Extraction and partial Purification of Proanthocyanidins from Grape (*Vitis vinifera*) and Date (*Phoenix dactylifera*) seeds and determination some of their Biological activities

إستخلاص الفينولات الكلية والتانينات والبروانثوسيانيدينات من بذور العنب (*Vitis vinifera*) ونوى التمر (*Phoenix dactylifera*)

* مريم هادي جبار/جامعة كربلاء / كلية العلوم
أ.م.د علي عبد الكاظم / جامعة كربلاء / كلية العلوم
أ.م.د ناجح هاشم كاظم / جامعة كربلاء / كلية العلوم
المراسلات الى/ أ.م.د علي عبد الكاظم / جامعة كربلاء / كلية العلوم
* مستل من رسالة الماجستير للباحث الاول.

مستخلص :-

تضمنت الدراسة الحالية استخلاص الفينولات الكلية والتانينات والبروانثوسيانيدينات من بذور العنب ونوى التمر بأستخدام ظروف استخلاص مختلفة اذ كانت درجتا الحرارة (25 و30) م° هما الافضل في استخلاص الفينولات والتانينات والبروانثوسيانيدينات من نوى التمر وبذور العنب, على التوالي .بينما كانت مدة الاستخلاص 12ساعة وسرعة الرج 50 دورة/دقيقة هما الافضل في استخلاص المركبات المدروسة من كلا المستخلصين ماعدا التانينات التي كان افضل استخلاص لها من بذورالعنب عند سرعة الرج 100دورة / دقيقة في حين كانت مدة الحضن 6 ساعات كافية للحصول على اعلى تركيز للفينولات والتانينات من بذور العنب ,كما تفوق الاسيتون على المذيبات الاخرى المستخدمة في الدراسة في استخلاصه للفينولات والتانينات والبروانثوسيانيدينات من المستخلصين قيد الدراسة . وعند تحديد التركيز الامثل من الاسيتون تبين ان التركيز 70% من هذا المذيب هو الاكفأ من حيث استخلاصه للمركبات قيد الدراسة.

Abstract:-

The current study included the extraction of total phenols, tannins and proanthocyanidins from grape (*Vitis vinifera*) and date (*Phoenix dactylifera*) seeds using different extraction conditions. The temperatures (25 and 30)C° were the best degree in extraction of total phenols ,tannins and proanthocyanidins from date and grape seeds, respectively. While extraction time12 hours and shaking speed (50) rpm were the best in extraction the studied compounds from both extracts,except the best extraction of tannins from grape seeds was at 100 rpm ,and 6 hrs were best for extraction tannins and phenols from grape seeds. Acetone was chosed as the best solvent than others which used in the study in extraction total phenols ,tannins and proanthocyanidins from grape and date seeds . Acetone 70% was found to be the best when determined the best concentration of solvent in extraction the studied compounds from both extracts.

المقدمة:-

تقوم معامل التصنيع الغذائي بطرح كميات هائلة من بذور الثمار والمخلفات الزراعية كنواتج عرضية ,فقد اشارت احدى الاحصائيات التي اجريت عام 2004 الى ان كمية نوى التمر المطروحة في ذلك العام بلغت 863 الف طن (1) .وفي احصائية اخرى عن النواتج العرضية لصناعة النبيذ [والتي تشمل بذور (seeds) وجلد ثمار العنب اضافة الى السيقان (stalks)] اتضح ان هنـالك مايقـرب من 7 مليـون طـن تطـرح سنـويا من هذه المخلفات (2) .

لقد كشف التحليل الكيميائي (Chemical analysis) احتواء تلك المخلفات على مركبات كيميائية متنوعة ذات تأثيرات حيوية مختلفة تتصدرها المركبات الفينولية (Phenolic compounds) مما شجع الباحثين على القيام بدراسات مختلفة لتحويل تلك المخلفات الى مواد ذات قيمة طبية وصيدلانية وغذائية وصناعية .

تعد المركبات الفينولية مركبات اروماتية تمثل مواد ايض ثانوية في النبات .تتواجد في كل من النباتات الصالحة (edible) وغير الصالحة للأكل (inedible) (3) , وتقسم بشكل رئيس الى قسمين : الفلافونويدات (Flavonoides) والتانينات (Tannins) .

تعرف التانينات على انها مركبات فينولية ذائبة بالماء تتراوح اوزانها الجزيئية بين (500-3000) دالتن , وتظهر فعاليات حياتية متنوعة تتمثل بكونها مضادة للبكتريا (Antibacterial) والفيروسات (Antiviral) والأورام (Antitumor) والتطفير (Antimutagenic) والأكسدة (Antioxidant) , كما حظيت التانينات بالعديد من الاستخدامات الاخرى مثل صناعة الجلود والاخشاب وعوامل تنظيف وتطهير (Cleaning and Aseptic Agents) (5,4).

يمكن تصنيف التانينات الى ثلاث مجاميع رئيسة : التانينات القابلة للتحلل (Hydrolysable tannins) والتانينات المكثفة (Condensed tannins) والتانينات المعقدة (Complex tannins) . لقد استقطبت التانينات المكثفة والتي تعرف ايضا بالبروانثوسيانيدينات (Proanthocyanidins) اهتمام الباحثين نظرا لانتشارها الواسع في النباتات الراقية مقارنة بالنوعين الاخرين من التانينات اللذين يكون تواجدهما في الطبيعة محدودا (6).

تتواجد البروانثوسيانيدينات في الطبيعة بشكل مزائج معقدة من البوليمرات مكونة من وحدات Flavan-3-ol "Catechins" وتنتشر في اوراق وثمار وقلف وبذور وازهار وجذور العديد من النباتات (8,7) .

تبدي البروانثوسيانيدينات فعاليات مضادة متنوعة تتميز بكونها مضادة للبكتريا (Antibacterial) و الفطريات (Antifungal) و الفيروسات (Antiviral) والابتدائيات (Antiprotozoal) والسرطان (Anti-cancer) .كما تتميز هذه المركبات بالعديد من التطبيقات الطبية الاخرى والتي من اهمها دورها في حماية القلب (Cardioprotective) وذلك من خلال تثبيط اكسدة LDL (Low-density Lipoprotein) وتثبيط تجمع الصفائح الدموية والتخثر وغيرها (6).

توصف البروانثوسيانيدينات بأنها مضادات اكسدة قوية نظرا للآليات المتنوعة التي تظهرها هذه المركبات والتي تتمثل بكبح الجذور الحرة (Free radical scavenging activity) وربط المعادن (Chelation of metals) وتثبيط الانزيمات (Inhibition of enzymes) وتثبيط اكسدة الدهون (Inhibition of lipid peroxidation) وقنص الأوكسجين المفرد (Quenching of singlet oxygen) (6).

يمتلك العراق ثروة نباتية كبيرة ,ونظرا لأهمية البروانثوسيانيدينات الكبيرة لذا فأن اهداف الدراسة تتمثل دراسة محتوى بذور العنب ونوى التمر من البروانثوسيانيدينات وتحديد الظروف المثلى لاستخلاصها من كلا النباتين.

المواد وطرائق العمل:-

1- استخلاص المواد الفينولية:-

استخدمت الطريقة الموصوفة من قبل Ahmed *et al*. (1998) (9) في استخلاص المواد الفينولية من النباتات قيد الدراسة مع بعض التحوير اذوضع7.5 غم من كل نموذج نباتي في دوارق حجمية سعة 250 مل (كلا على انفراد) ثم اضيف اليه 75 مل من المذيب المستخدم في الاستخلاص 50% ميثانول (المحضر بمزج 37.5 مل من الكحول المثيلي المطلق و37.5 مل ماء مقطر) ,ثم وضعت الدوارق في حاضنة هزازة (Shaker)على درجة حرارة 35 م° بسرعة رج 100 دورة / دقيقة و لمدة 24 ساعة ورشحت المستخلصات على مرحلتين الاولى باستخدام الشاش الطبي أما الثانية فكانت تحت التفريغ باستعمال مضخة تفريغ (Vacuum pump) وباستعمال ورق الترشيح,ثم أهمل الراسب في حين وضع الراشح في صواني معدنية (Trays) ,و تم تجفيفها جيدا بدرجة حرارة الغرفة. قشطت المستخلصات المذكورة بعد تمام جفافها و تم وزنها.

