Determination the optimal conditions for extraction flavonoids and total phenols from green tea leaves and evaluate their antioxidant activity

تحديد الظروف المثلى لاستخلاص الفلافونويدات و الفينولات الكلية من اوراق الشاي الاخضر و تقييم فعلها المضاد للاكسدة

*م.م.زهراء رحيم مرشدي
كلية العلوم/جامعة كربلاء

أ.م.د.وفاء صادق الوزني
كلية العلوم/جامعة كربلاء

أ.م.د.علي عبد الكاظم الغانمي
كلية العلوم/جامعة كربلاء

*البحث مستل من اطروحة ماجستير

الملخص

تضمنت هذه الدراسة تحديد الظروف المثلى لاستخلاص الفلافونويدات و الفينولات الكلية و فعلها المضاد للاكسدة من أوراق الشاي الأخضر وأظهرت النتائج ان الكحول الاثيلي بتركيز (80 ، 80 ،30)% و الكحول المثيلي بتركيز (70 ،70 ، 10)% هي الافضل لاستخلاص الفلافونويدات و الفينولات الكلية و مضادات الاكسدة على التوالي ،اما الاسيتون فقد اعطى التركيزين (70 ، 50) % افضل النتائج لاستخلاص الفلافونويدات و الفينولات الكلية على التوالي ، فيما تساوت التراكيز في استخلاص المواد المضادة للاكسدة .

كما تبين ان مدة الاستخلاص المثلى لاستخلاص الفلافونويدات كانت في اقصاها بعد 36 ساعة ، بينما كانت 24 ساعة هي الافضل لاستخلاص الفينولات الكلية و المواد المضادة للاكسدة .

Abstract :

This study included the extraction of flavonoids , total phenols and antioxidant from green tea leaves and extract . The result revealed the This study included determining the optimal conditions for extracting flavonoids and total phenols and antioxidants from green tea leaves and the results showed that the ethyl alcohol concentration (80 ,80, 30)% and methanolic alcohol concentration (70,70, 10)% is the favorable for extraction flavonoids and total phenols and antioxidants respectively, while acetone concentrations (70,50%) gave the optimal results to extract flavonoids and total phenols respectively, while all concentrations was equal to extract antioxidants.

It turns out that the optimal extraction time to extract flavonoids was at a maximum after 36 hours, while 24 hours is best for the extracting total phenols and antioxidants

المقدمة:

تعد الجذور الحرة (Free Radicals) جزيئات فعالة جداً و لكنها غير مستقرة لذا تسبب مشاكل صحية عدة للإنسان لعل في مقدمتها امراض السرطان (Cancer) و تصلب الشرايين (Atherosclerosis) و التهاب المعدة (Gastritis) و امراض القلب (Cardiovascular) و الشيخوخة (Ageing) كما نال المجال الغذائي نصيبه من اضرار تلك الجذور كونها المسؤولة عن اكسدة الدهون وما يترتب على ذلك من خسائر كبيرة في التصنيع الغذائي من خلال اثارها السلبية على الطعم والنكهة واللون والقيمة الغذائية والثبات الخزني للدهون (1) على الرغم من استخدام مضادات الاكسدة الصناعية (Synthetic antioxidants) الا إن استخدامها بدأ يقترن بظهور بعض التأثيرات السمية والسرطانية فضلا عن ذائبيتها القليلة وامتلاكها لفعالية مضادة متوسطة (Moderate activity) (2) لذا فقد تنامى البحث في السنوات الاخيرة عن مضادات اكسدة بديلة تكون طبيعية وأمينة .

تعد النباتات مصدرا لاينضب من مضادات الاكسدة الطبيعية نظرا لاحتوائها على المركبات الفينولية ، وتعد الاخيرة مواد ايض ثانوي ضرورية لنمو وتكاثر النبات ، تنتشر بشكل واسع في المملكة النباتية وتظهر فعاليات حياتية متنوعة تتمثل بفعلها المضاد للاكسدة والمضاد للتطفير والمضاد للاورام (3). و تصنف الفلافونويدات (Flavonoids) بانها المركبات الفينولية الاكثر تواجداً في الطبيعة إذ تمثل حوالي (5-10)% من مواد الايض الثانوي النباتية وتتركز في البذور و بشرة الثمرة والقشور والقلف والازهاربحظيت الفلافونويدات بأهتمام بالغ نظراً لتعدد خصائصها المفيدة و المتمثلة بفعاليتها المضادة للاكسدة (Antioxidant) وقابليتها على ربط المعادن وتحفيزها للنظام المناعي وفعلها المضاد للبكتريا والمضاد للتسرطن والمضاد للفايروسات والمضاد للالتهابات (4).

ونظرا للأهمية الكبيرة للفلافونويدات بوصفها مضادات اكسدة طبيعية لذا فقد هدفت هذه الدراسة الى تحديد المذيب و مدة الاستخلاص الافضل لاستخلاص الفينولات الكلية والفلافونويدات و فعلها المضاد للاكسدة في النبات المنتخب .

المواد و طرائق العمل :

1. **النبات المستخدم في الدراسة** استخدمت اوراق الشاي الاخضر في استخلاص الفلافونويدات و الفينولات الكلية علما بان النبات تم اثر عملية غربلة جرت في دراسة سابقة (5) .
2. **تهيئة النبات للدراسة** :نظفت اوراق الشاي الاخضر المستخدمة في هذه الدراسة بماء الحنفية ثم جففت في الجو العادي لمدة 24 ساعة و طحنت بعد ذلك عدة مرات لحين الحصول على مسحوق ناعم من كل جزء نباتي .
3. **استخلاص المواد الفينولية** :استخدمت الطريقة الموصوفة من قبل (6) في استخلاص المواد الفينولية من النبات قيد الدراسة.
4. **تقدير الفلافونويدات** :قدرت كمية الفلافونويدات خلال جميع مراحل الدراسة باتباع الطريقة الموصوفة من قبل (7) .
5. **تقدير المحتوى الفينولي الكلي** : تم تقدير المحتوى الفينولي الكلي لمستخلص اوراق الشاي الاخضر بحسب الطريقة الموصوفة من قبل (3) .
6. **تقدير الفعالية المضادة للاكسدة** : تم تقدير الفعالية المضادة للاكسدة حسب الطريقة الموصوفة من قبل (8) .
7. **تحديد الظروف المثلى لاستخلاص الفلافونويدات و الفينولات الكلية من اوراق الشاي الاخضر** : تمت دراسة العديد من العوامل لغرض تحديد الظروف المثلى لاستخلاص الفلافونويدات من النبات قيد الدراسة اشتملت على :
نوع المذيب و تركيزه :استخدمت مذيبات مختلفة للاستخلاص اشتملت على الكحول الاثيلي و المثيلي و الاسيتون فضلا عن الماء المقطر . حيث تم استخدام تراكيز عدة من المذيبات الثلاثة الاولى هي (10 ،30 ، 50 ، 70 ، 80) %و اجريت عملية الاستخلاص وفق الطريقة المشار اليها سابقا و بعد الحصول على المستخلص الجاف بشكله النهائي تم تقدير الفلافونويدات و المحتوى الفينولي الكلي .
8. **تحديد مدة الاستخلاص المثلى** : تم دراسة تأثير مدة الاستخلاص في استخلاص الفلافونويدات من اوراق الشاي الاخضر اذ تمت متابعة عملية الاستخلاص خلال (6 و 12 و 24 و 36 و 48) ساعة , و بعد إتمام عملية الاستخلاص و الترشيح و تجفيف النماذج , قدرت الفلافونويدات و المحتوى الفينولي الكلي و الفعالية المضادة للأكسدة بالطرائق الموصوفة سابقا .

