



البحث العلمي وسبلنا للحياة المثلى



دراسة السلوك الكهروكيميائي لمستخلص الفينولات لنبات اكليل الجبل

نهى محمد يحيى، رغد أكرم محسن

قسم الكيمياء ، كلية التربية للبنات ، جامعة الموصل ، الموصل ، العراق

nohamohd@uomosul.edu.iq

المخلص

تضمن البحث دراسة السلوك الكهروكيميائي للفينولات المستخلصة من أوراق نبات اكليل الجبل بطريقة Grand في مستخلص خلات الاثيل على قطب الزئبق ذي القطرة المعلقة (HMDE) بالمحلول ذي الدالة الحامضية (pH=7) وبالظروف الاولية المثبتة بجهاز البولاروغرافي Computrance Metrohm 797. أعطت الفينولات قمة انودية واضحة عند جهد (2.6 V) ضد قطب المرجع Ag/AgCL Sat. KCl. ولقد بينت النتائج من دراسة تأثير الدالة الحامضية عند جهد اختزال وتيار الانتشار للقمة الانودية للفينولات في مستخلص خلات الاثيل وباستخدام تقنية فولتامتري الموجة المربعة (Square Wave Voltammetry) عند الدوال الحامضية (pH= 1,2,6,7,8) ان هناك زيادة في تيار الانتشار مع زيادة الدالة الحامضية وصولا الى (pH=8) واعطت هذه الدالة الحامضية اعلى تيار وافضل شكل لقمة انودية للفينولات وتم اختيارها كوسط مثالي لتثبيت الظروف المثلى لأكسدة الفينولات من جهد البدء، جهد الترسيب، زمن الترسيب، زمن التوازن، مراحل الجهد، سعة النبضة والتردد وسرعة المسح وحجم قطرة الزئبق وتأثير زمن الاستقرار مع رسم المنحني القياسي للفينولات المتعددة باستخدام الظروف المثلى. وباستخدام معادلة نرنست رسمت العلاقة بين (pH (1,2,6,7,8) ضد جهد الاختزال المقابل لها، للفينولات المستخلصة بطريقة Grand واعطت علاقة خطية بمعامل ارتباط ($R^2=0.9643$) وقيمة محسوسة كمؤشر لانتقال الالكترونات خلال عملية الأكسدة.

الكلمات المفتاحية: اكليل الجبل، الفينولات المستخلصة، السلوك الكهروكيميائي للفينولات، تقنية فولتامتري الموجة المربعة، معادلة نرنست

المقدمة

يعتبر *Rosmarinus officinalis* والمعروف باسم اكليل الجبل، وهو شجيرة دائمة الخضرة معمرة تنتمي الى عائلة *Lamiaceae* ويزرع الآن في جميع أنحاء العالم نظرا لاستخدامه كعامل طبيعي حافظه للأغذية وكمكثفات [12]. كما تم استخدام اكليل الجبل كمصدر للطب التقليدي لعدة قرون لتقوية الذاكرة وفي علاج أمراض الجهاز الهضمي [13,14]. يكمن السر وراء القدرات الوقائية والعلاجية لاكليل الجبل في الزيت العطري ومستخلصه نظرا لاحتوائه على المركبات الفينولية، مثل حامض الكرونوسيك والكارنوسول وحامض الروزمارينيك، المسؤولة عن نشاط مضادات الأكسدة القوية لزيت اكليل الجبل ومستخلصه [15,16] حيث يمنع تكوين الجذور الحرة اما باقتناصها أو بزيادة نشاط الأنزيمات المضادة للأكسدة [17]. في هذا البحث تمت دراسة السلوك الكهروكيميائي لمستخلص الفينولات من أوراق نبات اكليل الجبل (المستخلصة بطريقة Grand) وتم تحديد الظروف المثلى باستخدام جهاز Metrohm 797 VA و *Computrance* وذلك بتطبيق تقنية فولتامتري الموجة المربعة SWV