2-تحديد الظروف المثلى لاستخلاص البروانثوسيانيدينات من النباتين المنتخبين:-

تم دراسة تأثير درجة الحرارة في استخلاص البروانثوسيانيدينات من النباتين اذ تمت عملية الاستخلاص بدرجات حرارة (20 و25 و30 و35) م°, و بعد إتمام عملية الاستخلاص و الترشيح و تجفيف النماذج , قدرت البروانثوسيانيدينات و التانينات و المحتوى الفينولي الكلي .

تم دراسة تأثير مدة الاستخلاص في استخلاص البروانثوسانيدينات من النباتين اذ تمت متابعة عملية الاستخلاص خلال (6 و 12و 18 و 24 و36 و48) ساعة , و بعد إتمام عملية الاستخلاص و الترشيح و تجفيف النماذج , قدرت البروانثوسيانيدينات و التانينات و المحتوى الفينولي الكلي .

استخدمت الحاضنة الهزازة لدراسة تأثير سرعة الرج في استخلاص البروانثوسيانيدينات من النباتين المنتخبين اذ استخدمت سرع الرج (0 و50 و 100 و 150) دورة/دقيقة خلال عملية الاستخلاص, وتم تقدير البروانثوسيانيدينات و التانينات و المحتوى الفينولي الكلي وذلك بعد إتمام عملية الاستخلاص و الترشيح و تجفيف النماذج .

استخدمت مذيبات مختلفة لأستخلاص البروانثوسيانيدينات من النباتين قيد الدراسة اشتملت هذه المذيبات على : الايثانول والميثانول والاسيتون والايزوبروبانول وحامض الفورميك وخلات الاثيل فضلاً عن الماء المقطر، و اجريت عملية الاستخلاص , و بعد الحصول على المستخلص الجاف بشكله النهائي تم تقدير البروانثوسيانيدينات و التانينات و المحتوى الفينولي الكلي لجميع المستخلصات .

تم استخدام تركيز (10 و 30 و 50 و 70 و 80)% لأفضل مذيبين في استخلاص كل نبات منتخب , و بعد الحصول على المستخلص الجاف بشكله النهائي تم تقدير البروانثوسيانيدينات والتانينات و المحتوى الفينولي الكلي و نسبة المواد القابلة للاستخلاص و لجميع المستخلصات .

3- تقدير البروانثوسيانيدينات:-

قدرت كمية البروانثوسيانيدينات خلال جميع مراحل الدراسة باتباع الطريقة الموصوفة من قبل Sun *et al.*(1998) (10) واعتمادا على المنحني القياسي للكاتكين (catechine(-)+).

4- تقدير التانينات :-

قدرت كمية التانينات خلال مراحل الدراسة بأتباع الطريقة الموصوفة من قبل Khomdram and Singh (2011) (11) مع بعض التحوير واعتمادا على المنحني القياسي للكاتكين (catechine(-)+) ,اذ اضيف 7.5 مل ماء مقطر الى 1.0 مل من كل المستخلص وضعت في انابيب اختبار سعة 10 مل ثم اضيف 0.5 مل من محلول فولن- دنس 50% الى كل انبوبة بعدها تم اضافة 1 مل من محلول كاربونات الصوديوم (7%) و اكمل الحجم بالماء المقطر ليصبح الحجم 10 مل ,ثم حضن المزيج بدرجة حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة و تم قياس الامتصاص على طول موجي 600 نانوميتر.

5- **تقدير المحتوى الفينولي الكلي :-**

تم تقدير المحتوى الفينولي الكلي للمستخلصات النباتية بحسب الطريقة الموصوفة من قبل (Budrat and Shotipruk(12) 2008).

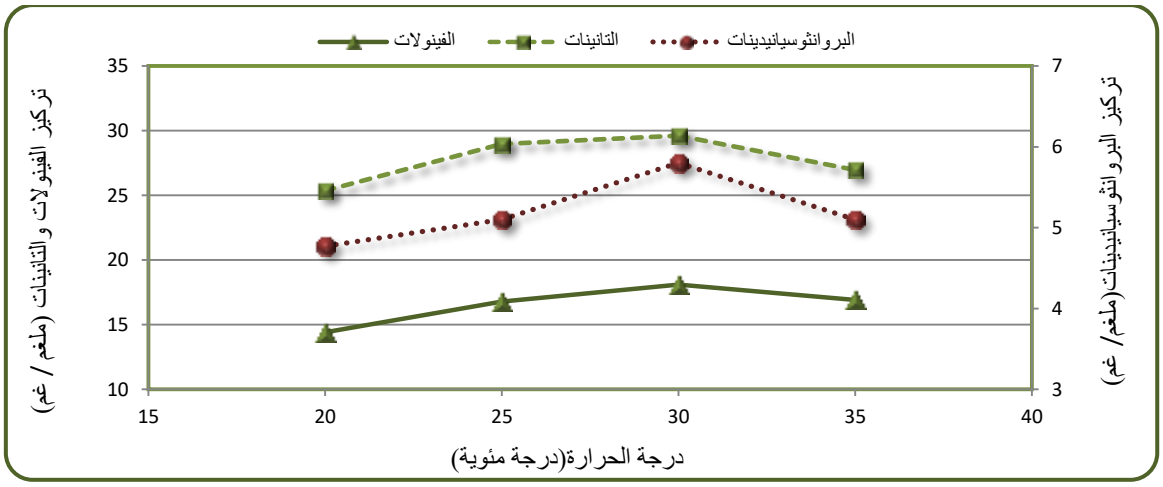
النتائج والمناقشة:-

يعد الاستخلاص بالمذيبات من اكثر الطرائق المستخدمة شيوعاً في تحضير المستخلصات من المواد النباتية,وذلك لسهولة استخدامها وكفائتها وقابليتها التطبيقية الواسعة, ويعتمد ناتج الاستخلاص الكيميائي على نوع المذيب وقطبيته ودرجة حرارة ومدة الاستخلاص ونسبة النموذج الى المذيب فضلاًعن التركيب الكيميائي والخصائص الفيزيائية للنموذج(13) كما تعتمد كفاءة عملية الاستخلاص على الاهتزاز الميكانيكي (14) .

