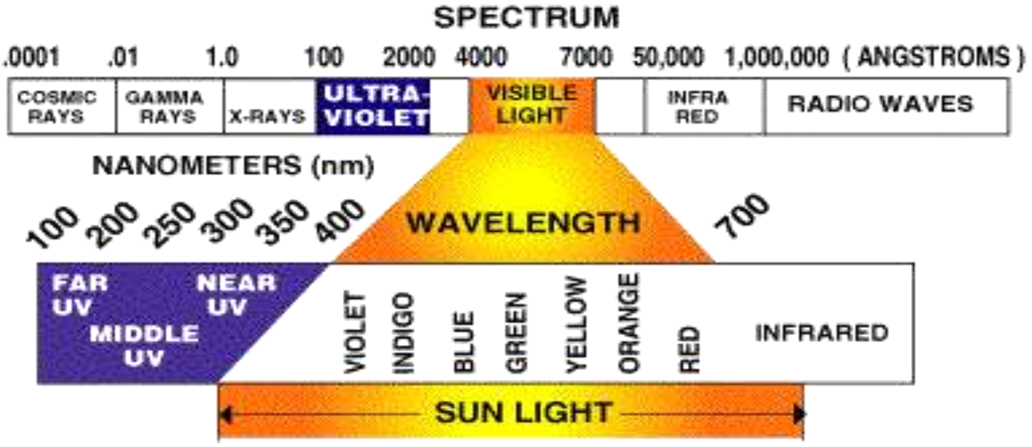
اختبار05:

نأخذ 2 مل من المستخلص ونضيف له 0.5 مل من HCl و0.5 مل من NaOH المخففين (0.5 غ من HCl أو NaOH في 5 مل H_2O) و0.5 ماء مقطر. ظهور اللون الأصفر هو اللون الذي يدل على وجود الفلافونويد[34].

II.3. التحليل الطيفي في مجال الأشعة المرئية وفوق البنفسجية:

II.3.1. مقدمة:

يعد جهاز التحليل الطيفي في مجال الأشعـة المرئية وفـوق البنفسجية من الأجهـزة الأساسية ومن أقـدم التقنيات المستخدمة للتحليل الكيفي والكمي للمركبات الكيميائية، وكذلك تحديد شكلها الكيميائي. يستخدم هذا الجهاز مدى الأشعة المرئية والأشعـة فوق البنفسجية من الأشعة الكهرومغناطيسيـة بطول موجة 190 -900 نانومتر لقياس المرجع والعينة المراد تحليلها، وبذلك يعطي طيف العينة فقط، كما يعتبر من أفضل الأجهـزة المستخدمة في كشـف الشوائب في المركبات العضوية. ويمكن تحديد الأوزان الجزيئية لبعض المركبات بعد تحليلها إلى مشتقات بمعاملة معينة. إن جهاز الأشعة فوق البنفسجية ينفرد باستخدامه الشعـاع المنفرد وبذاكـرة حاسب آلـي تساعد على تخزيـن الطيـف واسترجاعـها للمقارنـة متى ما دعت الحاجـة لـذلك. يسلك الضوء المرئـي سلوك الضـوء في طـرق التحليـل الطيفي في مجال الأشعة المرئية وهـي نفسها التي تستخدم في طرق التحليل الطيفي في مجال الأشعة فوق البنفسجية. لذا فقد جرت العادة على دراستهما معاً. ويغطي هذان الطيفان المجال من 200 إلى 800 نانو متر (ميلي ميكرون). [35]



الشكل 1: مجالات الأشعة المرئية والأشعة فوق البنفسجية

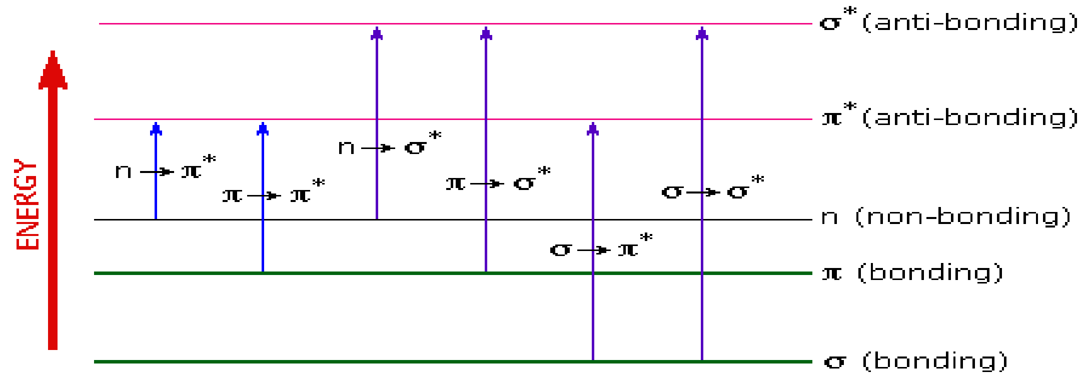
II.3.2. مطيافية الأشعة فوق البنفسجية والمرئية:

المطيافية الإلكترونية هي أحد أنواع الدراسات الطيفية والتي تعتمد على إمتصاص الأشعة فوق البنفسجية أو المرئية، ولقد سميت بهذا الاسم لأن إمتصاص الأشعة في هاتين المنطقتين يؤدي إلى إثارة الإلكترونات في الجزيء الذي يمتص تلك الأشعة.