ان تفاعلات الاكسدة والاختزال ضرورية للحياة لأنها تمثل أساس العديد من الآليات الكيميائية الحيوية للتغيرات الأيضية [1] ويمكن أن تنتج هذه التفاعلات الأوكسجين وأنواع النتروجين التفاعلية (الجذور الحرة) التي قد تؤدي الى تلف الخلايا بسبب الاجهاد التأكسدي الذي يسبب بدوره أمراضا مختلفة [2]. لقد بينت العديد من البحوث أن وجود مضادات الأكسدة الطبيعية يساهم في تجنب أو تقليل بعض أنواع عمليات الاكسدة وحماية النظام البيولوجي [3,4]. ان المركبات الفينولية بشكل عام والفلافونويد بشكل خاص، هي نواتج الأيض الثانوية وتتواجد بصورة رئيسية في الأعشاب والخضروات والفواكه والبذور [5] ومن المعروف أن الفينولات تحمي أنسجة الجسم من الاجهاد التأكسدي وما يعرف بالتعديل الجيني وتثبيط الأشعة فوق البنفسجية وتكوين الورم الناتج عن المواد المسرطنة [6,7]، ولهذا فقد صنفت كمضادات أكسدة طبيعية وفعالة لاقتناص أو إزالة الجذور الحرة وكذلك تثبيط الأنظمة الانزيمية المسؤولة عن توليد الجذور الحرة [8-11].

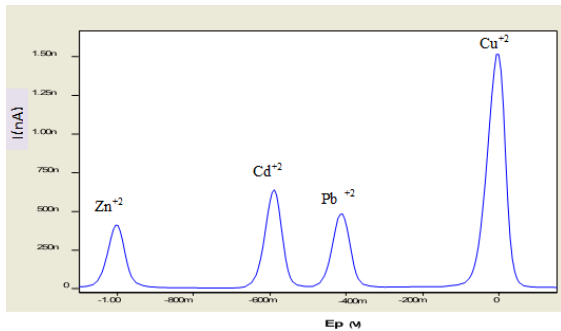
ثانيا: فصل وتنقية الفينولات من مستخلص اوراق اكليل الجبل بعملية التحلل المائي

بما ان اغلب الفينولات لا توجد بشكل حر في الطبيعة وانما تكون مرتبطة بأصرة كلايكوسيدية (glycosidic bonds) مع الكاربوهيدرات بشكل كلايكوسيدات في التركيب الكيميائي لأوراق نبات اكليل الجبل Rosemary ولتنقية للحصول على الفينولات يتم اجراء عملية التحلل الحامضي ،وذلك لكسر الاصرة الكلايكوسيدية وتحليل الفينولات . تم وضع في دورق زجاجي لجهاز التصعيد الحراري 50 مل من المستخلص في الفقرة أعلاه وأضيف له 5 مل من 1N HCl وتم التصعيد الحراري عند درجة حرارة 100 م° لمدة ساعة واحدة ،ثم برد المحلول وورش للتحلل من الشوائب التي توجد في المحلول. وضع المحلول في قمع الفصل واضيف اليه 40 مل من خلات الأثيل Ethyl acetate لاستخلاص الفلافونويدات والفينولات المتعددة بين مرتين مع الرج الجيد للحصول على طبقتين ،الطبقة العليا (مستخلص الفينولات) لخلات الاثيل والطبقة السفلى المائية .

اخذت الطبقة العليا لمستخلص الفينولات واضيف اليها (3) غم من كبريتات المغنيسيوم الامائية $MgSO_4$ ،وحفظت العينات داخل قناني محكمة الغلق ومعممة ووضعت داخل الثلجة لحين استخدامها في دراسة السلوك الكهروكيميائية (للفينولات المستخلصة) باستخدام جهاز البولاروغرافي. ولقد تم استخدام تقنية الموجة المربعة Square Wave Voltammetry (SWV).

ثالثا: طريقة معايرة جهاز البولاروغرافي

تمت معايرة جهاز البولاروغرافي وذلك لتجنب الاخطاء قبل بدء بالقياسات لدراسة السلوك الكهروكيميائي للفينولات. استخدم محلول المعايرة والذي هو عبارة عن مزيج من الايونات ($Zn^{+2}, Cd^{+2}, Pb^{+2}, Cu^{+2}$) وتتم عملية المعايرة وذلك بإضافة (100) مايكروليتر من هذا المحلول القياسي الذي يحتوي على تركيز (250 ppm) من مزيج هذه الايونات إلى الخلية البولاروغرافية والتي تحتوي على 50 مل من محلول الفوسفات المنظم (pH=7) ثم نمرر غاز النتروجين لمدة سبعة دقائق والغاية منها هو طرد الأوكسجين وبعدها مقارنة النتائج التي تم الحصول عليها بالنتائج القياسية المؤكدة للجهاز لبيين لنا دقة العمل للجهاز كما مبين بالشكل (1).