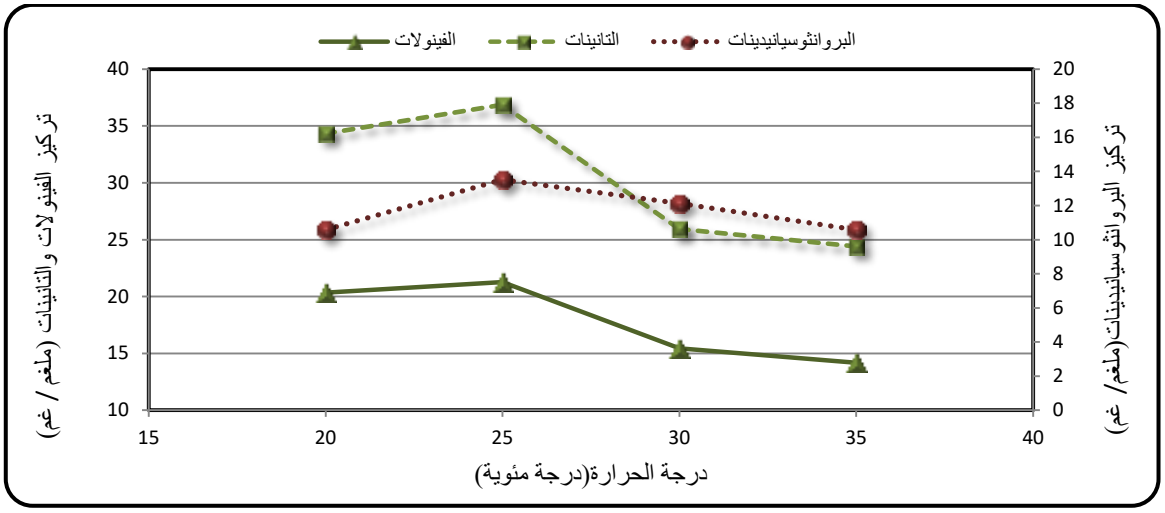
1- تأثيردرجة حرارة الأستخلاص:-

يتم اختيار درجة حرارة الاستخلاص لتحقيق افضل توازن للمنتج من حيث الذائبية والانتقائية وضغط بخار المذيب وانتشار المذاب فضلا عن التحسس اللوني للمنتج (15).

يبين الشكلان 1 و2 ان افضل درجة حرارة لاستخلاص بذور العنب 30م° اذ بلغ تركيز البروانثوسيانيدينات والتانينات والفينولات (5.8 و18.09و29.62) ملغم/غم ,على التوالي , في حين كانت درجة الحرارة 25م° هي الافضل لاستخلاصها من نوى التمراز بلغت التراكيز(13.52و21.285 و36.868) ملغم/غم للمركبات المذكورة سابقاً,على التوالي, كما يتضح من الشكلين (1 و2) انخفاض تراكيز المركبات المدروسة لكلا المستخلصين عند ارتفاع درجة حرارة الاستخلاص.



الشكل (1): تأثير درجة الحرارة في استخلاص الفينولات الكلية و التانينات و البروانثوسيانيدينات من بذور العنب .



الشكل (2): تأثير درجة الحرارة في استخلاص الفينولات الكلية و التانينات و البروانثوسيانيدينات من نوى التمر.

تعد درجة الحرارة المثلى المستحصل عليها من نتائج دراستنا مقاربة لما وجده (16) اذ كانت درجة الحرارة 26.18 هي الاكفأ في استخلاص المركبات الفينولية من نبات *Avicennia marina* .ان درجة الحرارة العالية تحفز اكسدة الفينولات المتعددة (17), اذ اوضح (18) بأن المعاملة الحرارية الاولية عند درجة الحرارة 50-60 م° تعمل على تنشيط انزيم Polyphenol oxidase (PPO) مما يقلل من تركيز الفينولات وبالتالي الفعالية المضادة للاكسدة.

وجد (19) ان درجة الحرارة 39.57م° هي الامثل لاستخلاص الفينولات الكلية من نبات الحناء *Lawsonia inermis* ,كما اوضح الباحث نفسه ان درجات الحرارة العالية تحفز فقدان المذيب بالتبخر طالما ان درجة غليان الاسيتون قريبة من 55م° وهذا يزيد من كلفة الاستخلاص من وجهة النظر الصناعية,ان التبخر يجعل نظام مذيب الاستخلاص اكثر تركيزا والتراكيز العالية ستزيد من ارتفاع محتوى المذيب العضوي مما يقلل القطبية وبالتالي يربك عملية استخلاص الفينولات ,لذلك يفضل اختيار درجات الحرارة المتوسطة (25 و35 و 45) م° كأقل واوسط واعلى المستويات ,على التوالي.

ان درجات الحرارة العالية تحفز التحلل المائي والاستخلاص غير المرغوب به للـ hemicelluloses وتكون المواد البكتينية والصموغ (gums) من المادة السيليلوزية المحتوية على التانين مما يزيد من لزوجة المستخلص والحصول على منتج تكون فيه نسبة التانين / الموادغيرالتانينة واطئة (15).

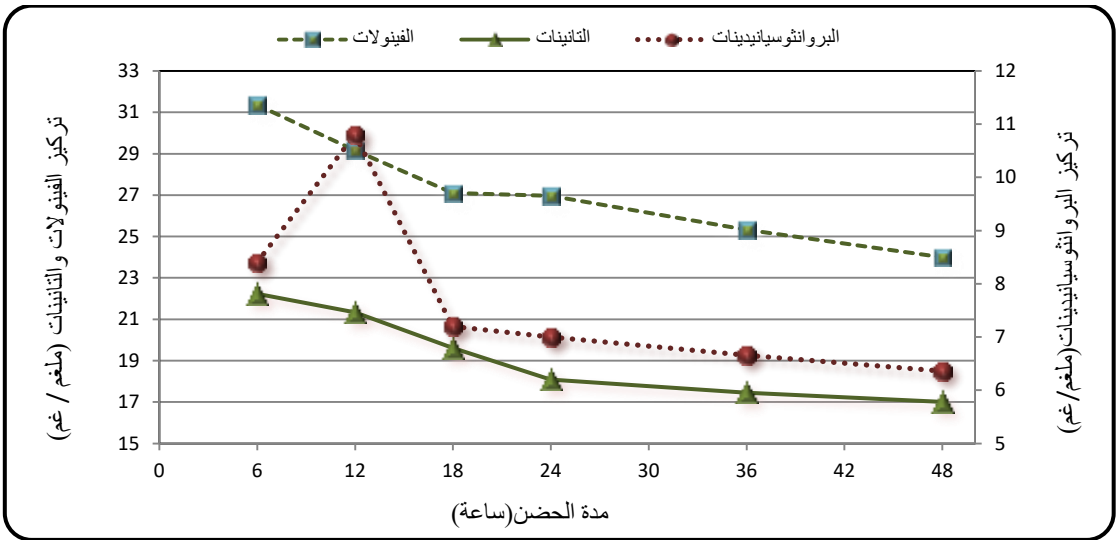
لاتتفق النتائج المستحصل عليها من هذه الدراسة مع نتائج (20) اذ حصل على اعلى تركيز للتانينات عند درجة حرارة 80م° من قشرة mangosteen كما اتفق معه (21) بأن 80 م° افضل درجة حرارة لأستخلاص الفينولات الكلية والبروانثوسيانيدينات من ثمار التين المجفدة اذ بلغ تركيزهما (3.7±0.09 و 0.87±0.01) ملغم/غم ,على التوالي .