النتائج و المناقشة:

نوع المذيب وتركيزه :-

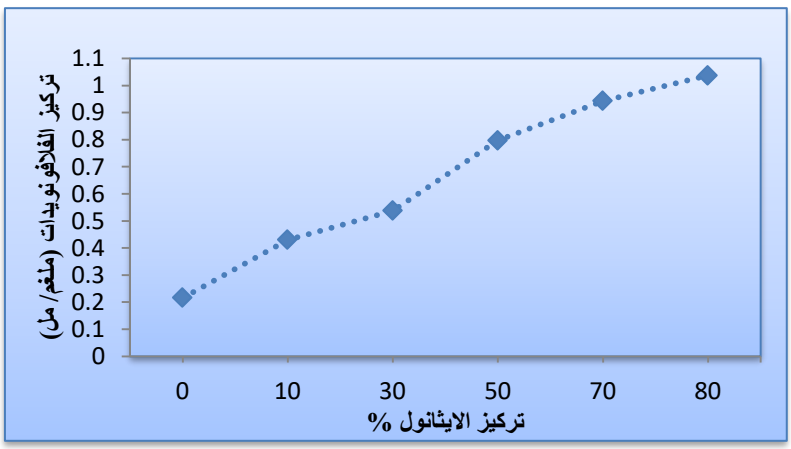
استخدمت أربعة مذيبات بتراكيز مختلفة في استخلاص الفلافونويدات و الفينولات الكلية و مضادات الاكسدة من أوراق الشاي الاخضر. تعتمد دقة طريقة الاستخلاص على قوام المادة النباتية و محتواها المائي و نوع المادة المراد عزلها (9) .

1- الاستخلاص بوساطة الكحول الاثيلي :

يتضح من الشكل (1) أن تركيز الفلافونويدات من أوراق الشاي الاخضر يزداد بازدياد تركيز الكحول الاثيلي , إذ بلغ عند التركيز 80% ايثانول 1.037 ملغم/مل .

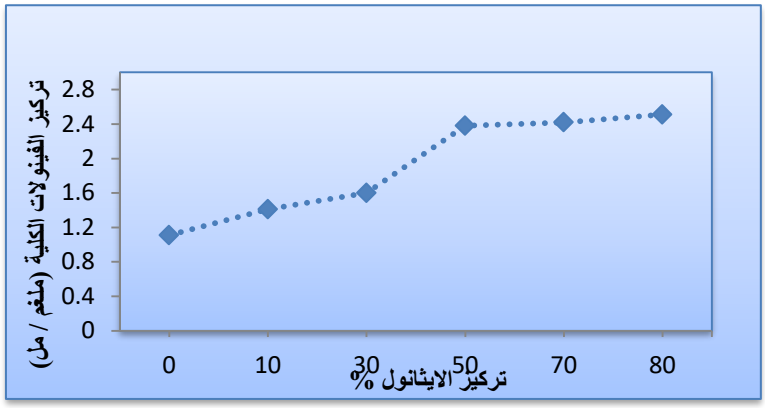
أما الفينولات الكلية فقد حذت حذو الفلافونويدات , إذ بلغ تركيزها (2.51) ملغم/مل باستخدام تركيز الكحول الاثيلي (80)% لمستخلص الشاي الاخضر, (الشكل 2) . و بلغت الفعالية المضادة للاكسدة أقصاها في أوراق الشاي الاخضر عند استخلاصه بـ 30% ايثانول , و ذلك عند التركيز 0.01 ملغم/مل الشكل (3 B و C).

يتضح من النتائج الكفاءة العالية للاستخلاص بالكحولات المائية و الذي يمكن أن يعزى الى طبيعة الفينولات الذائبة في الماء التي تزداد قابلية ذوبانها بوجود المذيبات العضوية إذ تعمل الأخيرة على تسهيل ذوبان الفينولات من خلال اختراقها لتركيب الخلية النباتية (10) .



شكل (1): استخلاص الفلافونويدات من أوراق الشاي الأخضر باستخدام الكحول الاثيلي

.



شكل (2) :كمية الفينولات المستخلصة الكلية من أوراق الشاي الأخضر باستخدام الكحول الاثيلي.

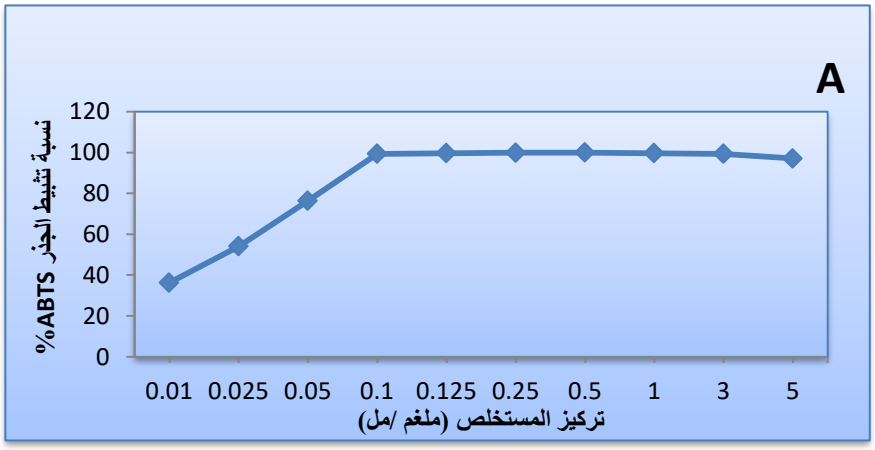
إن استخدام المحاليل الكحولية يعطي نتائج مرضية لعملية الاستخلاص (11)، كما ان الفينولات الموجودة في النباتات هي خليط من اصناف عدة من الفينولات و التي تختلف في قابليتها على الذوبان في المذيبات المختلفة لذا فأن مزيج الكحول و الماء يكون ذا فائدة في تغيير قطبية المذيبات الكحولية فضلا عن ان ذوبان الفينولات يعتمد بصورة رئيسة على مجاميع الهيدروكسيل ، و الحجم الجزيئي و طول الهيدروكربون (12).

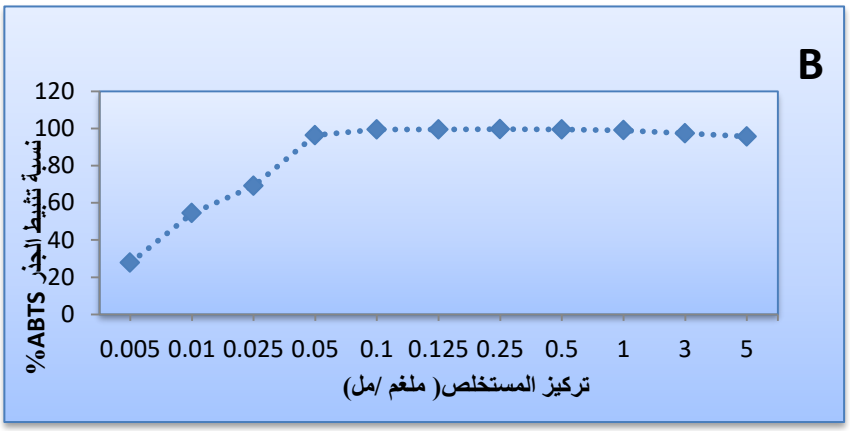
أما الكحول الاثيلي النقي فأن استخدامه يؤدي الى اختزال كفاءة عملية استخلاص الفينولات بسبب وجود مجاميع الهيدروكسيل (مثل الفلافونويدات وخصوصا الحاوية منها على سكريات في الجزيئة) أي كونها محبة للماء (Hydrophillic) و لهذا السبب فهي تذوب عند اضافة الماء الى الكحول الاثيلي (13).