الشكل (1) : بولاروغرام لايونات محلول المعايرة

(Square Wave Voltammetry) لقطب الزئبق ذي القطرة المعلقة HMDE (Hanging Mercury Drop Electrode). كما تم حساب عدد الالكترونات بتطبيق معادلة نرنست.

المواد وطرائق العمل

المواد: مصدر وتصنيف النبات، استعمل في البحث أوراق نبات اكليل الجبل (Fresh Rosemary Leaves) الذي تم الحصول عليه من مشتل في محافظة نينوى. كما جهزت المواد الكيميائية والمذيبات المستخدمة في البحث من شركة Fluka وشركة Sigma وبمواصفات ذات نقاوة عالية.

الأجهزة: تم استخدام جهاز التقطير البسيط مع إضافة برمكتات البوتاسيوم لتحضير الماء الغير المؤين. كما تم استخدام جهاز التحليل البولاروغرافي المجهز من شركة Metrohm ذو موديل 797 VA Computrance. ولضبط الدالة الحامضية للمحاليل المنظمة تم استخدام جهاز قياس الدالة الحامضية pH- Meter المجهز من شركة HANNA. كذلك تم استخدام جهاز المبخر الدوار (rotary evaporator).

طريقة العمل:

أولاً: استخلاص الفينولات من اوراق اكليل الجبل الخام

اتبعت طريقه الباحث Grand لعام (1988) [18]، في استخلاص الفينولات من اوراق نبات اكليل الجبل والمحورة من الطريقة الاساسية للباحث Verporte لعام (1982) حيث اخذت كمية من هذه الاوراق وتم تجفيفها في الفرن الكهربائي عند درجة حرارة 65 م° وبعدها تم وزن 25 غم منها وسحقت في طاحونة كهربائية ثم اجريت عمليه نخل لأوراق النبات المجففة بواسطة منخل قطر فتحاته (2.36) ملم، بعدها وضعت هذه الكمية في بيكر واضيف لها 400 سم³ من البتروليوم ايثر بتركيز (95%) ووضع على الجهاز المحرك الكهربائي Stirrer بوجود المحرك المغناطيسي لمدة يومين في كل يوم لمدة خمسة ساعات وبعدها يوضع في الثلجة للنقع والغاية من ذلك هو تقجير جدران الخلايا النباتية، بعدها تم ترشيحه بعده طبقات من ورق الترشيح والشاش وبذلك اخذنا البثل وترك الراشح الذي يحتوي على الدهون.

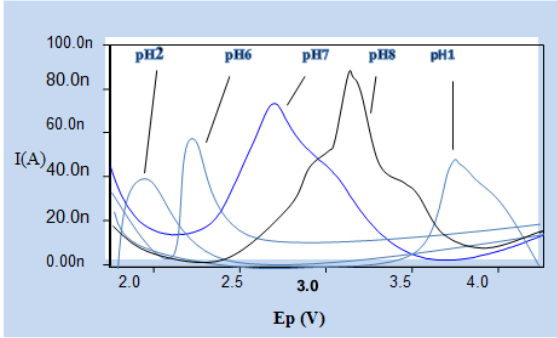
ثم وضع البثل في بيكر وأضيف له 400 مل من الايثانول بتركيز (95%) مع تحريكه باستخدام المحرك الكهربائي خمس ساعات وامدة يومين حيث يحفظ المزيج عند درجة حرارة 4 م° في الثلجة للنقع، ثم رشح بعده طبقات من الشاش ثم رشح ثانية بواسطة قمع بخر باستخدام اوراق الترشيح (Whatman No1) وذلك للتخلص من الالياف والاجزاء الغير مسحوقة، واخذ الراشح ثم بخر الايثانول باستخدام جهاز المبخر الدوار اذ يعمل الجهاز على اساس التبخير تحت الضغط المخلخل ثم حفظت العينات في قناني محكمة ومعممة في الثلجة لحين الاستخدام.