II.3.2.1.الاثارة الالكترونية:

كما هو معروف تتكون الجزيئات من ذرات كل منها يتألف من نواة ومن إلكترونات تدور حولها في مستويات طاقة محددة. فإذا إمتصت الجزيئات طاقـة معينـة إنتقلت الإلكترونـات مـن مستوى الطاقـة الأدنى إلى مستـوى طاقـة أعلى وهذا ما يدعـى بالإثارة الإلكترونيـة ولكـي يسبب شعـاع ضوئي إثـارة إلكترونيـة ينبغـي أن يكـون هذا الشعــاع في مجـال الأشعـة المرئيـة أو فـوق البنفسجيـة. وتردد الشعاع الممتص يرتبط بالطاقـة بالعلاقـة: $E= h\vartheta$، هذا ويوجد في الجزيئات العضويـة ثلاث أنــواع مــن الإلكترونــات الأولى إلكترونات مشتركـة في رابطـة مشبعـة كالرابطة بين الهيدروجين والكربون، والكربـون في المركبـات المشبعة وتسمى هذه الرابطـة برابطـة σ وكمية الطاقـة اللازمة لإثارة الإلكترونات الرابطـة σ أكبر بكثير من طاقـة الأشعـة فوق البنفسجيـة لـذا فإن المركبـات المشبعـة لا تمتص في هذا المجال لذا تستعمل عادة كمذيبـات جيـدة.

والنوع الثانـي مـن الإلكترونات تلك التي تشترك في رابطة غير مشبعـة. وهذه المركبـات تحتـوي عادة على رابطـة σ ورابطة π وكمثال على المركبات التي تحتـوي على ثلاث روابـط متناوبـة (البنزين وهيكساتترايين المتناوب). والنوع الثالث من الإلكترونــات هي التي لا تشترك بروابط بين الذرات وهذه تدعى بالإلكترونات n الحـرة. والمركبات العضوية المشبعة لا تحوي إلكترونات n لأن كل الإلكترونات فـي المستويات الخارجية للكربون والهيدروجين تشترك في الروابط الكيميائية. أما المركبات العضويـة التي تحوي النيتروجين والأكسجين والكبريت والهالـوجينــات فإنـها تحتـوي على إلكترونــات n ويمكنها أن تمتـص الأشعــة المرئية أو فوق البنفسجية لأن هذه الأشعة يمكنها إثارة الإلكترونات n والخلاصة أن الأشعة فوق البنفسجية أو المرئية يمكن أن يمتصها مركب يحتوي على ذرة نيتروجين أو أكسجين أو هالوجين أو كبريت أو يحوي على رابطة غير مشبعة وتسمى المجموعة التي تحوي ذلك بالمجموعة الماصة أو الكروموفور [35](Chromophore)



الشكل 2: الانتقال الالكتروني في مستويات الطاقة

.2.2.3.II الأطياف الإلكترونية:

الطيف الإلكتروني لمركب ما عبارة عن منحنى يوضح تغير شدة الامتصاص (الامتصاصية) مع تغير طول موجة الأشعـة المارة في محلول المركب تحت الدراسـة. ويهمنا من هذا المنحنى معرفة طـول الموجـة التي تكـون عندها شدة الامتصـاص أكبر ما يمكن ويرمز لها بالرمـز λ xam وكذلك معامل الامتصاص المولي ε عند هذه الموجة. وترتبط شدة الإمتصاص(A) بتركيز المحلول (C) وطول الخلية (L) بالمعادلة التالية: $A = \varepsilon\, lc$ وتعرف هـذه المعادلـة أحيـاناً بإسـم قانـون بير-لامبرت ومنـها يتضح أن شـدة الإمتصاص للمركب أو (إمتصاصيـة المركب) تتناسب تناسباً طردياً مع كل من التركيـز المولي (C) وطـول الخليـة (L)، وأن معامل الإمتصاص المولي لمركب ما يساوي شـدة الإمتصاص لمحلول المركب الذي تركيــزه 1 مول/ لتر وموضوع في خليـة طولها 1 سم ويعتبر كلاً من λ xam و ε من الثوابت الفيزيائيـة التي تميز المركبات العضويـة عن بعضها. ولا تصلح هذه العلاقـة في حالـة التركيز المرتفع جداً. لذا ينصح في التطبيق العملي إستعمال المنحنى العيـاري للإمتصاص بدلالة التركيز عند قمـة الإمتصاص الضوئي للمركب. كما يمكن تقدير الكثير من المواد التي لا تمتص الضـوء مباشرة وذلك بإضافة مركبات معينة لتكون متراكبات ماصة للضوء أو تكون مجموعة إمتصاص. [35]

3.2.3.II. مكونات جهاز UV-Visible الأساسية:

1- المصدر الضوئي

2- خلية العينة

3- موحد طول الموجة

4- الكشاف

5- الشاشة

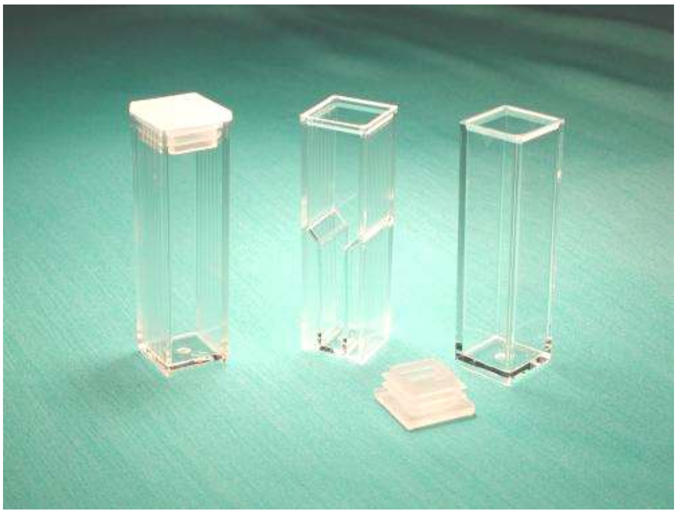
1.3.3.II. المصادر الضوئية:

وهنا يوجد نوعين من المصادر الضوئية الأول عبارة عن مصباح تنجستن بالنسبــة لقياس الأشعـة المرئيـة (Visible) في المدى (350 -800) نانومتر.