2-2-3 تأثير مدة الاستخلاص:-

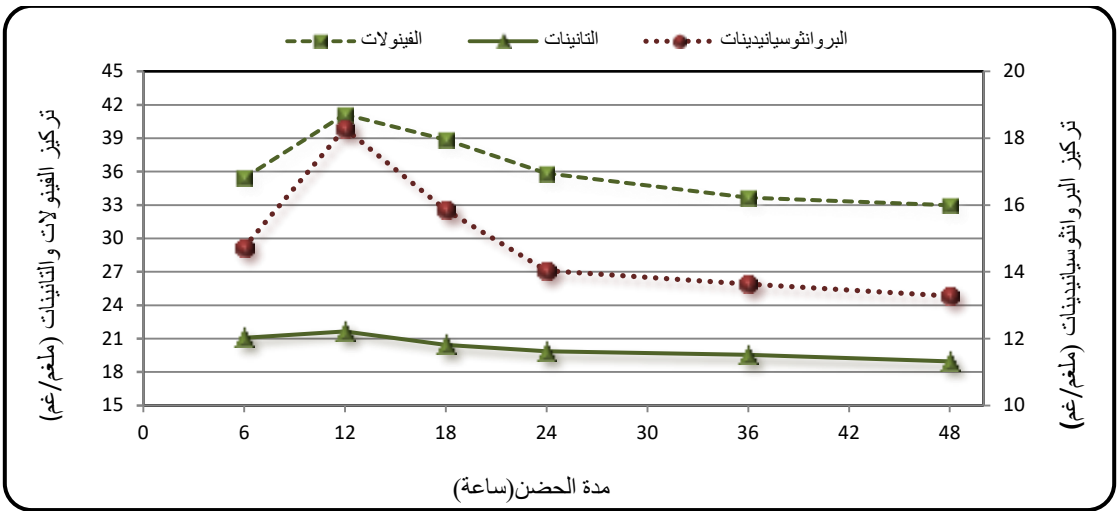
تم حضن المستخلصات النباتية لبذورالعنب ونوى التمر عند درجة الحرارة المثلى لاستخلاص البروانثوسيانيدينات من كل منهما لست فترات حضن (6 و12 و18 و24 و36 و48) ساعة .

ابدى مستخلص بذور العنب اختلافا في المدة اللازمة للحصول على اعلى كمية من الفينولات والتانينات والبروانثوسيانيدينات,ويوضح الشكل(3) بأن الست ساعات الاولى كانت كافية للحصول على اعلى تركيز من الفينولات والتانينات بتركيز(31.36 و22.23) ملغم/غم ,على التوالي,في حين استغرق الحصول على اعلى تركيز من البروانثوسيانيدينات 12 ساعة .ان هذا الاختلاف في الفترة الزمنية المطلوبة للحصول على اعلى كمية من الفينولات الكلية والتانينات والبروانثوسانيدينات قد يعزى الى الاختلاف في درجة البلمرة وذائبية وتداخل الفينولات مع المكونات الغذائية الاخرى مما يؤدي الى اختلاف الوقت المطلوب للوصول الى حالة التوازن بين المحلول في الخلايا والمذيب (bulk solution) (22) .

يلاحظ من الشكل(4) ان الفينولات والتانينات والبروانثوسيانيدينات تسلك المسلك ذاته في مستخلصات نوى التمر,فقد بلغ الاستخلاص اقصاه خلال مدة حضن استمرت 12 ساعة بتركيز(41.13 و 21.64 و18.29) ملغم/غم للمواد الثلاثة قيد الدراسة ,على التوالي .كما يتضح من الشكل ذاته بأن اختلاف مدد الحضن اقل تأثيرا على استخلاص التانينات من الفينولات والبروانثوسيانيدينات.



الشكل (3) :تأثير مدة الحضن في استخلاص الفينولات الكلية و التانينات و البروانثوسيانيدينات من بذور العنب .



الشكل(4):تأثيرمدة الحضن في استخلاص الفينولات الكلية والتانينات والبروانثوسيانيدينات من نوى التمر.

لم تبدي الزيادة في عدد ساعات حضن المستخلصين قيد الدراسة اي زيادة في تراكيز المركبات المذكورة,في حين كان الانخفاض في التركيز تدريجيا وبفارق بسيط بين فترات الحضن الى ان تم الحصول على اقل تركيز(24.0 و17.0و6.36) و (32.97 و18.94 و13.27) ملغم/غم للفينولات والتانينات والبروانثوسيانيدينات في مستخلصي بذور العنب ونوى التمر,على التوالي,عند الحضن لمدة 48 ساعة , ويمكن تفسير هذه الظاهرة من خلال القانون الثاني لـ Fick اذ أن التوازن النهائي يحصل بين المادة المذابة في المستخلص و المذيب بعد وقت معين لذا فأن وقت الاستخلاص الاضافي غير ذي فائدة في استخلاص مضادات الاكسدة الفينولية (22)، فضلا عن أن إطالة وقت الاستخلاص قد يؤدي الى اكسدة الفينولات عن طريق التعرض للضوء او الاوكسجين (23) .

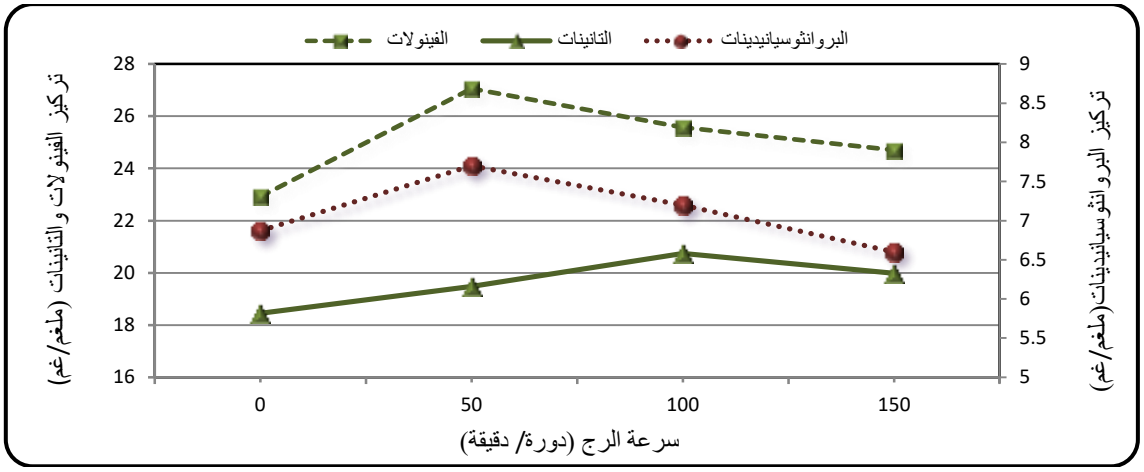
يتم تحديد المدى الزمني اعتمادا على سمات اقتصادية وعملية ,اذ ان المدة الزمنية الاطول تسبب زيادة في الكلفة وقد لوحظ عدم وجود اختلافات كبيرة بين كمية الفينولات المستخلصة بأستخدام مدد الحضن القصيرة مقارنة بالمدد الطويلة لذا تعد المدد القصيرة اكثرعملية وغير مكلفة , فقد وجد ان (73.78 و 36.5 و 25) دقيقة هوالزمن المثالي لاستخلاص الفينولات الكلية من اوراق نبات *Lawsonia inermis* (19) ونبات *Avicennia marina* (16) ونبات *Centella asiatica* (25) ,على التوالي , في حين كانت المدة (30 و80) دقيقة مثالية لاستخلاص التانينات من نبات *Caesalpinia coriaria* (15) واوراق وجذور وسيقان وبذور نبات الهندباء البرية *Cichorium intybus* (26), على التوالي.

ان نتائج هذه الدراسة لاتتفق مع ماتوصل اليه (27) فقد كان الزمن 4 ساعات كافياً للحصول على اعلى كمية من الفينولات والبروانثوسيانيدينات والفلافونويدات من قشور الرمان بأستخدام خلات الاثيل كمذيب استخلاص.