النتائج والمناقشة

جدول (2): قيم تيار الانتشار (Ip) وجهد الاختزال (Ep) للفينولات عند

دالات حامضية مختلفة للمحلول المنظم

Current (nA)	Potential (V)	pH
53.6	3.8	1
43.0	1.8	2
59.0	2.3	6
75.3	2.6	7
92.4	3.2	8

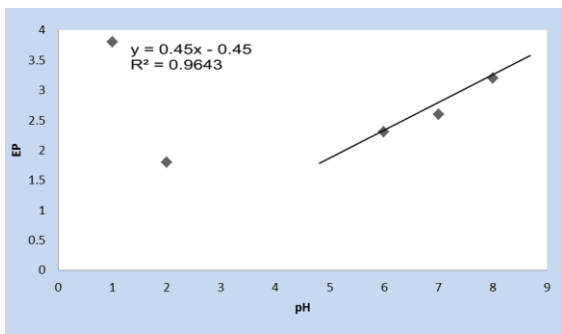


الشكل (3): فولتامري الموجة المربعة للفينولات باستخدام الدوال الحامضية (pH=1,2,6,7,8)

لقد بينت النتائج المبينة في الجدول (2) ان أفضل دالة حامضية كانت (pH=8) لانها أعطت أعلى تيار وأفضل شكل قمة انودية للفينولات وذلك بزيادة في تيار الانتشار مع زيادة الدالة الحامضية للمحلول المنظم كما موضح بالشكل (2) وتم اختيارها وسط مثالي لدراسة السلوك الكهروكيميائي للفينولات.

ان عمليات الاكسدة والاختزال التي تحدث على سطح قطب الزئبق تكون عكسية وذلك نتيجة لانتقال الالكترون بشكل سريع جدا لذلك يمكن تطبيق معادلة نيرنست لهذا النوع من التفاعلات، حيث أن Ep تمثل جهد القطب المتقاطر و E° تمثل جهد الاختزال القياسي و (n) تمثل عدد الإلكترونات المنتقلة خلال التفاعل الكيميائي.

$$Ep = E^{\circ} - \frac{0.059}{n} \text{pH.}$$



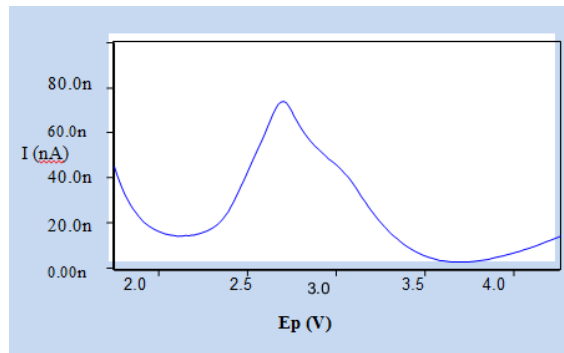
الشكل (4): العلاقة بين الجهد (Ep) ضد الدالة الحامضية لمستخلص الفينولات

دراسة السلوك الكهروكيميائي لمستخلص الفينولات (خلات الاثيل) على قطب الزئبق ذي القطرة المعلقة (HMDE)

تم تسجيل بولاروغرام موجة مربعة للفينولات المتعددة المستخلصة بطريقة (Grand) حيث أخذ (50) مايكروليتر من الفينولات (10^{-3}) باستخدام الماصة المايكروية (Micropipette) ووضع في المحلول المنظم ذي الدالة الحامضية (pH=7) وباستخدام الظروف الاولية المثبتة والتي يتم فيها تثبيت جهد البدء وجهد النهاية مع تحديد حجم قطرة الزئبق أما بالنسبة لبقية المتغيرات يتم تسجيلها ذاتيا في جهاز البولاروغرافي كما موضح في الجدول (1). لقد أعطت الفينولات قمة انودية واضحة عند جهد اختزال (2.6 V) كما مبين بالشكل 2.

الجدول (1): الظروف الأولية المستخدمة لمحلول الفينولات بدالة حامضية (pH=7)

المتغيرات	القيم
جهد البدء	2 (V)
جهد النهاية	4 (V)
جهد الترسيب	-0.9 (V)
زمن الترسيب	60 (s)
زمن التوازن	5.0 (s)
مراحل الجهد	0.5 (V)
سعة النبضة	0.2 (V)
التردد	50 (Hz)
حجم قطرة الزئبق	4 (mm)
معدل المسح	25.0015 (V/s)

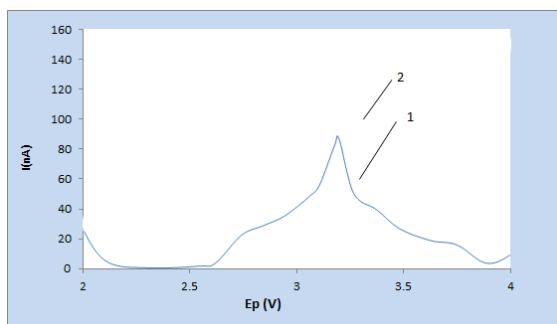


الشكل (2): فولتامري الموجة المربعة للفينولات عند pH=7 باستخدام الظروف الأولية المثبتة للجهاز