والمصدر الضوئي هو عبارة عن مصباح ديوتيريوم وهي مصباح لا يفضل مشاهدتها بالعين المجردة لأنها يمكن أن تسبب العمى المؤقت نظراً لقوة إشعاعها. هذا بالنسبة لقياس الأشعة فوق البنفسجية في المدى (200 -350) نانومتر.

2.3.3.II. خلية العينة:

وهي إما أن تكون مصنوعة من الزجاج أو مصنوعة من الكوارتز والكوارتز أفضل لأن الخلية المصنوعة من الزجاج مـن ضمن مكونات صنعـها الصوديـوم الذي يمتص في مجال UV لذلك يفضـل إستخدام خلايا مصنوعـة من الكوارتـز وهــذه الخلايا لا يكون من ضمن مكونات صنعها الصوديوم.



الشكل 3: خلايا قياس Cuves

3.3.3.II. موحد طول الموجة:

عبارة عن الموشور الزجاجي وهذا الموشور كان يستخدم في الأجهزة القديمـة أما حالياً في الأجهزة الحديثـة للتحليل الطيفـي أصبح هنالك ما يسمى بالمحزوز ووظيفته أنه يقوم بفحص العينة لتحديد الطول الموجي الذي حدث عنده أعلــى امتصاص فعندما يسلط الضـوء سواءً ضوء من مصباح تنجستـن لقياس الأشعة المرئية أو من مصباح ديوتيريوم لقياس بعملية إستقبال الحزمــة التي تكون زاوية سقوطها مناسبة على موحد طول الموجة ومن ثم يقوم موحد طول الموجة بعملية

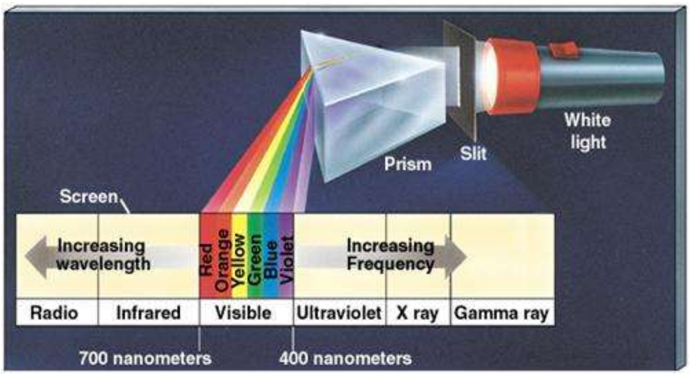
إنعكاس للأشعة الساقطة عليه موجهاً إياها إلى فلتر يقـوم هذا الفلتر باختيار الحزمـة المناسبـة بشكل دقيق جداً ومن ثم يستمر انتقال الحزمـــة إلى مرآة عاكسة تقوم بإرسال الحزمة الضوئية الساقطة إلــى خلية العينة ومن ثم إلى الكشـاف.

II.4.3.3. المذيبات المستخدمة لتسجيل الأطياف الإلكترونية:

لتسجيل الطيف الإلكتروني لمركب ما يجب إستخـدام محلول المركب تحت الدراسة في مذيب مناسب. والمذيبات المستخدمة لهـذا الغرض يجب أن تتميـز بإمتصاصيـة ضعيفـة جداً أو لا تمتص علـى الإطلاق الأشعـة في المنطقـة التـي يمتـص فيـها المركب. ومـن أمثلة هذه المركبات الإيثانول، الإيثرات، السايكلوهكسان، والكلوروفورم.

II.5.3.3. الكشاف :(Detector)

وهو الكشاف الذي يبين كميـة الضوء الخارج من خليـة العينـة ويقـوم بتوضيح ما إذا كانت كميـة الضـوء الخارج مـن خليـة العينة مساوي لكمية الضوء الداخل للعينة فإذا حدث ذلك وكانت كمية الضوء الداخل للعينـة مساوي لكميـة الضـوء الخـــارج من العينـة أنه لم يحدث إمتصاص وبالتـالي لا نحصل إلا على خـط مستقيم ليس به أي إمتصاص. أما إذا حدث العكس وكان الضوء الخارج من خلية العينة أقل من الضوء الداخل للعينة نستدل من ذلك حدوث إمتصاص.



الشكل 4: طيف الأشعة الضوئية

II.4.3. أنواع أجهزة التحليل الطيفي للأشعة المرئية وفوق البنفسجية:

توجد هنالك العديد من هذه الأجهزة الحديثة إلا أن فكرة عملها واحدة في كل المنتجات وتنقسم هـذه الأجهزة إلى ثلاثة أقسام من حيث استخدامها.

1- أجهزة تقيس طيف الأشعة المرئية فقط أو تقيس طيف الأشعة فوق البنفسجية فقط:

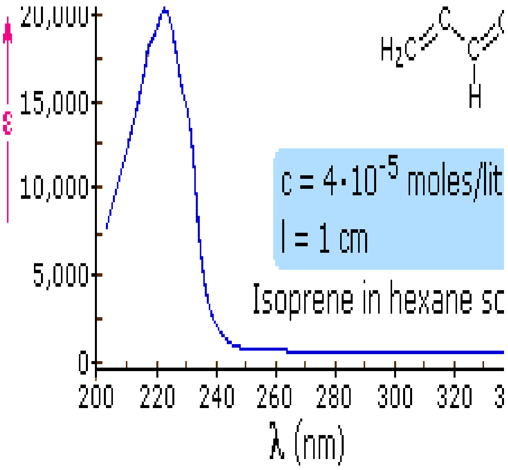
وهي أجهزة وحيدة الشعاع، وهي نوعان النوع الأول يستخدم أنابيب في عملية التحليل والنوع الأخر يستخدم خلايـا من الكوارتز أو الزجاج في عمليـة التحليل، وفكرة هذا الجهاز أنه لإجراء عملية التحليل لا بد في البدايـة من القيام بتنقية الجهاز ويتم ذلك بإستخدام البلانك أو المذيب وبعد تنقية الجهاز ترفع أنبوبة البلانك أو خلية البلانك ويوضع في مكانها أنبوبة أوخلية العينة المراد إجراء القياس لها. في الأجهزة التي تقيس فقط الأشعة المرئيـة المصدر الضوئي فيها عبارة عن مصباح تنجستـن. بينـما المصدر الضوئي في الأجهزة التي تقيس الأشعة فوق البنفسجية عبارة عن مصبـاح الديوتيريـوم.