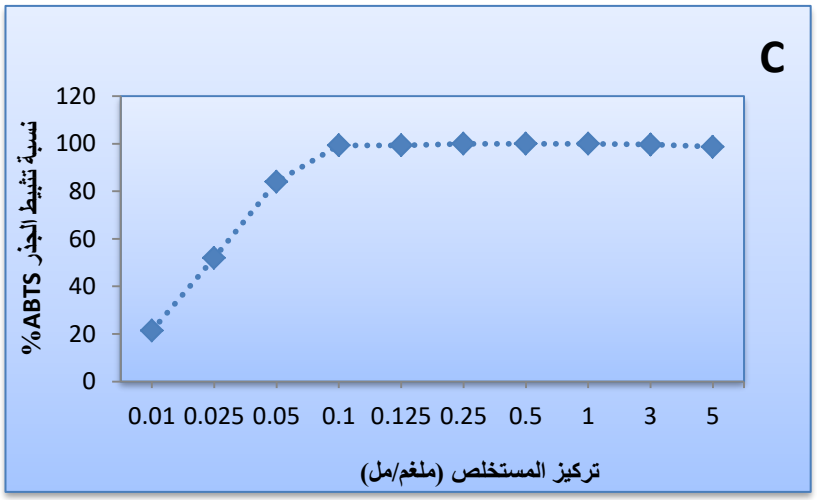
و فضلا عما سبق فأن المركبات الفينولية في المستخلص غالباً ما تكون مرتبطة بالجزيئات الاخرى مثل (البروتينات و السكريات المتعددة و التربينات و الكلوروفيل و الدهون و المركبات غير العضوية الاخرى) (14) و ربما كان الكحول الاثيلي كفؤاً في استخلاصها من اوراق الشاي الاخضر في الدراسة الحالية.

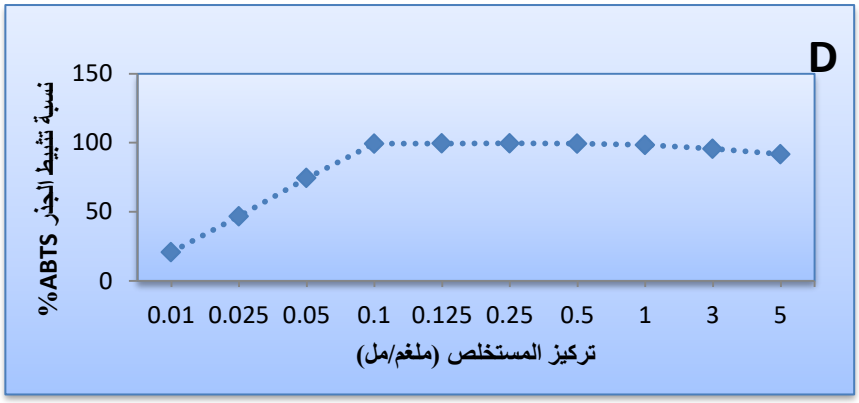
اشارت العديد من الدراسات الى كفاءة الكحول الاثيلي في استخلاص الفلافونويدات و الفينولات الكلية من المصادر النباتية فقد وجد (15) أن افضل تركيز لاستخلاص الفلافونويدات من نبات *Opuntia milpa alta* كان 80% ايثانول , و أوضحت هذه الدراسة إن زيادة تركيز الكحول الاثيلي الى 90% يؤدي الى انخفاض تركيز الفلافونويدات. و اوضح (13) ان استخدام الكحول الاثيلي بتركيز 50% كان الاكفأ في استخلاص الفينولات من فول الصويا .

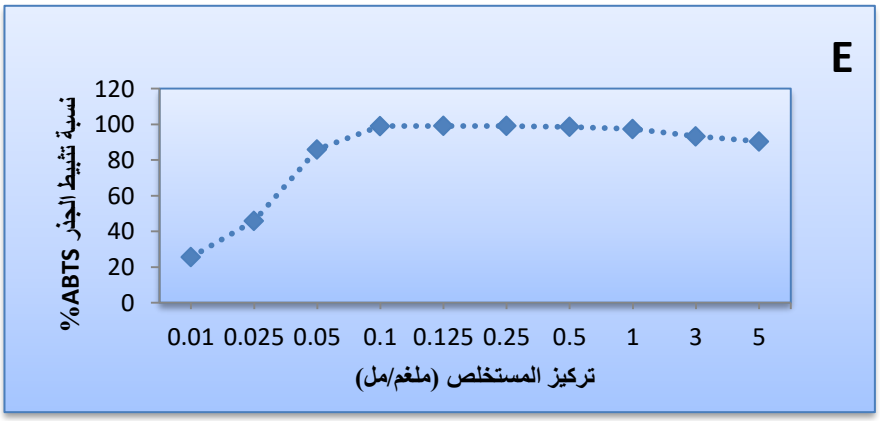
يأتي الكحول الاثيلي مباشرة بعد الماء من ناحية سعة استخدامه مذيباً في المختبرات و الصناعات الكيميائية (16) ، و يعد مذيباً مناسباً لعمليات الاستخلاص و له قابلية امتزاج عالية بالماء. و قد استخدمت محاليل الكحول الاثيلي المائية لانعدام ضررها على البيئة و قلة كلفتها و سميتها مقارنة بالمذيبات الاخرى.









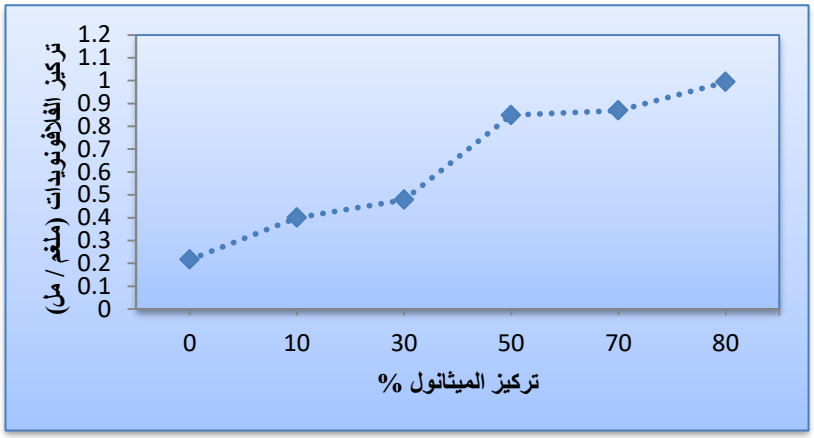


الشكل (3): الفعالية المضادة للأكسدة في المستخلص الكحول الاثيلي للشاي الاخضر:
A- 10% ايثانول , B-30% ايثانول, C– 50% ايثانول , D- 70% ايثانول E– 80% ايثانول.