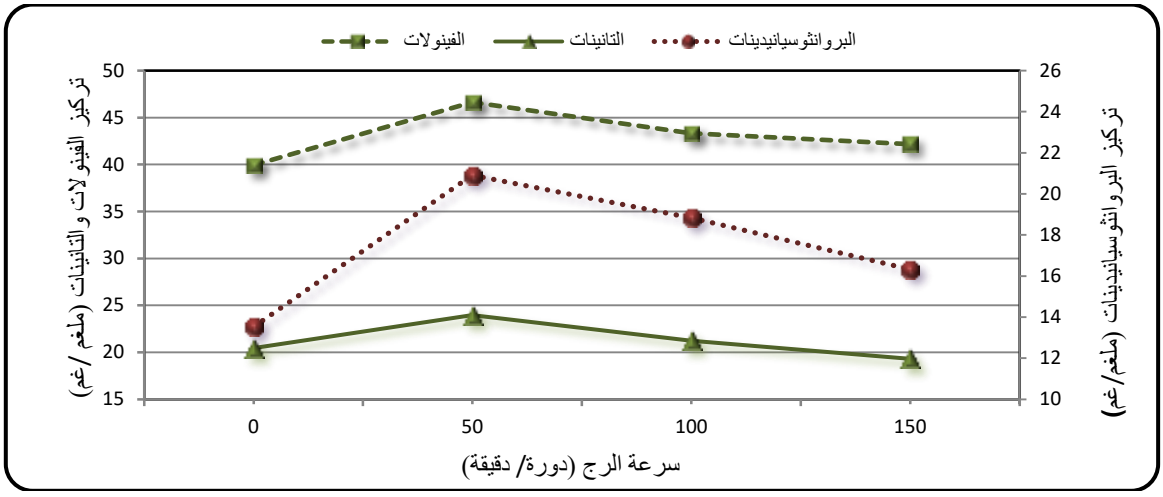
3- تأثير سرعة الرج :-

بلغت اعلى كمية مستخلصة من الفينولات الكلية والبروانثوسيانيدينات في بذور العنب عند سرعة رج 50 دورة/دقيقة بينما بلغت التانينات اقصى تركيز عند سرعة رج 100دورة/دقيقة بتركيز (27.06 و7.7و20.74) ملغم/غم,على التوالي,وكان اقل تركيز للفينولات والتانينات عند الاستخلاص تحت ظروف ساكنة (سرعة الرج = صفر) بتركيز(22.92 و18.45) ملغم/غم وللبروانثوسيانيدينات عند الاستخلاص بسرعة رج 150دورة/دقيقة بتركيز 6.6 ملغم/غم, (الشكل 5).

اما في مستخلص نوى التمر,(الشكل 6),فقد بلغ تركيز كل من الفينولات والتانينات والبروانثوسيانيدينات اقصاه عند الاستخلاص بسرعة رج 50 دورة/دقيقة وبواقع (46.63 و23.94 و20.9) ملغم/غم ,على التوالي,في حين كان اوطأ تركيز للفينولات والبروانثوسيانيدينات عند الاستخلاص بظروف ساكنة وللتانينات عند الاستخلاص بسرعة رج 150 دورة/ دقيقة وبواقع (39.93 و 13.52 و20.43) ملغم/غم ,على التوالي.



الشكل (5):تأثير سرعة الرج في استخلاص الفينولات الكلية والتانينات والبروانثوسيانيدينات من بذورالعنب.



الشكل (6):تأثير سرعة الرج في استخلاص الفينولات الكلية والتانينات والبروانثوسيانيدينات من نوى التمر.

لاتتفق النتائج المستحصلة من هذه الدراسة مع ماأشار اليه (28) الذي تمكن من استخلاص البروانثوسيانيدينات بتراكيز تراوحت بين (862.5-115.6) ملغم/ 100غم لعدد من النباتات بأستخدام سرعة الرج 120دورة/دقيقة,كما لايتفق ايضا مع ماوجده (29) اذ تم استخدام سرعة رج (150) دورة/دقيقة لاستخلاص الفينولات الكلية من زيت المائدة اذ تراوحت تراكيزها بين (29.88-5.58)) ملغم/غم.

استخلصت الفينولات والبروانثوسيانيدينات والفلافونويدات بأستخدام سرعة الرج (500) دورة/دقيقة (Magnatic stirrer) لمدة ساعة عند درجة حرارة الغرفة (21) و بأستخدام سرعة الرج (200) دورة/دقيقة (32) .

4- تأثير نوع المذيب :-

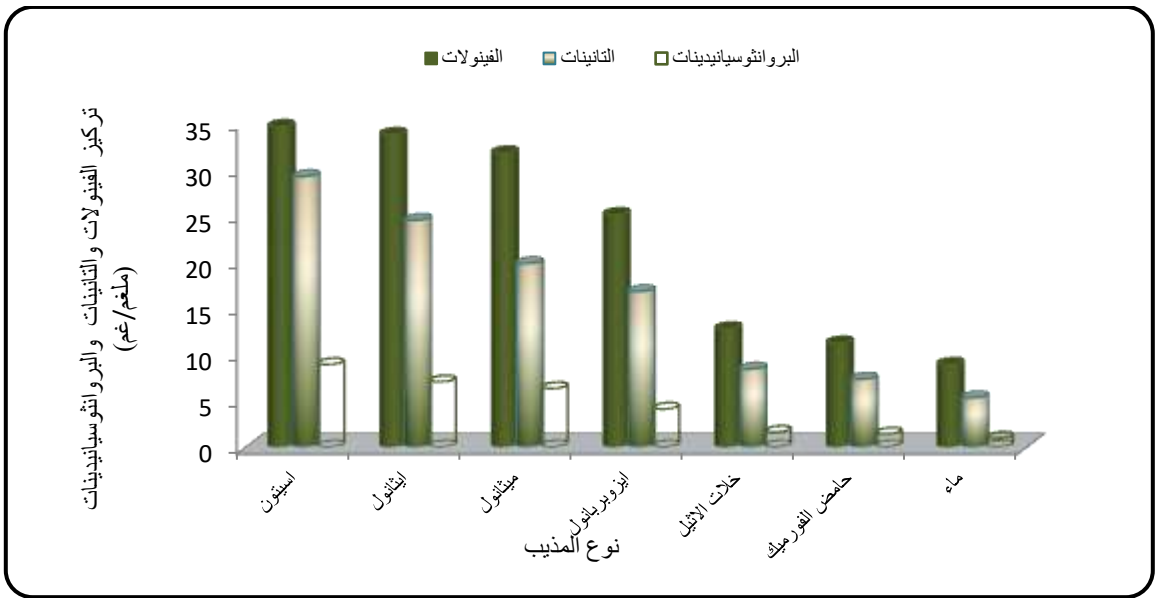
تعد خطوة اختيار مذيب استخلاص النماذج النباتية المعقدة امرا بالغ الاهمية لانها سوف تحدد كمية ونوع المركبات الفينولية المستخلصة (30) اذ ان كفاءة عملية الاستخلاص تعتمد على المذيب والفينول المستخلص (31), لذا تم اختيارعدد من المذيبات

المختلفة القطبية و بتركيز 50% اشتملت على الاسيتون والايثانول والميثانول وخلات الاثيل والايزوبروبانول وحامض الفورميك فضلا عن الماء بغية دراسة تاثيرها في استخلاص الفينولات والتانينات والبروانثوسيانيدينات من بذور العنب ونوى التمر ,وقد تم مزج الماء مع المذيبات لسببين:-

1- تصبح عملية نقل الكتلة بوساطة الانتشار الجزيئي افضل بوجود الماء الذي يسبب زيادة نفاذية النسيج النباتي (32)

2- ان اضافة الماء الى المذيبات العضوية تؤدي الى اضعاف الروابط الهيدروجينية في المحاليل المائية اذ يتميز استخدام المذيبات العضوية المطلقة بأنخفاض ذائبية الفينولات المتعددة والذي يكون ناجما عن تعزيز الروابط الهيدروجينية بين الفينولات المتعددة والبروتينات في تلك المحاليل (33).