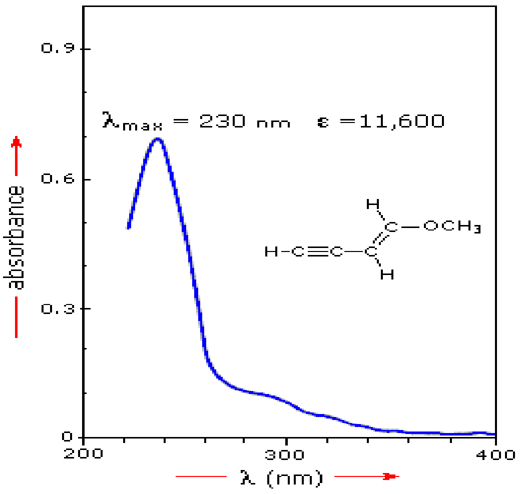
2- أجهزة تقيس طيف الأشعة المرئية وطيف الأشعة فوق البنفسجية معاً في جهاز واحد:

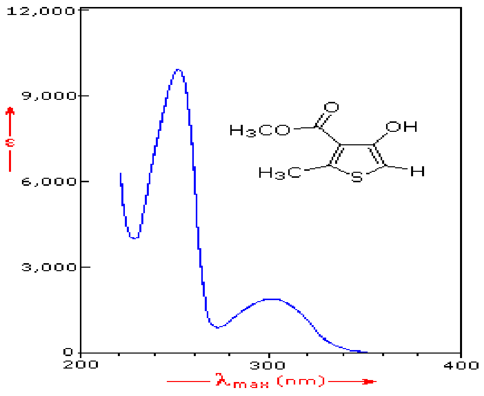
وهي أجهزة ثنائية الشعاع وهذه الأجهزة ميزتها أنه لاداعي لعملية تنقية الجهاز يدويا حيث يقوم الجهاز بذلك أوتوماتيكيا. كما أن هذه الأجهزة تحتوي على فتحتين الأولى لخلية البلانك والفتحة الثانية لخلية العينة المراد قياسها. فلو أردنا قياس الطيف المرئي في هذا الجهاز كل ما علينا فعله هو أن نقوم باختيار المصدر الضوئي المناسب وهو هنا مصباح التنجستن فقط ونضع خليـة البلانك في فتحته الخاصة ونضع خلية العينة في الفتحة الثانية ونقوم بإجراء التحليل. أما إذا أردنا إجراء قياس الطيف فوق البنفسجي فقط فما علينا إلا أن نختار مصباح الديوتيريوم فقط.

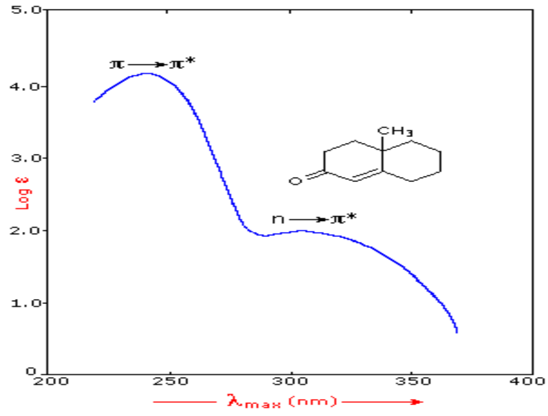
II.3.5. تطبيقات طيف الأشعة المرئية وفوق البنفسجية:

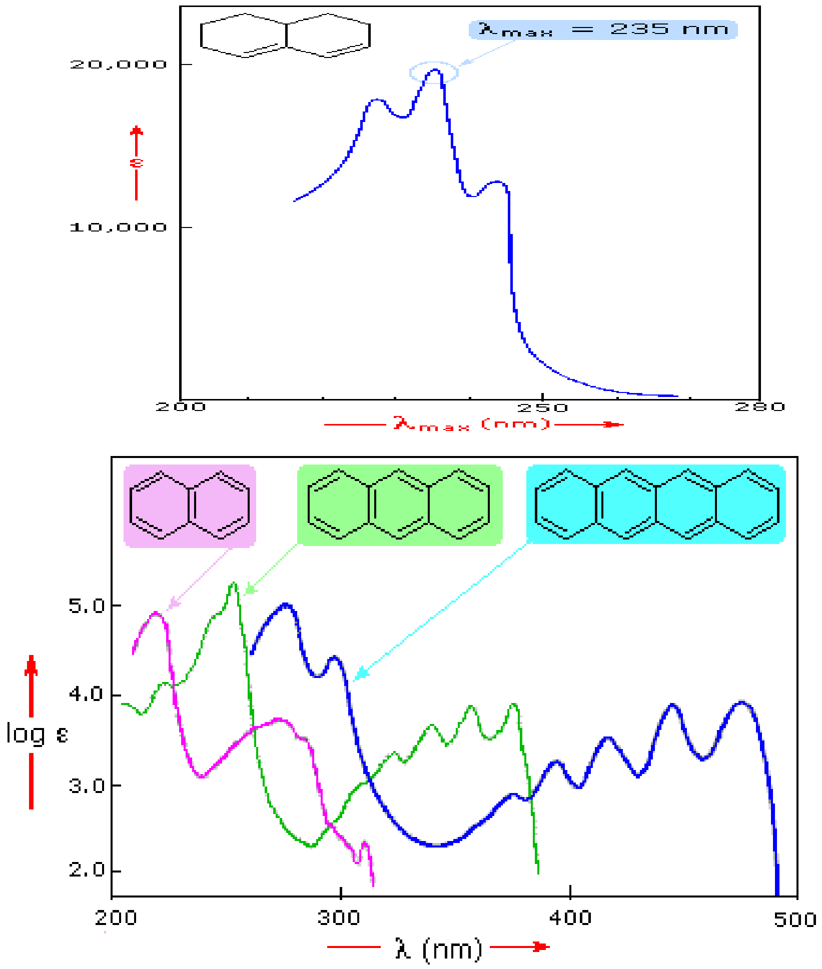
يعتبر طيف إمتصاص الأشعة في المجال المرئي وفوق البنفسجي وسيلة مفيدة لتأييد دليل على تركيب بنائي معين لمركب ما وينقص وجود إمتصاص مختار يعطي برهاناً قاطعاً على تفاصيل تركيب معيـن لكن بالطبع يمكن أن تساعد في ترجيح أحد الإحتمالات المتعددة. وعلى سبيل المثال فإن عدم وجود إمتصاص في المجال 270 – 280 نانو متر يعتبر دليلاً قاطعاً على عدم وجود حلقة بنزين في المركـب. كما أن إنعدام الإمتصاص من 210 نانومتر حتى المجال المرئي دليل قاطع على عدم وجود روابط ثنائية متناوبة. وإن عدم وجود الإمتصاص حتى 180 نانومتر فإن هذا دليل على عدم وجود رابطة ثنائية في المركب. في هذه الأشكال التوضيحية نلاحظ أن زيادة عملية الإقتران في المركب تؤدي إلى زيادة في الطول الموجي كما أن وجود أو دخول إحدى المجموعات الوظيفية على المركب تؤدي أيضاً إلى زيادة في الطول الموجي. [35]