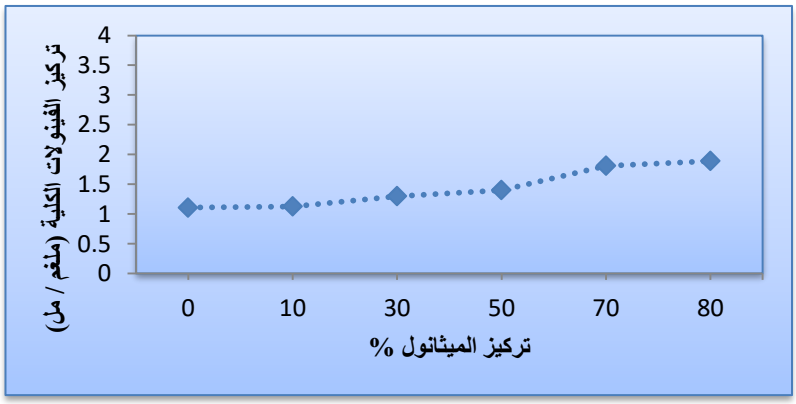
2- الاستخلاص بوساطة الكحول المثيلي :

يعتمد اختيار المذيب على طبيعة المنتوج المراد استخلاصه و أهم متطلبات هذا النوع من الاستخلاص هو استخلاص نسبة عالية من المنتوج في حجم صغير من المذيب (16).

يتضح من الشكلين (4 و 5) أن تركيز الفلافونويدات و الفينولات الكلية من أوراق الشاي الاخضر تزداد بزيادة تركيز الكحول المثيلي حيث بلغ (0.898) ملغم/مل باستخدام 70% ميثانول.



شكل (4) : استخلاص الفلافونويدات من أوراق الشاي الأخضر باستخدام الكحول المثيلي.



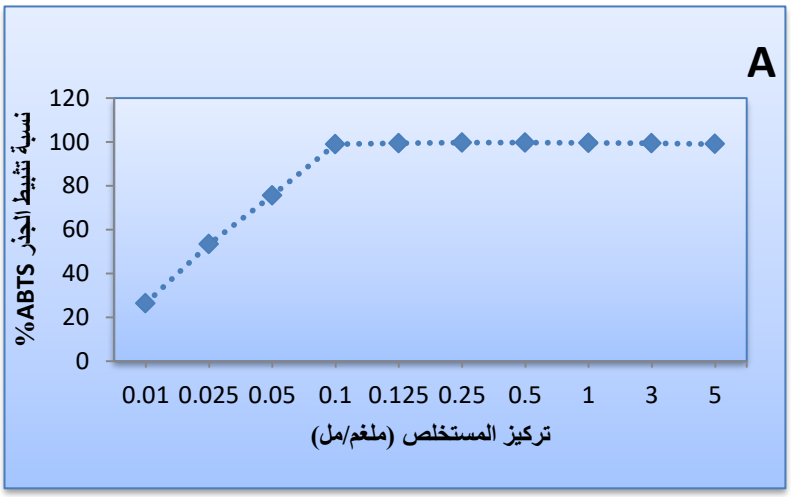
شكل (5) : كمية الفينولات الكلية من أوراق الشاي الأخضر باستخدام الكحول المثيلي.

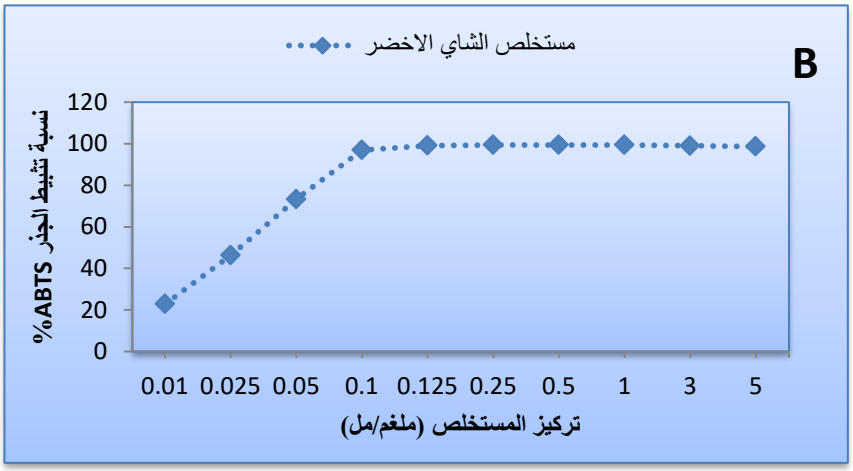
أما المواد المضادة للاكسدة فيلاحظ من الشكل (6) أن أعلى فعالية لها من مستخلص أوراق الشاي الاخضر كانت باستخدام 10% ميثانول اذ كانت اعلى نسبة تثبيط عند التركيز 0.025 ملغم/مل , بينما كانت بقية التراكيز متساوية في نسب التثبيط .

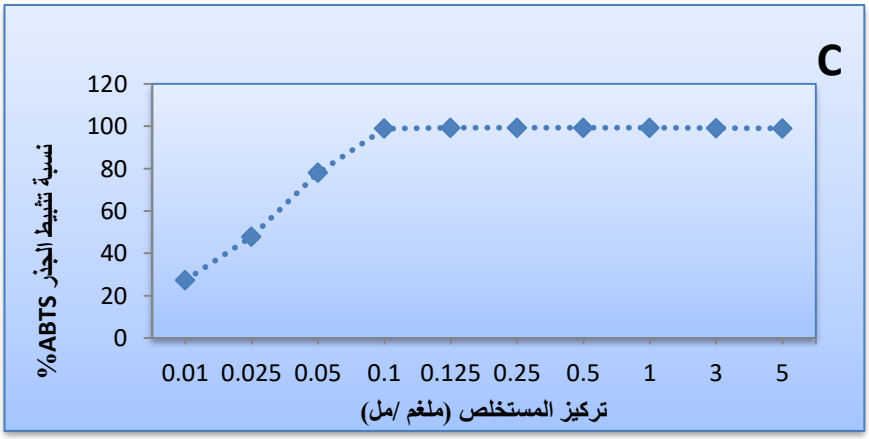
استخدم الكحول المثيلي في العديد من الدراسات المتعلقة باستخلاص الفينولات من النباتات ففي دراسة شملت ستة عشر نباتاً من بينها الشاي الاخضر، اتضح أن المستخلص الكحول المثيلي كان أكفأ من الكحول الاثيلي في استخلاص هذه المواد (17). بينما أدى استخدام الكحول المثيلي 50% الى الحصول على محتوى فينولي واطئ و فعالية مضادة للاكسدة ضعيفة في دراسة شملت 14 ضربا من نوى التمر (18).

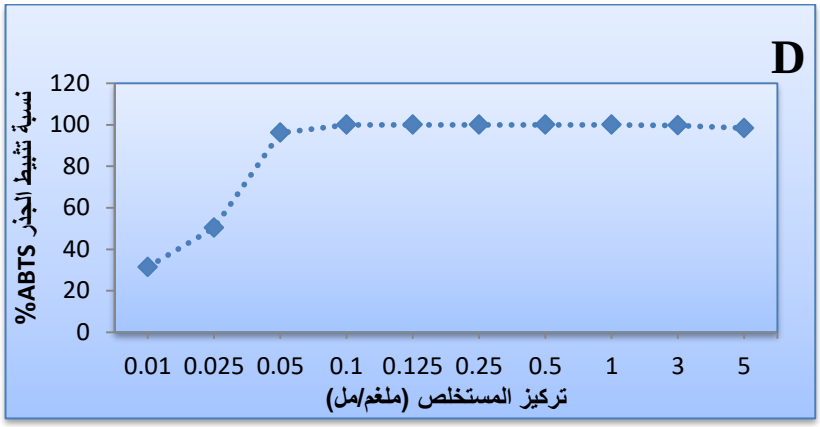
و تمكن (8) من الحصول على فعالية مضادة للاكسدة قوية من نبات *Otostegia persica* باستخدام الكحول المثيلي كمذيب في الاستخلاص .