يظهر الشكل (7) تشابه الفينولات والتانينات والبروانثوسيانيدينات من حيث قابلية استخلاصها من بذوررالعنب بالمذيبات المختلفة, وقد تفوق الاسيتون على المذيبات المستخدمة في الدراسة في استخلاصه للفينولات والتانينات والبروانثوسيانيدينات اذ بلغت تراكيزها(34.675 و 29.25 و 8.92) ملغم/غم ,على التوالي, يليه الايثانول والميثانول اذ بلغت تراكيز المركبات المدروسة (33.8 و 24.52 و7.05) و(31.82 و19.83و6.32) ملغم/غم ,على التوالي. وابدى المستخلص المائي وحامض الفورميك وخلات الاثيل محتوىً واطئاً من المركبات المذكورة والتي بلغت تراكيزها (8.95 و5.31 و 0.94),(11.25و 7.335و 1.4) و(12.8و8.43 و1.6) ملغم/غم,على التوالي .

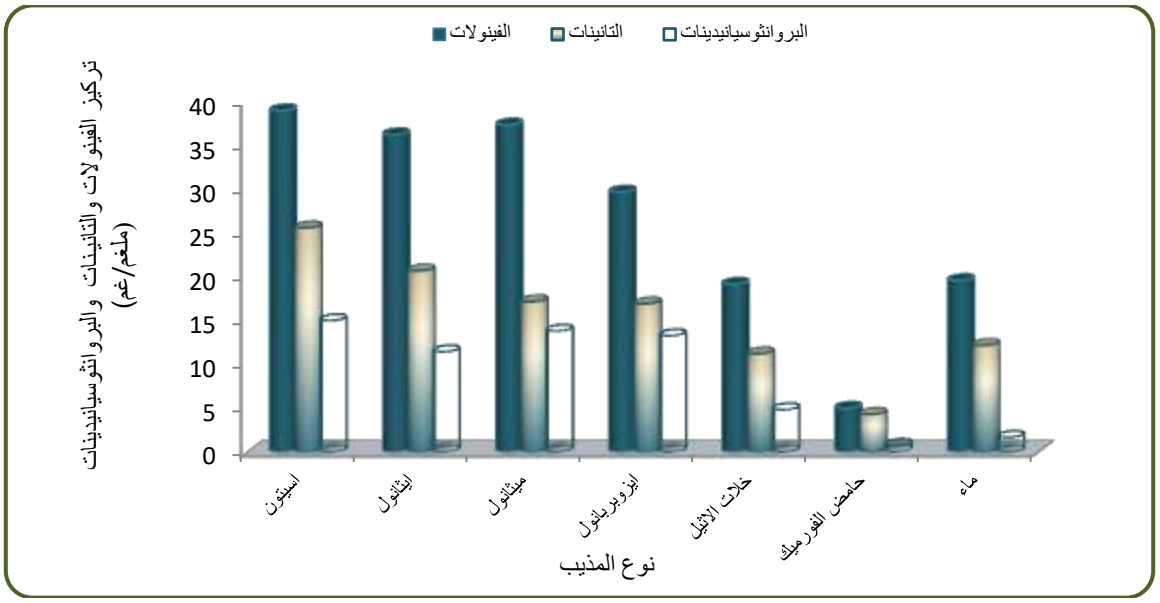


الشكل (7): تأثير نوع المذيب في استخلاص الفينولات والتانينات والبروانثوسيانيدينات من بذورالعنب .

وهذا يتفق مع النتائج المستحصل عليها عند استخلاص البروانثوسيانيدينات من نبات *Radix Sanguisorbae* فقد كان الاسيتون هو المذيب الاكفأ يليه الايثانول ثم الميثانول , وذلك لانتقائية الاسيتون العالية وقابليته القوية على استخلاص البروانثوسيانيدينات (34),كما تفوق الاسيتون على عدد من المذيبات اذ ترتبت كفاءة تلك المذيبات كلآتي الاسيتون ثم خلات الاثيل ثم الميثانول ثم الماء ثم الكلوروفورم ثم الايثر في استخلاص الفينولات والتانينات والفلافونويدات والفلافونول من اوراق نبات *Terminalia chebula* Retz. (35).

يوضح الشكل (16) تفوق مستخلصا الاسيتون والميثانول لنوى التمر من حيث محتواهما من الفينولات والبروانثوسيانيدينات والذين بلغ تركيزهما (38.93 و15.0) و (37.32 و13.8) ملغم/غم ,على التوالي,في حين اظهر مستخلصا الاسيتون والايثانول تفوقهما من حيث محتواهما من التانينات اذ بلغ تركيزهما (25.56 و20.65) ملغم/غم ,على التوالي .

اظهر مستخلص حامض الفورميك لنوى التمر اقل محتوى من الفينولات والتانينات والبروانثوسيانيدينات,في حين تقارب محتوى المستخلص المائي وخلات الاثيل من الفينولات والتانينات.



الشكل (8): تأثير نوع المذيب في استخلاص الفينولات والتانينات والبروانثوسيانيدينات من نوى التمر.

تعزى كفاءة الاسيتون في استخلاص التانينات من النموذجين قيد الدراسة الى قابليته على تثبيط تكوين رواسب بين التانينات والبروتينات (19) كما ان هنالك اعتقاداً قوياًان زيادة الوزن الجزيئي للمذيب, هو انخفاض لقطبيته مما يسمح باستخلاص المواد ذات الاوزان الجزيئية المشابهة والذي يمكن ان يرتبط بمبدأ " الشبيه يذيب شبيهه " او" القطبية مقابل القطبية " (36) كما اشار (37) الى ان سبب تفضيل الاسيتون على الميثانول في استخلاص البروانثوسيانيدينات لقابليته على اذابة المواد المحتوية على البروانثوسيانيدينات غير الذائبة بالميثانول.

يتفق جزء من هذه النتائج مع ماتوصل اليه (38) حيث تفوق الاسيتون80% في استخلاصه للفينولات الكلية من الشاي الاخضر بينما اظهر الماء تفوقه على جميع المذيبات المستخدمة في الدراسة في استخلاصه للكاتكينات.

وفي ضوء ماتقدم يتبين ان المذيبات (الاسيتون ,الايثانول ,الميثانول)اكثر كفاءة من المذيبات (خلات الاثيل ,حامض الفورميك ,ايزوبروبانول) في استخلاص الفينولات والتانينات والبروانثوسيانيدينات من بذور العنب ونوى التمر, وعلى الرغم من قطبية الماء العالية الا ان محتواه من المركبات المدروسة كانت قليلة وقد يعزى السبب في ذلك الى قابلية الماء على استخلاص المركبات الفعالة الذائبة بالماء فقط فضلاعن وجود الشوائب والمواد المتبقية في المستخلصات المائية (39).وهذا يتفق مع النتائج التي حصل عليها (40) اذ تفوق المستخلص الميثانولي لاوراق نبات الشيح *Artemisia annua* L. في محتواه الفينولي على مستخلصات الهكسان وخلات الاثيل والكلوروفورم والماء.