دراسة تغيير الدالة الحامضية لمستخلص الفينولات

سجل فولتامري الموجة المربعة (SWV) باستخدام المحلول المنظم عند الجهد (Ep) والتيار (IP) لقمة انودية للفينولات وذلك بإضافة (50) مايكروليتر من الفينولات بواسطة الماصة المايكروية (Micropipette) عند قيم الدالة الحامضية في المحلول المنظم لمدى من (pH= 1,2,6,7,8) وتم إجراء القياسات بالظروف المبينة بالجهاز وحصول النتائج المبينة بالجدول (2).

الشكل (5) يبين فولتامترى الظروف المثلى لمستخلص الفينولات وتبين ان هناك زيادة بتيار الانتشار مع ملاحظة أحسن شكل للقمة انودية مقارنة مع الفولتامترى المسجلة مع الظروف الاولية المثبتة في جهاز البولاروغرافي.



الشكل (5): بولاروغرام الموجة المربعة للفينولات عند pH=8 (1) عند الظروف الاولية و (2) عند الظروف المثلى

الاستنتاجات

تبين من دراسة السلوك الكهروكيميائي للمركبات الفينولية المستخلصة بطريقة Grand في خلايا الاثيل بان أعلى تيار انتشار (عند pH=8) على قطب الزئبق ذو القطرة المعلقة وباستخدام تقنية فولتامترى الموجة المربعة (SWV)، وعندها تمت دراسة وتحديد الظروف المثلى والتي اظهرت قمة انودية عند جهد اختزال (3.2 V). كما نستنتج من رسم العلاقة بين pH مقابل الجهد باستخدام معادلة نرنست بان هناك انتقال للألكترونات في عمليات الاكسدة_الاختزال للمركبات الفينولية حيث $n=0.13$.

ولقد تم حساب عدد الالكترونات من خلال رسم العلاقة لجهد قطب الزئبق المتقاطر ضد الدالة الحامضية المستخدمة حيث تبين أن معامل الارتباط يساوي ($R^2=0.9643$)، وميل الخط المستقيم قيمته (-0.45 v pH^{-1}) كما موضح في الشكل (4) وبذلك تبين ان عملية الاكسدة تضمنت انتقال الإلكترونات من خلال قيمة n المحسوسة [19].

دراسة الظروف المثلى لمستخلص الفينولات

لقد تمت دراسة الظروف المثلى لأكسدة الفينولات تم اخذ (50) مايكروليتر من مستخلص الفينولات بواسطة الماصة المايكروية لدراسة جميع التأثيرات على قيمة تيار الانتشار من تغيير جهد البدء والنهائية، تغيير جهد الترسيب، تغيير زمن الترسيب، تغيير زمن التوازن، تغيير مراحل الجهد، تغيير سعة النبضة، تغيير التردد، تغيير سرعة المسح و دراسة تغيير حجم قطرة الزئبق في المحلول المنظم ذي الدالة الحامضية (pH=8). وكذلك دراسة تأثير زمن الاستقرار على المنحني القياسي للفينولات كما موضح في الجدول 3.

الجدول (3): الظروف المثلى للسلوك الكهروكيميائي للفينولات عند (8)

(pH=)

المتغيرات	القيم
جهد البدء	2 (V)
جهد النهائية	4 (V)
جهد الترسيب	-1.1 (V)
زمن الترسيب	20 (s)
زمن التوازن	10 (s)
مراحل الجهد	0.4 (V)
سعة النبضة	0.5 (V)
التردد	50 (Hz)
حجم القطرة	9 (mm)
معدل المسح	25.0015 (V/s)