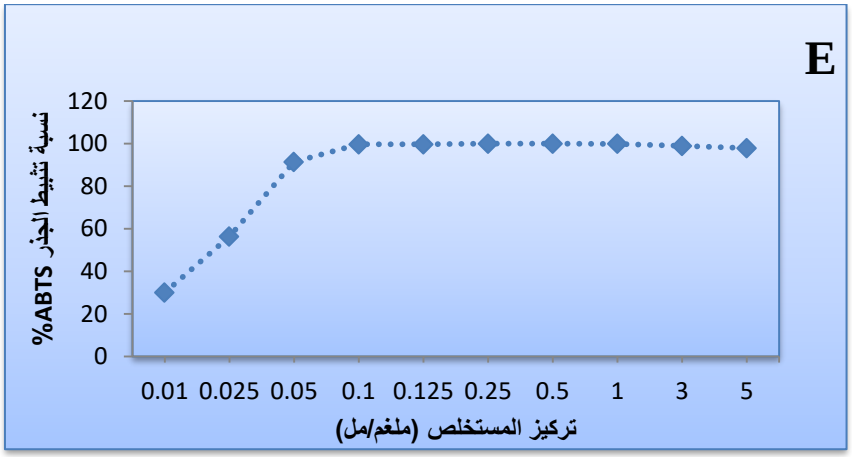
يعد الكحول المثيلي مناسباً لعملية الاستخلاص , اذ يستخدم بشكل كبير على النطاق الصناعي و لا سيما في مجال الصناعات الدوائية , و يمتاز برخص ثمنه فضلا عن أن درجة غليانه 64 مئوية مما يتيح امكانية التخلص منه بسهولة علاوة على امكانية استرجاعه .


A
%ABTS نسبة تثبيط الجذر
120
100
80
60
40
20
0
0.01 0.025 0.05 0.1 0.125 0.25 0.5 1 3 5
تركيز المستخلص (ملغم/مل)


مستخلص الشاي الاخضر
B
%ABTS نسبة تثبيط الجذر
120
100
80
60
40
20
0
0.01 0.025 0.05 0.1 0.125 0.25 0.5 1 3 5
تركيز المستخلص (ملغم/مل)


C
%ABTS نسبة تثبيط الجذر
120
100
80
60
40
20
0
0.01 0.025 0.05 0.1 0.125 0.25 0.5 1 3 5
تركيز المستخلص (ملغم /مل)





الشكل (6): الفعالية المضادة للأكسدة في المستخلص الكحول المثيلي للشاي الاخضر:
A-10% ميثانول, B-30% ميثانول, C- 50% ميثانول, D -70% ميثانول E-80% ميثانول.

3- الاستخلاص بوساطة الاسيتون :

يتبين من الشكل (7) أن أعلى تركيز للفلافونويدات من أوراق الشاي الاخضر تم الحصول عليه باستخدام الاسيتون 70% كمذيب استخلاص , إذ بلغ تركيزها 1.066 ملغم/مل .

بلغ المحتوى الفينولي 2.48 ملغم/مل في أوراق الشاي الاخضر عند استخدام الاسيتون بتركيز 50% (الشكل8) .

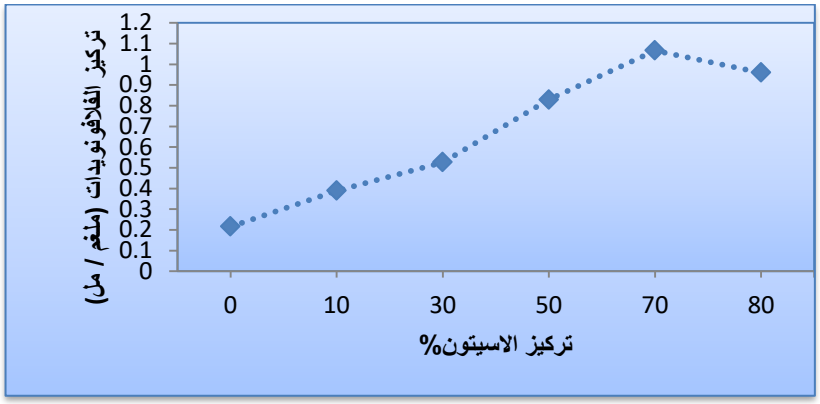
أما الفعالية المضادة للاكسدة فمن الشكل 9 (E-A) يتضح أنه في حالة مستخلص أوراق الشاي الاخضر تساوت التراكيز المستخدمة من الاسيتون في استخلاص المواد المضادة للاكسدة إذ كانت IC_{50} عند التركيز 0.025 ملغم/مل و لكل التراكيز المستخدمة من الاسيتون

أشارت العديد من الدراسات الى استخدام الاسيتون في استخلاص الفينولات فقد اوضح (19) تفوق الاسيتون المائي على الكحول الاثيلي و الكحول المثيلي المائيين في استخلاص الفينولات من قشور نبات *Citrus hystrix* .

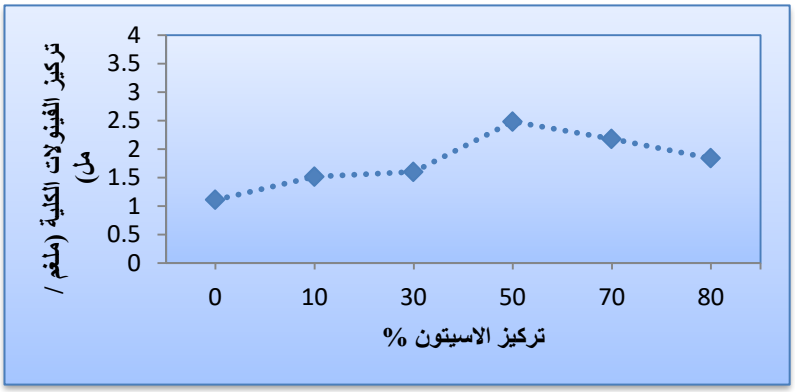
اكد (20) أيضاً تفوق الاسيتون المائي على ثنائي مثيل فورمامايد و الكحول الاثيلي و الكحول المثيلي في الحصول على الفينولات الكلية من الشاي الاسود. و وجد (21) أن افضل تركيز من الاسيتون لاستخلاص الفينولات الكلية من اوراق نبات الحناء *Lawsonia inermis* بلغ 50% .

إن الكحولات المائية (Aqueous alcohols) و خصوصا الاسيتون و الكحول الاثيلي و الكحول المثيلي شائعة الاستخدام في استخلاص الفينولات الكلية من المصادر النباتية (19) .

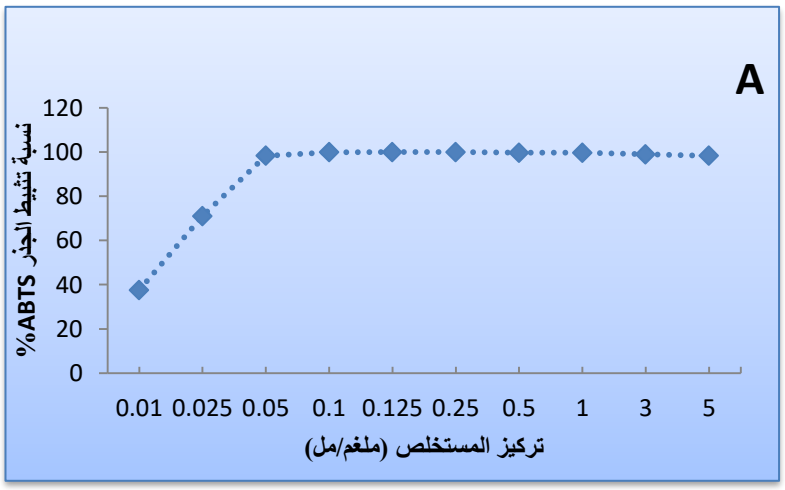
يمتلك الاسيتون العديد من الصفات التي تؤهله للاستخدام كمذيب مناسب منها معدل تبخره العالي و لزوجته الواطئة فضلا عن قابلية امتزاجه مع الماء و العديد من المذيبات العضوية الاخرى . و بسبب امكانية خضوعه لتفاعلات الاضافة (addition) و الاكسدة/الاختزال و التكثيف فأن الاسيتون يستخدم كمادة خام في التصنيع الكيميائي للعديد من المنتجات التجارية .