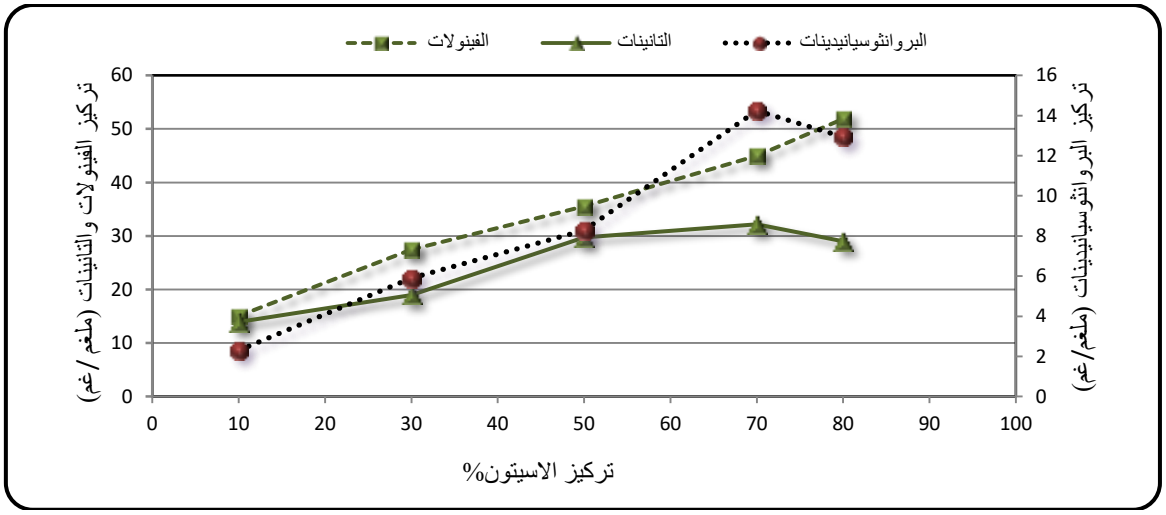
5- تأثير تركيز المذيب:-

نظرا لكفاءة الاسيتون في استخلاص المركبات المدروسة من بذور العنب ونوى التمر فقد تم دراسة كفاءة التراكيز المختلفة لهذا المذيب في استخلاص المركبات المدروسة من المستخلصين قيد الدراسة.

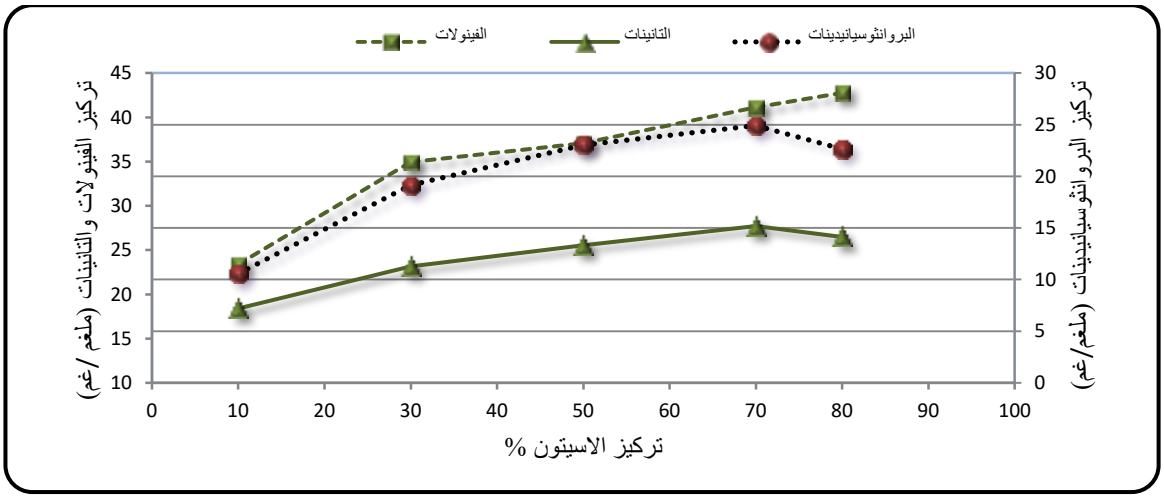
يتبين من الشكلين 10 و11 ان اعلى تركيز للتانينات والبروانثوسيانيدينات المستخلصين من بذورالعنب ونوى التمرتم الحصول عليه بأستخدام الاسيتون 70% اذ بلغ تركيزهما (32.22 و14.25) و(27.72 و 24.94) ملغم/غم ,على التوالي, بينما يلاحظ ان تركيز الفينولات يزداد بزيادة تركيز الاسيتون اذ بلغ (51.88 و42.78) ملغم/غم عند التركيز80%,على التوالي.

في دراسة شملت استخدام تراكيز مختلفة من الاسيتون والايثانول ابدت التراكيز 50-70% للاسيتون و50% للايثانول كفاءة عالية لاستخلاص التانينات من جلد ثمار العنب (Grape skin) (41) في حين ابدى كل من الاسيتون 30% والايثانول 30% كفائته في استخلاص الفينولات من اوراق المريمية (42).

ان اضافة الماء الى الاسيتون بنسب مختلفة ماهوالا تعديل لقطبية المذيب الكحولي واذا ماتحقق ذلك, فأن مثل هذه الانظمة تكون قادرة على استخلاص المواد الفينولية من طرفي القطبية (المواد عالية القطبية والواطئة القطبية) فضلا عن المواد المتوسطة القطبية (43).



الشكل(9):تأثير تركيز الاسيتون في استخلاص الفينولات الكلية والتانينات والبروانثوسيانيدينات من بذور العنب



الشكل(10):تأثير تركيز الاسيتون في استخلاص الفينولات الكلية والتانينات والبروانثوسيانيدينات من نوى التمر.

المصادر:-

1-Najafi,M.B.H.(2011). Date Seeds: A Novel and Inexpensive Source of DietaryFiber.International Conference on Food Engineering and Biotechnology IPCBEE vol.9 .

2-Pinelo,M.;Rubilar,M.;Jerez,M.;Sineiro,J. and Núñez,M.J.(2005). Effect of Solvent, Temperature, and Solvent-to-Solid Ratio onthe Total Phenolic Content and Antiradical Activity of Extracts from Different Components of Grape Pomace. J. Agric. Food Chem.53, 2111-2117.

3-Kähkönen, M.P.; Hopia, A.I.; Vuorela, H.J.; Rauha, J.P.; Pihlaja, K.; Kujala, T.S and Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds . J. Agric. Food Chem. Vol.47, No.10,pp. 3954 – 3962 .

4-Luthar, Z. (1992). Polyphenol classification and tannin content of buckwheat seed (Fagopyrum esculentum Moench). Fagopyrum 12 : 36 – 4.

5-Smith, E.C. and Swein,T.(1962).Flavonoid compounds. In: Comparative Biochemistry. Eds. H. S.Mason, A.M. Florkin, Academic Press New York (USA), pp. 755–809.Cited from (Amarowicz, P. ,Tannins: the new natural antioxidants? Eur. J. Lipid Sci.Technol. 109 (2007) 549–551).

6-Cos,P.;De Bruyne,T.;Hermans,N.;Apers,S.;Vanden Berghe,D. and

Vlietinck,A.J.(2003)Proanthocyanidins in Health Care:Current and New Trends.Curre .Current Medicinal Chemistry, 10,1345- 1359.

7-Rapport,L.and Lockwood B.(2001).Proanthocyanidins and grape seed extract.(Article).the pharmaceutical journal (vol 266).

8-Kylli,P.(2011). Berry phenolics:isolation,analysis, identification,and antioxidant Properties. University of Helsinki, Department of Food and Environmental Sciences, Food Chemistry.

9-Ahmed, I. ;Mehmood, Z. and Mohammad, F. (1998). Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobial properities .J. Ethnopharmacol .62: 183-193 .

10-Sun,B.;Ricardo-da-Silva,J.M. and Spranger,I.(1998). Critical Factors of Vanillin Assay for Catechins and Proanthocyanidins. J. Agric. Food Chem. 46, 4267-4274.

11-Khomdram,S.D. and Singh,P.K.(2011). Polyphenolic Compounds and Free Radical Scavenging Activity in Eight Lamiaceae Herbs of Manipur. Not Sci Biol, 3(2):108-113.

12-Budrat, P. and Shotipruk, A. (2008). Extraction of phenolic compounds from fruits of Bitter Melon (Momordica charantia) with subcritical water extraction and antioxidant activities of these extracts. Chiang Mai J. Sci. 35(1): 123-130

13-Dai, J.; and Mumper,R.J.(2010). Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties(Review). Molecules , 15, 7313-7352;
doi:10.3390/molecules15107313.