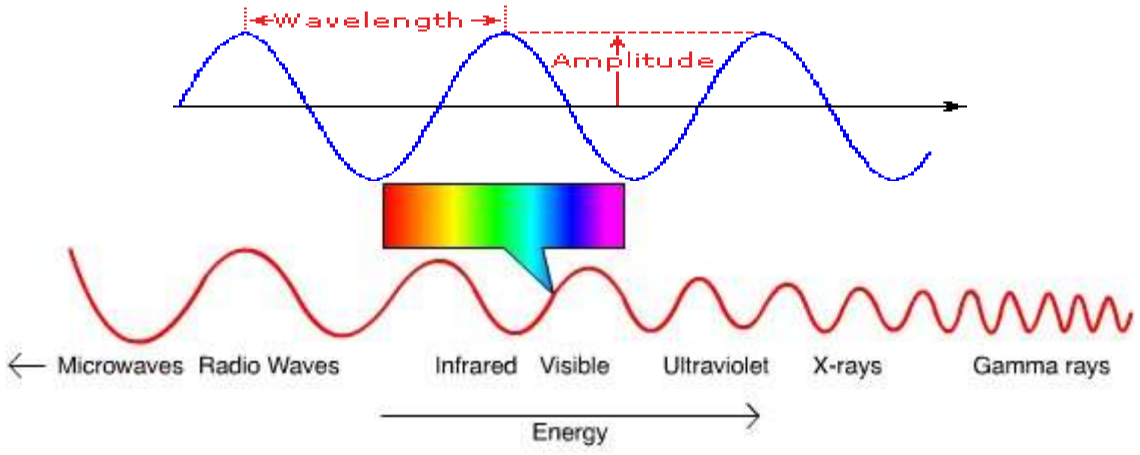




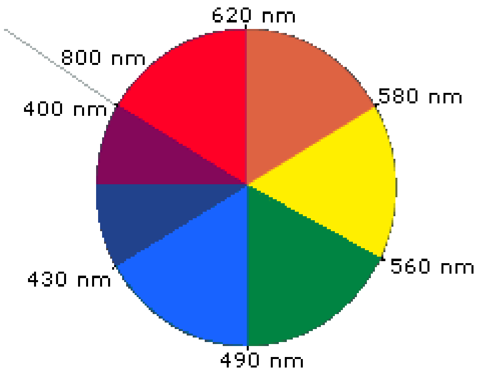


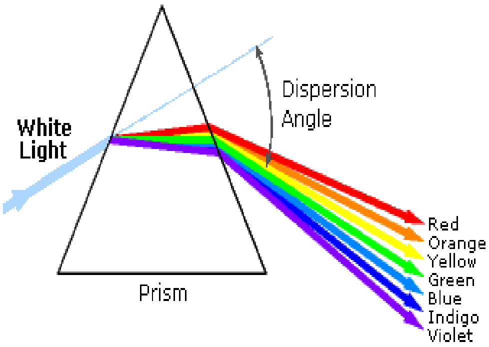


الشكل 5: أمثلة عن تطبيقات طيف الأشعة المرئية وفوق البنفسجية



الشكل 6: رسم تخطيطي يوضح الاختلاف في الطول الموجي والدور لمختلف مجالات الأشعة الضوئية.





Violet: 400 - 420 nm

Indigo: 420 - 440 nm

Blue: 440 - 490 nm

Green: 490 - 570 nm

Yellow: 570 - 585 nm

Orange: 585 - 620 nm

Red: 620 - 780 nm

الشكل 7: التحليل الطيفي للضوء الأبيض

.1.4.II استخلاص الفلافونويدات:

نتبع طريقة هاربون لاستخلاص الفلافونويدات من النبتة، بحيث نأخذ عينة وزنها 13 غ من مسحوق النبتة. نقوم بتنقيع العينة في مزيج كما يلي:

العينة إيثانول + ماء (30/70). وهذا لمدة 24 ساعة، ثم نقوم بترشيح المستخلص المتحصل عليه وتكرر العملية 3 مرات مع تجديد المذيب بعد كل عملية ترشيح.