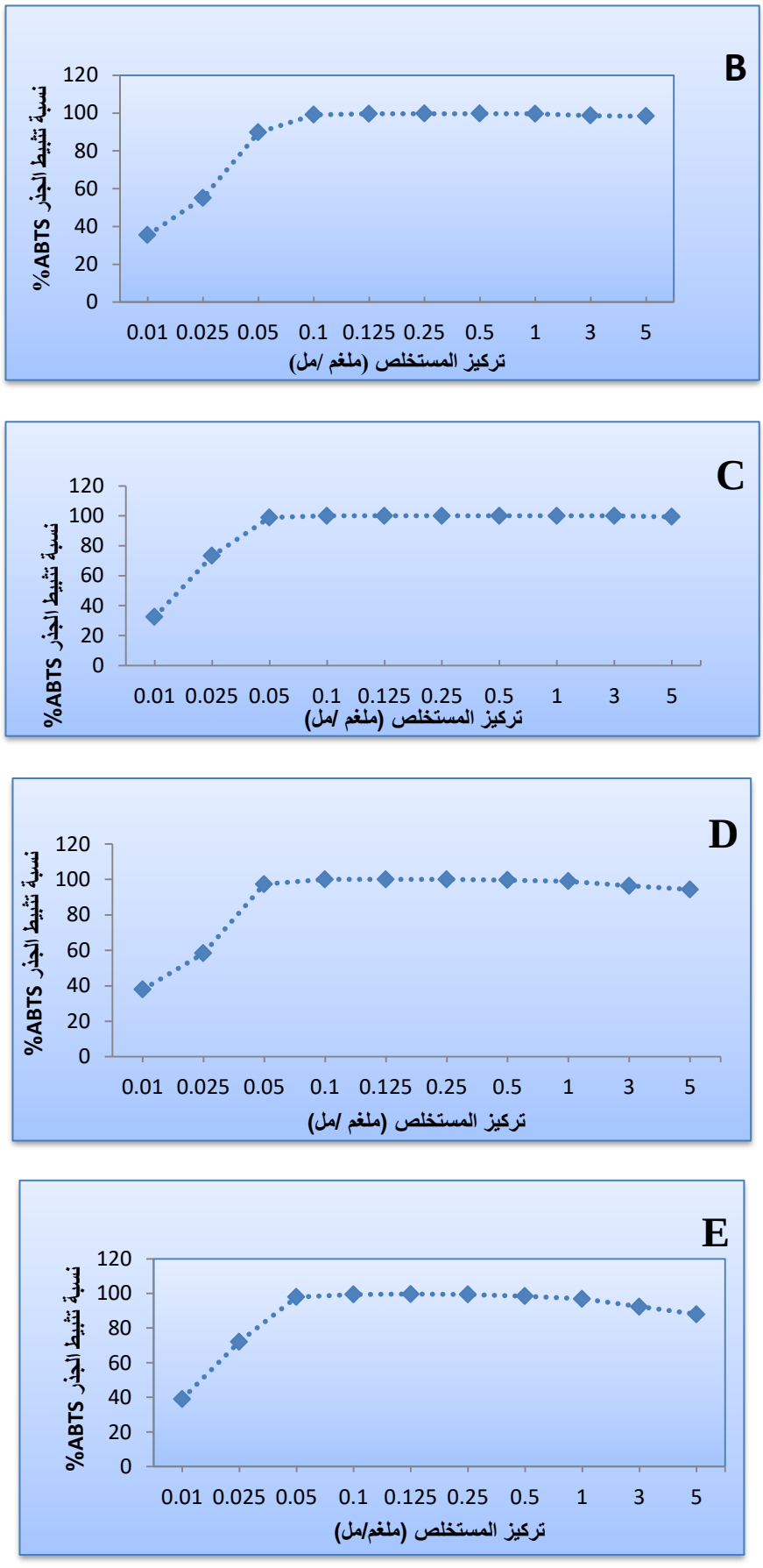


شكل (7) :كمية الفلافونويدات من أوراق الشاي الأخضر باستخدام الاسيتون.



شكل (8) : كمية الفينولات من أوراق الشاي الأخضر باستخدام الاسيتون .





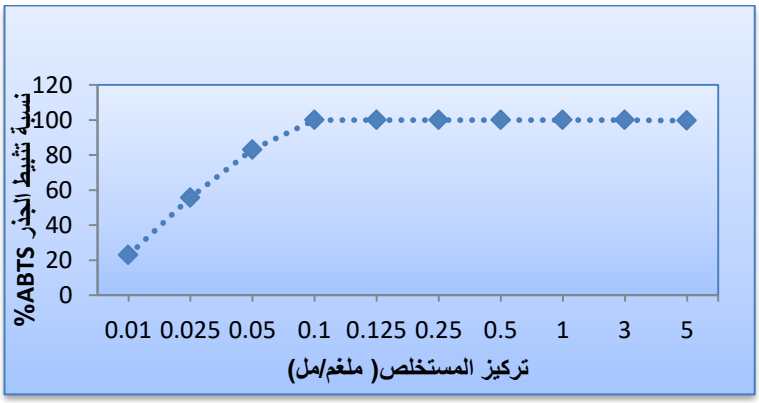
الشكل (9): الفعالية المضادة للأكسدة في المستخلص الاسيتوني للشاي الاخضر:-
A -10% اسيتون , B-30% اسيتون, C -50% اسيتون, D -70% اسيتون, E-80% اسيتون .

4 - الاستخلاص بوساطة الماء :

تبين النتائج المتحصل عليها من هذه الدراسة أن قيم الفلافونويدات و الفينولات الكلية قد بلغت [(0.216) و (1.108)] ملغم/مل عند استخدام الماء في استخلاصها من اوراق الشاي الاخضر. كما تبين النتائج المتحصل عليها من الشكل (10) أن الفعالية المضادة للاكسدة كانت عند التركيزين (0.025 و) ملغم/مل للمستخلص اعلاه . وبالرجوع الى النتائج السابقة المتعلقة باستخدام التراكيز المختلفة من الكحول المثيلي والكحول الاثيلي و الاسيتون في استخلاص الفلافونويدات والفينولات ومضادات الاكسدة يلاحظ عدم كفاءة الماء في استخلاص المواد المذكورة .

و تتفق نتائج هذه الدراسة مع ما وجده (12) إذ اتضح من نتائج دراستهما أن استخدام الكحولات المائية (الكحول الاثيلي و الكحول المثيلي و الاسيتون) كانت اكفأ من الماء في استخلاص الفينولات الكلية من نبات *Tamarix aphylla* L. . إن قلة المحتوى الفينولي في المستخلص المائي يمكن ان تعزى الى زيادة فعالية انزيمات Polyphenol oxidase التي تحطم المركبات الفينولية بينما يتم تثبيط عمل هذه الانزيمات عند اضافة المذيبات الكحولية (22) .

وفي ضوء نتائج تحديد الظروف المثلى لاستخلاص الفلافونويدات و الفينولات الكلية و مضادات الاكسدة من أوراق الشاي الاخضر التي تم استعراضها تم اختيار الكحول الاثيلي في استخلاص المواد المذكورة اعلاه من النبات قيد الدراسة و بالتركيز(30)% .