المصادر

- Valko, M.; Rhodes, C.J.; Moncol, J.; Izakovic, M.; Mazur, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.*, **2006**, *160*(1), 1-40.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed; Oxford University Press, **1999**.
- Guardado-Yordi, E.; Pérez-Molina, E.; Matos, M.J.; Uriarte, E. In: *Nutrition, Well-Being and Health*; Bouayed, J.; Bohn, T., Eds.; In Tech, **2012**.
- Magalhães, L.M.; Segundo, M.A.; Reis, S.; Lima, J.L. Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties *Analyticachimicaacta*, **2008**, *613*(1), 1-19.
- Bravo, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.*, **1998**, *56*(11), 317-333.
- Knekt, P.; Jarvinen, R.; Reunanen, A.; Maatela, J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *BMJ*, **1996**, *312*(1), 478-481.
- Scalbert, A.; Johnson, I.T.; Saltmarch, M. Polyphenols, antioxidants and beyond. *Am. J. Clin. Nutr.*, **2005**, *81*(1), 215-217.
- Cook, N.C.; Samman, S. Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *J. Nutr. Biochem.*, **1996**, *7*, 66-76.
- Gichner, T.; Popisil, F.; Veleminsky, J.; Volkeova, V.; Volke, L. Two types of antimutagenic effects of gallic acid and tannic acids towards N-nitroso-compounds-induced mutagenicity in the Ames Salmonella assay. *Folia Microbiol.*, **1987**, *32*, 55-62.
- Middleton, E.J.; Kandaswami, C.; Theoharides, T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol. Rev.*, **2000**, *52*, 673-839.
- Rice-Evans, C.A.; Mille, N.J.; Paganga, G. Structure - antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.*, **1996**, *20*, 933-956.

12. Olszowy, M. What is responsible for antioxidant properties of polyphenolic compounds from plants? *Plant Phys. Biochem.* **2019**, *144*, 135–143
13. De Siqueira Leite, K.C.; Garcia, L.F.; Lobón, G.S.; Thomaz, D.V.; Moreno, E.K.G.; de Carvalho, M.F.; Rocha, M.I.; dos Santos, W.T.P.; Gil, E.S. Antioxidant activity evaluation of dried herbal extracts: An electroanalytical approach. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2018**, *28*, 325–332.
14. Pintore, G.; Usai, M.; Bradesi, P.; Juliano, C.; Boatto, G.; Tomi, Chessa, M.; Cerri, R.; Casanova, J. (2001); Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. *Flavour Fragr. J.* **17**, 15-19
15. Stojic'evic', A.S.; Pastor, F.T.; Gorjanovic', S.Ž.; Šolevic' Knudsen, T.M.; Antic', M.P. Modification of DC polarographic antioxidant assay-Application to aromatic plants and their active principles. *Flavour Fragr. J.* **2020**, *35*, 219–226
16. De Siqueira Leite, K.C.; Garcia, L.F.; Lobón, G.S.; Thomaz, D.V.; Moreno, E.K.G.; de Carvalho, M.F.; Rocha, M.I.; dos Santos, W.T.P.; Gil, E.S. Antioxidant activity evaluation of dried herbal extracts: An electroanalytical approach. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2018**, *28*, 325–332
17. Khojasteh, A.; Mirjalili, M.H.; Hidalgo, D.; Corchete, P.; Palazon, J. New trends in biotechnological production of rosmarinic acid. *Biotechnol. Lett.* **2014**, *36*, 2393–2406
18. Grand, A.; Woundergen, P. A., Verporte, R. and pousset, J. L. (1988). Anti-infections phytotherapies of tree-svannah Senegal (west Africa). Antimicrobial activity of 33 species *J. Ethnopharmacology*, *22*: 25-31
19. Ulu S. T "Spectrophotometric determination of glimepiride in pharmaceutical preparations based on the formation of charge transfer and ion-pair complexes", *Journal of Analytical Chemistry*, (2013) *68*(7), pp. 606–610

Abstract

The research included the study of electrochemical behavior of phenols which obtained in a Grand Process in the ethyl acetate using the mercury Drop electrode (HMDE) in phosphate buffer solution) pH=7 (under the initial conditions installed in metrohm.797 The results showed well known peak at (2.6v) against reference electrode of Ag/AgCl sat. KCl . The effect of pH(1,2,6,7,8) at the reduction voltage and propagation current of phenols in the organic layer showed an increase in the propagation current with an increasing of pH, using technique of square wave voltammetry . The result of polarogram obtained a well defined anodic peak at pH 8 with the highest current. This pH selected as ideal medium to stabilize the optimal condition for the oxidation of phenols of the start potential, end potential, deposition potential, deposition time, equilibration time, voltage step, amplitude, frequency (the size of the mercury drop and sweep rate.

Using the Nernst equation, the relationship between pH (1,2,6,7,8) was drawn against its corresponding reduction voltage of polyphenol extraction (in ethyl acetate) which extracted via Grand method , giving a linear relationship to a coefficient of ($R^2 = 0.9643$) ,with slope value which indicated of an electron transmission during the oxidation process.