يجمع المستخلص الخاص بالعينة، ثم نقوم بتركيز مستخلص الخليط (إيثانول + ماء) وذلك باستخدام جهاز التبخير الدوراني (Rotavapeur) للتخلص من المذيبات تحت درجة حرارة لا تتجاوز 40 درجة مئوية.

يضاف الماء الساخن إلى الطور المائي (50 مل) للمستخلص ويترك للراحة ليلة كاملة وذلك لإذابة الشوائب العالقة بالمستخلص ومن ثم ترشيحه. [36]

كيفية حساب مردودية المستخلص: [37]

لحساب مردودية المستخلص النباتي نستعمل العلاقة التالية:

$$R(\%) = \frac{M_R}{M_P} \times 100$$

بحيث:

M_R: كتلة المستخلص المتبقية في الدورق.

M_p: كتلة العينة المستعملة للاستخلاص.

2.4.II. التحليل الكمي لمركبات متعدد الفينول:

المبدأ:

تم تحديد مقدار البوليفينول في مستخلص نبات العرعر من خلال طريقة Singleton et Rossi (1965).

التحليل الكمي لمركبات متعدد الفينول يعتمد أساسا على الكاشف Folin_Ciocalte (FCR)، يتركب من حمض فوسفوتنغستيك ($H_3 PW_{12} O_{40}$)، وحمض فوسفوموليبيديك ($H_3 PoM_{12} O_{40}$). [38].

ترتكز الـ FCR على قاعدة أكسدة إرجاع، تنقص وظيفة OH للفينول ويتأكسد.

تحدث عملية أكسدة المركبات الفينولية بفعل تأكسد خليط أزرق التنغستين ($W_8 O_{23}$)، والموليبدن (Mo_8O_{23}). [38]

اللون الناتج يساعد على معرفة كمية البوليفينول الموجودة في كمية المستخلص المستعمل وذلك تحت طول موجة يقدر بـ : 725– 750 نانومتر. [37]

المنحنى القياسي المأخوذ كمرجع لقياس الامتصاصية هو حمض فينوليك (حمض غاليك)، يسمح بإتمام كمية متعدد الفينول الموجودة في المستخلص النباتي. [37]

الأدوات الكيميائية:

أنابيب اختبار	ورق ألمنيوم	أنبوبة مدرجة
حوجلة	حامل	خلية قياس Cuves
بيشر	ملعقة خاصة	عدسة ساعة
سحاحة	جهاز UV	جهاز تسخين وتحريك

المواد الكيميائية:

- ماء مقطر
- ثلاثي كلوريد الألمنيوم $AlCl_3$ 2 % (غ/ مل)
- المستخلص المائي أو الميثانولي مخفف
- كاشف Folin-Ciocalteu (FCR) 10 %
- بكربونات الصوديوم Na_2CO_3 2% (غ/مل)
- كيرسيتين
- حمض غاليك

تحضير المنحنى القياسي لحمض غاليك:

نأخذ مجموعة تتكون من 10تراكيز من حمض غاليك تتراوح من 20 الى 200 مكغ/ مل ونحضر المحلول الرئيسي وذلك بعملية التخفيف بواسطة الماء المقطر.

الجدول التالي يلخص بروتوكول حمض غاليك المخفف.

جدول 2: حمض غاليك المخفف.

الحجم المأخوذ من المحلول الرئيسي (مل)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
حجم الماء المضاف (مل)	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0.0
تركيز حمض غاليك (مكغ / مل)	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200

كيفية اجراء التجربة:

أولا نقوم بتحضير Blanc، وذلك بأخذ 0.25 مل من Réactif de Folin، ونضيف حجم قدره 0.5 مل من الماء المقطر بعد دقيقتين نضيف 1.25 مل من Na_2CO_3 (2%) ليصبح الحجم الكلي 2 مل.

أما تحضير محلول حمض غاليك فيتم بأخذ 0.1 مل من المستخلص المائي، ثم نضيف له 0.4 مل من الماء المقطر، بعد ذلك نضيف 0.25 مل Réactif de Folin. نغطي المحلول بورق ألمنيوم ونتركه لمدة دقيقتين، ثم نضيف له 1.25 مل من Na_2CO_3 ليصبح الحجم الكلي 2 مل.

الجدول التالي يلخص العمل التجريبي:

الجدول 3: تجربة حمض غاليك.

	أبيض(Blanc)	محلول حمض غاليك
المستخلص المائي (مل)	—	0.1
H_2O (مل)	0.5	0.4
Réactif de Folin (مل)	0.25	0.25
نتركه مدة دقيقتين		
Na_2CO_3 2 % (مل)	1.25	1.25
الحجم الكلي (مل)	2	2

نحرك الأنبوب جيدا ونتركه لمدة 40 دقيقة بعيدا عن الضوء. قراءة الامتصاصية تكون تحت طول موجة 750 نانومتر.

لمعايرة الجهاز نضع أولا Blanc .

دراسة المستخلص:

العينة محضرة بإذابة المستخلص العضوي للحصول على الفصل في الميثانول أو المستخلص المائي في الماء المقطر.

نتبع نفس المراحل السابقة وذلك بوضع العينة بدلا من محلول حمض غاليك.

يمكن تلخيص العمل التجريبي للمستخلص المائي أو الميثانولي في الجدول التالي:

الجدول 4: ملخص العمل التجريبي للمستخلص المائي

	Blanc	العينة
المستخلص المائي (مل)	—	0.1
H_2O (مل)	0.5	0.4
Réactif de Folin (مل)	0.25	0.25
نتركه لمدة دقيقتين		
Na_2CO_3 2 % (مل)	1.25	1.25
الحجم الكلي (مل)	2	2

نحرك الأنبوب جيدا ونتركه لمدة 40 دقيقة بعيدا عن الضوء. قراءة الامتصاصية تكون تحت طول موجة 750 نانومتر.