الشكل (10): الفعالية المضادة للأكسدة في المستخلص المائي للشاي الاخضر.

و مما تجدر الاشارة اليه إن عملية انتقاء طريقة مناسبة لاستخلاص الفينولات تعد عملية صعبة بسبب عدم توزع الفينولات بشكل منتظم في الانسجة و الخلايا بالاضافة الى وجودها بشكل حر و معقدات أو بشكل بوليمرات أو ارتباطها بالكربوهيدرات و البروتينات و كل هذه العوامل تؤثر في ذوبانها بالمذيبات المختلفة (23) .

و فضلا عما سبق فأن استخلاص المركبات الفينولية من المصادر النباتية يتأثر بطبيعة تركيبها الكيميائي و طريقة الاستخلاص المتبعة و حجم الانموذج المستخدم و وقت و ظروف الخزن اضافة الى وجود المواد التي تتداخل معها (interfering substances) . (14)

3-4-2 تأثير مدة الاستخلاص في استخلاص الفلافونويدات و الفينولات الكلية و مضادات الاكسدة من اوراق الشاي الاخضر:

يتبين من النتائج الموضحة في الشكل (11) أن تركيز الفلافونويدات المستخلصة من أوراق الشاي الاخضر يزداد مع زيادة مدة الاستخلاص الى أن يبلغ أقصاه بعد 36 ساعة , إذ بلغ تركيزها 0.618 ملغم/مل .

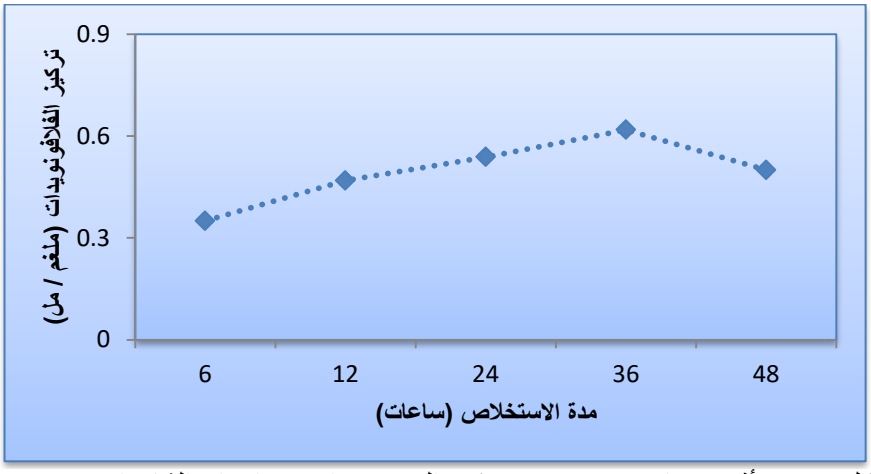
و يتضح من الشكل (12) أن الحصول على أعلى تركيز من الفينولات الكلية يتطلب وقتاً اقل مقارنة بالفلافونويدات إذ كانت مدة 24 ساعة كافية للحصول على أعلى تركيز منها و التي بلغت (1.6) ملغم/مل من مستخلص أوراق الشاي الاخضر.

كما كانت الفترة ذاتها (24 ساعة) هي المثلى للحصول على أعلى فعالية مضادة للاكسدة و التي بلغت عند التركيز (0.01) ملغم/مل لمستخلص اوراق الشاي (الشكل 13).

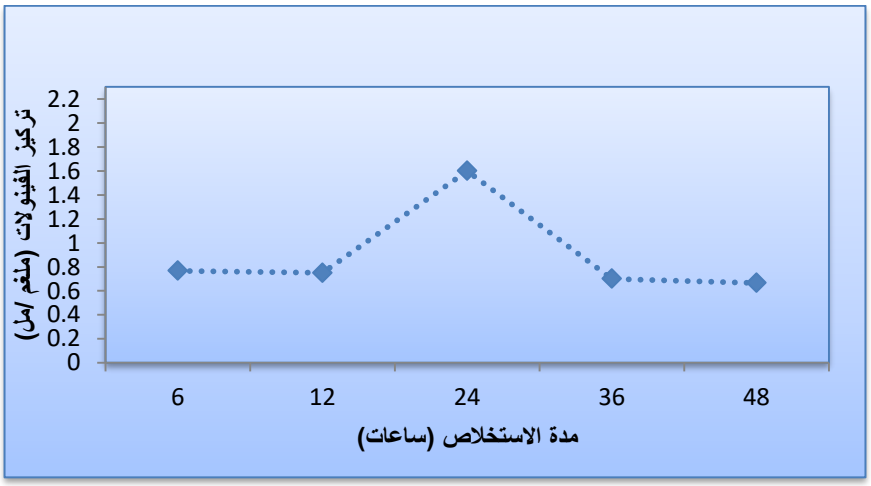
تباينت مدد الاستخلاص المثلى للفلافونويدات و الفينولات الكلية و مضادات الاكسدة تبايناً كبيراً من ساعات الى أيام ، فقد وجد (15) أن افضل مدة زمنية لاستخلاص الفلافونويدات من نبات *Opuntia milpa alta* كانت 6 ساعات , بينما تتفق النتائج المستحصلة من هذه الدراسة ما اشار اليه (24) , و كذلك (25) اذ تم استخدام فترة 24 ساعة لاستخلاص الفلافونويدات و الفينولات الكلية و مضادات الاكسدة من نباتي *Trapa taiwanensis nakai* و *Helicteres isora* L. ، على التوالي. في حين استخدمت مدة 48 ساعة لاستخلاص الفينولات الكلية و مضادات الاكسدة من خمسة نباتات طبية في بوركينافاسو (26) و من نبات *Tamarix aphylla* (L.) (12) . أما فيما يتعلق بالمواد القابلة للاستخلاص فأن النتائج المستحصلة من هذه الدراسة لا يمكن مقارنتها الا مع دراسات الاستخلاص التي استخدمت نفس الظروف المستخدمة في دراستنا اذ اشار (27) الى ان حصيلة الاستخلاص تعتمد على المذيب و طريقة الاستخلاص المستخدمين ، كما أشار عدد من الباحثين الى أن حصيلة الاستخلاص تعتمد على قطبية المذيب .

ان انخفاض تركيز الفينولات الكلية بعد 24 ساعة يمكن تفسيره وفق 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 ، فضلا عن أن إطالة وقت الاستخلاص ربما يؤدي الى اكسدة الفينولات سواءً عن طريق التعرض للضوء او الاوكسجين (19).