14-Kim,D. and Lee,C.Y.(2002).Extraction and Isolation of Polyphenolics. Current protocols in Food Analytical Chemistry , I1.2.1- I1.2.12.

15-Lokeswari,N. and Sujatha,P.(2011).Isolation of tannins from Caesalpini Coriaria and effect of physical parameters.IRJP 2(2) 146-152 .

16-Bharathi,V.; Patterson ,J.and Rajendiran,R.(2011). Optimization of Extraction of Phenolic Compounds from Avicennia marina (Forssk.) Vierh using Response Surface Methodology.International Journal of Biological and Medical Sciences 1:1.

17-Yang,L.; Jiang,J.G.;Li,W.F.;Chen,J.;Wang,D.Y. and Zhu,L. (2009). Optimum extraction Process of polyphenols from the bark of Phyllanthus emblica L. based on the response surface methodology.J. Sep. Sci. 32, 1437 – 1444.

18-Galanakis,C.M.; Tornberg,E. and Gekas,V.(2010). Recovery and preservation of phenols from olive waste in ethanolic extracts. J Chem Technol Biotechnol ; 85: 1148–1155.

19-Uma, D.B.; Ho, C.W. and Wan Aida, W.M. (2010). Optimization of Extraction Parameters of Total Phenolic Compounds from (Lawsonia inermis) Leaves. Sains Malaysiana 39(1) : 119–128.

20-Moosophin,K.;Wetthaisong,T.;Seeratchakot,L. and Kokluecha,W.(2010). Tannin Extraction from Mangosteen Peel for Protein Precipitation in Wine. KKU Res J 15 (5).

21-Bucić-Kojić,A.;Planinić,M.;Tomas,S.; Jokić,S.;Mujić,I.;Bilić,M. and Velić,V.(2011).Effect of Extraction Conditios on the Extractability of Phenolic Compounds from Lyophilised Fig Fruits (Ficus Carica L.). Pol. J. Food Nutr. Sci., Vol. 61, No. 3, pp.195-199.

22-Silva, E. M., Rogez, H. and Larondelle, Y.2007. Optimization of extraction of phenolics from Inga edulis leaves using response surface methodology. Separation and Purification Technology
55: 381-387.Cited from (Thoo et al.,2010).

23-Chan, S. W.;Lee, C. Y.;Yap, C. F.;Wan Aida, W. M. and Ho, C. W.(2009). Optimisation of extraction conditions for phenolic compounds from limau purut (Citrus hystrix) peels. International Food Research Journal 16: 203-213 .

24-Chew, K. K., Ng, S. Y.,Thoo, Y. Y., Khoo, M. Z., Wan Aida, W. M. and Ho, C. W. (2011). Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of Centella asiatica extracts.International Food Research Journal 18: 571-578 .

25-Shad,M.A.; Nawaz,H.; Rehman,T.; Ahmad,H.B. and Hussain,M. (2012).Optimization of extraction efficiency of tannins from Cichorium intybus L.: Application of response surface methodology. Journal of Medicinal Plants Research Vol.6 (28), pp.4467-4474.

26-Wang,Z.;Pan,Z.;Ma,H. and Atungulu, G.G.(2011). Extract of Phenolics From Pomegranate Peels. The O pen Food Science , 5,17-25.
27-Hosseinian, F.S. and Mazza,G. (2009). Triticale bran and straw: Potential new sources of phenolic acids,proanthocyanidins, and lignans. Journal of Functional Foods I, 57-64 .
28-Sousa,A.;Ferreira, I.C.F.R.;Barros,L.;Bento,A. and Pereira.J.A. (2008). Effect of solvent and extraction temperatures on the antioxidant potential of traditional stoned table olives ''alcaparras''.LWT 41, 739–745.
29-Apetrei,C.L.;Tuchilus,C.;Aprotosoaie,A.C.;Oprea,A.;Malterud,K.E.and Miron,A.(2011).Chemical, Antioxidant and Antimicrobial Investigations of Pinus cembra L. Bark and Needles. Molecules ,16,7773-7788;doi:10.3390/molecules 16097773.
30-Hismath, I., Wan Aida, W. M. and Ho, C.W (2011). Optimization of extraction conditions for phenolic compounds from neem(Azadirachta indica) leaves. International Food Research Journal 18(3): 931-939 .
31-Jakopič,J.;Veberič,R. and Štampar,F.(2009). Extraction of phenolic compounds from green walnut fruits in different solvents. Acta agriculturae Slovenica, 93 - 1,maj ,DOI: 10.2478/v10014- 009-0002-4.
32-Jayaprakasha,G.K. ;Singh,P.R. and Sakariah,K.K.(2001).Antioxidant activity of grape seed (Vitis vinifera) extract on peroxidation models in vitro.Food Chemistry 73 , 285-290.
33-Wissam,Z.;Ghada,B.;Wassim,A. and Warid,K.(2012).Effective Extraction of Polyphenols and Proanthocyanidins from Pomegrante's peel. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. ISSN- 0975-1491 Vol 4, Suppl 3.
34-China Papers, Extraction ,Separation and in Vitro Antioxidative Effects of Proanthocyanidins in Radix Sanguisorbae.http://mt.china- papers.com/2/?p=48823 .
35-Kathirvel, A. and Sujatha,V.(2012). In vitro assessment of antioxidant and antibacterial properties of Terminalia chebula Retz. leaves Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine ,S788-S795.
36-Hagerman,A.E. and Robbins,C.T.(1987). Implications of soluble tannin protein complexes for tannin analysis and plant defense mechanisms.Journal of Chemical Ecology, Vol.13,No. 5.
37-Kennedy, J. A. (2002) . Proanthocyanidins : Extraction , Purification , and Determination of Subunit Composition by HPLC(2002). Current Protocols in Food Analytical Chemistry , I1.4.1-I1.4.11.
38-Drużyńska,B.; Stepniewska,A. and Wołosiak,R.(2007).The influence of time and type of solvent on efficiency of the extraction of polyphenols from green tea and antioxidant properties obtained extracts. Acta Sci. Pol., Technol. Aliment. 6(1), 27-36 .
39-Mohammedi,Z. and Atik,F.(2011).Impact of solvent extraction type on total polyphenols content and biological activity from Tamarix aphylia (L.) karst.International Journal of Pharma Bio Sciences,Vol2/Issue 1.
40-Iqbal,S.;Younas,U.; Wei Chan,K.;Zia-Ul-Haq ,M. and Ismail,M.(2012). Chemical Composition of Artemisia annua L. Leaves and Antioxidant Potential of Extracts as a Function of Extraction Solvents. Molecules , 17, 6020-6032; doi:10.3390 / molecules 17056020.
41-Downey,M.O. and HanlinR.L.(2010). Comparison of Ethanol and Acetone Mixtures for Extraction of Condensed Tannin from Grape Skin. S.Afr. J. Enol. Vitic., Vol. 31, No. 2.
42-Dent,M.; Dragović-Uzelac,V.; Penić,M.;Brnčić,M.;Bosiljkov,T. and Leva,B.(2012). The Effect of Extraction Solvents, Temperature and Time on the Composition and Mass Fraction of Polyphenols of Dalmatian Wild Sage (Salvia officinalis L.). Faculty of Food Technology and Biotechnology, Pierottijeva 6, HR-10 000 Zagreb, Croatia.
43-Zhang, Z-S., Li, D., Wang, L.J., Ozkan, N., Chen, X.D., Mao, Z-H.and Yang,H-Z. 2007.Optimisation of ethanol-water extraction of lignans from flaxseed. Journal of Separation and Purification Technology 57: 17-24.Cited from Uma et al.(2010).