تركيز مركبات متعدد الفينول الموجودة في مستخلص النبتة يستنتج انطلاقا من المنحنى القياسي لحمض غاليك والمعبر عنه بالميكروغرام المكافئ لحمض غاليك بالميليغرام للمستخلص (µg GAE / gm)

نتائج الامتصاصية:

تم قيــاس الامتصـاصيــة في جــهاز الطيـف الضـوئي نانــومتر.(UV mini –1240)على طـول موجـة 750 نانــومتر.

تحصلنا على القيم المدونة في الجدول التالي:

جدول 5: قيم الامتصاصية لمتعدد الفينول

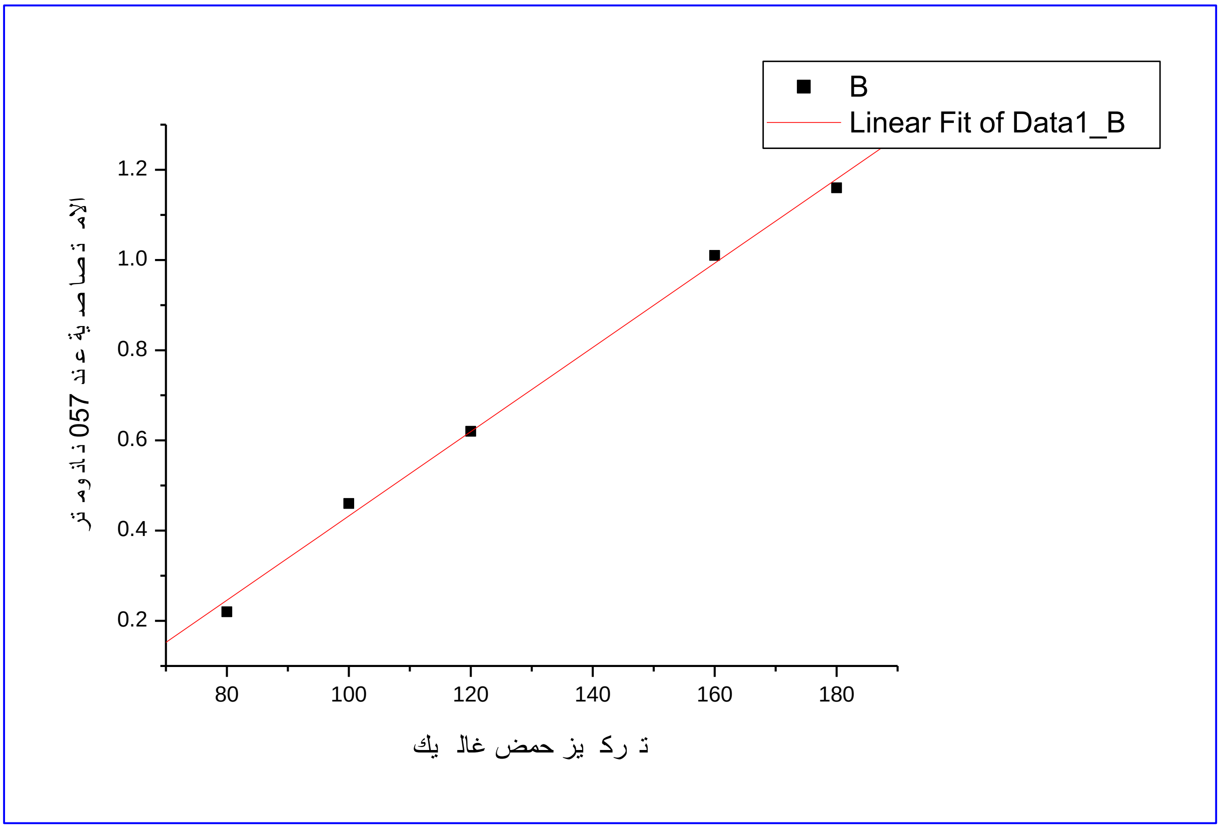
الأنابيب	ABS		
1	0.092	0.183	0.183
2	0.134	0.135	0.316
3	0.225	0.114	0.116
4	0.038	0.031	0.221
5	0.459	0.461	0.466
6	0.616	0.621	0.630
7	0.566	0.583	0.514
8	1.014	1.011	1.112
9	1.165	0.984	1.185
10	1.020	0.568	1.517

والجدول التالي يوضح القيم المأخوذة لرسم المنحنى العياري لحمض غاليك.

الجدول 6: امتصاصية البوليفينول بدلالة تركيز حمض غاليك

التركيز (µg/ml)	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200
الامتصاصية (750 nm)	0.09	0.13	0.11	0.22	0.46	0.62	0.58	1.01	1.16	1.51

لرسم المنحنى القياسي نأخذ القيم الأكثر دقة.



الشكل 8: المنحنى العياري لحمض غاليك بدلالة التراكيز µg/ml

II.3.4. التحليل الكمي للفلافونويد:

نتبع نفس الطريقة في التحليل الكمي للفلافونويد لثلاث أنواع من التمور درست من قبل Lamaison et Carnat (1991) وكذلك Bahorun (1997) .[39]

عند تشكل معقد بين ثلاثي كلوريد الألمنيوم ($AlCl_3$) وذرات الأكسجين الموجودة على الكربون 4 و5 الموجودة على مركبات الفلافونويد ينتج عنه اللون الأصفر.

تحضير المنحنى العياري للكيرسيتين:

نأخذ 2 غ من ثلاثي كلوريد الألمنيوم ($AlCl_3$) ونذوبها في 100 مل من الماء المقطر.

أما بالنسبة للمنحنى العياري يكون باستغلال 9 تراكيز للكيرسيتين تتراوح بين 2.5-40 مكغ ⁄ مل، الجدول التالي يوضح ذلك.

الجدول 7: تراكيز مختلفة للكيرسيتين:

الحجم المأخوذ من المحلول الرئيسي (مل)	0.1	0.2	0.4	0.8	1.1	1.5	1.8	2.3	2.6	3.0
حجم الماء المضاف (مل)	2.9	2.8	2.6	2.2	1.9	1.5	1.2	0.7	0.4	0
تركيز الكيرسيتين (مكغ/مل)	-	2.5	5.0	10	15	20	25	30	35	40

الجدول التالي يبين كيفية العمل التجريبي:

الجدول 8: ملخص العمل التجريبي للمستخلص المائي.

	Blanc	العينة
المستخلص (مل)	—	1
$AlCl_3$ (مل)	1	1
حجم الماء المضاف (مل)	1	—
الحجم الكلي (مل)	2	2

القراءة تكون بعد 10 دقائق عند طول موجة 430 نانومتر في جهاز قياس الطيف الضوئي.

يستنتج تركيز الفلافونويدات انطلاقا من المنحنى القياسي للكيرسيتين (0 ـ 40 مكغ/مل) والذي نعبر عنه بالميكروغرام للمستخلص المكافئ للكيرسيتين بالميليلتر (µg EQ/ml)

نتائج الامتصاصية:

تم قياس الامتصاصية في جهاز الطيف الضوئي (UV mini –1240)على طول موجة 430 نانومتر.

تحصلنا على القيم المدونة في الجدول التالي:

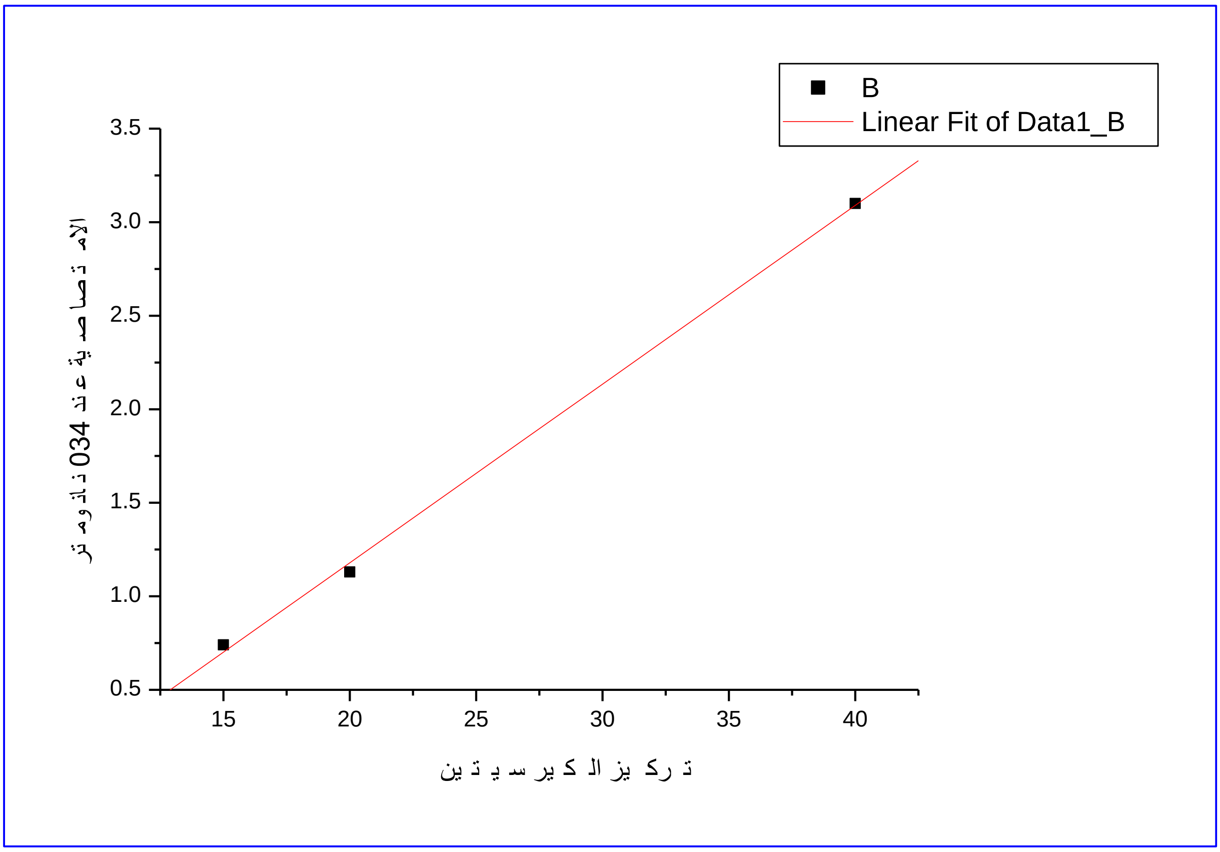
جدول 9: قيم الامتصاصية للفلافونويد

الأنابيب	ABS		
1	0.0	0.0	0.0
2	0.131	0.133	0.027
3	0.146	0.211	0.252
4	0.309	0.317	0.328
5	0.319	0.794	0.775
6	1.230	1.113	1.251
7	1.271	1.264	1.284
8	1.316	1.428	1.411
9	2.280	1.980	2.061
10	3.102	3.024	3.254

لرسم المنحنى القياسي نأخذ القيم الأكثر دقة حسب الجدول التالي:

جدول 10: امتصاصية الفلافونويد بدلالة تركيز الكيرسيتين

تركيز الكيرسيتين µg/ml	0.0	2.5	5.0	10	15	20	25	30	35	40
الامتصاصية 430 nm	0.00	0.13	0.22	0.37	0.74	1.13	1.27	1.42	2.28	3.10



الشكل 9 : المنحنى العياري للكيرسيتين بدلالة التراكيز µg / ml