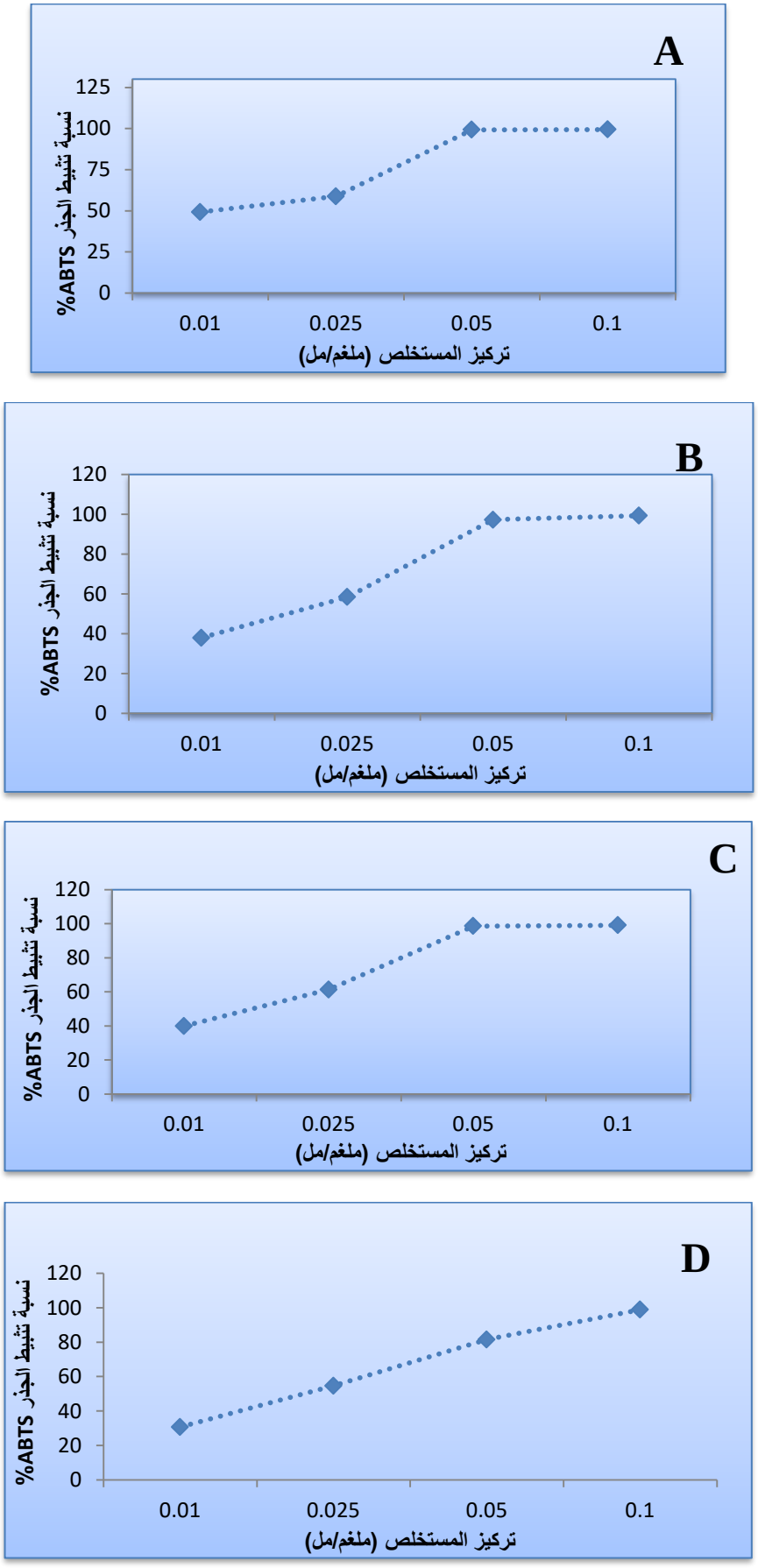
و في ضوء ما تقدم من نتائج تم تحديد مدة استخلاص قدرها 24 ساعة كأفضل مدة لاستخلاص مضادات الاكسدة و تم استخدامها في مراحل الدراسة اللاحقة.



شكل(11) : تأثير مدة الاستخلاص في تركيز الفلافونويدات من اوراق الشاي الاخضر.



شكل(12): تأثير مدة الاستخلاص في تركيز الفينولات من اوراق الشاي الاخضر.



الشكل (13): الفعالية المضادة للأكسدة في مستخلص الشاي الاخضر عند مدة استخلاص :
A-6 ساعات , B- 12 ساعة , C- 36 ساعة , D -48 ساعة .

Reference

1- **Juntachote**, T.; Berghofer, E.; Bauer, F. and Siebenhandl, S. (2006). The application of response surface methodology to production of phenolic extracts of lemon grass, galangal , holy basil and rosemary . International Journal of Food Science and Technology . 41: 121-133.

2- **El-Hela**, A. and Abdullah, A.(2010). Antioxidant and antimicrobial activities of methanol extracts of some *Verbena* species : *in vitro* evaluation of antioxidant and antimicrobial activity in relation to polyphenolic content . Journal of Applied Sciences Research , 6 (6) :683-689 ,2010.

3- **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. 2008; 35(1): 123-130.

4- **Merken** , H.M. ; Merken ,C.D. and Beecher , G.R.(2001). Kinetics method for the quantitation of anthocyanidins , flavonols and flavones in food. J. Agric. Food Chem. 2001 ,49, 2727-2732.

5- **عبد الكاظم** ، علي و الوزني ، وفاء صادق و رحيم ، زهراء (2013) غربلة بعض المستخلصات النباتية المحلية من حيث المحتوى الفينولي و الفلافونويدي و تقييم فعاليتها المضادة للاكسدة و المضادة لبكتريا *S. aureus* .مجلة جامعة كربلاء - العدد الخاص بوقائع المؤتمر العلمي الاول لكلية العلوم –المجلد الثاني -2013 .

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

7- **Kosalec**, I.;Pepeljnjak, S.; Bakmaz, M. and Vladimir –Kneževic, S. (2005). Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis products. Acta. Pharm. 55(2005) 423 – 430.

8- **Shrififar** , F. ; Yassa , N. and Shafiee , A. (2003). Antioxidant activity of *Otostegia persica* (Labiatae) and its constituents. Iranian Journal of Pharmaceutical Research (2003) 235-239.

9- **Harborne**, J.B. (1973). Phytochemical Methods. A Guide to modern techniques of plant analysis. London, Chapman and Hall.

10- **Moure**, A.; Cruz , J.M.; Franco , D.; Dominguez, J.M.; Siherio, J. and Dominguez, H.(2001). Natural antioxidants from residual sources. Food Chemistry , 72 , pp.145–171 , 2001 .

11- **Perva-Uzunalić**, A.; Škerget, M.; Knez, Ž.; Weinreich, B.; Otto, F. and Grüner, S. (2006). Extraction of active ingredients from green tea (*Camellia sinensis*) : Extraction efficiency of major catechins and caffeine . Food Chemistry 96 : 597 – 605 .

12- **Mohammedi** , Z. and Atik , F. (2011). Impact of solvent extraction type on total polyphenols content and biological activity form *Tamarix aphylla* (L.) karst. International Journal of Pharma and Bio Sciences, Vol.2/Issue – 1/Jan – Mar. 2011. ISSN 0975 – 6299. PP. 609 – 615 .

13- **Jokić**, S.; Velić, D.; Bilić, M.; Bucić – Kojić, A.; Planinić, M. and Tomas, S. (2010). Modelling of the process of solid – liquid extraction of total polyphenols from soybeans. Czech. J. Food Sci. Vol.28, 2010, No.3: 206 – 212.

14- **Koffi**, E.; Sea, T.; Dodehe, Y. and Soro, S. (2010). Effect of solvent type on extraction of polyphenols from twenty three Ivorian plants. Journal of Animal and Plant Sciences , 2010. Vol. 5 , Issue 3: 550 – 558.

15- **Cai**, W.; Gu, X. and Tang, J. (2010). Extraction , Purification and characterization of flavonoids from *Opuntia milpa alta* skin. Czech. J. food Sci. Vol. 28, 2010, No. 2: 108-116.

16- **الحيدري** , نظام كاظم و المصلح ,رشيد محجوب (1989).الاحياء المجهرية الصناعية . الطبعة الاولى–جامعة بغداد.

17- **Akroum**, S.; Satta, D. and Lalaoui, K. (2009). Antimicrobial, antioxidant, cytotoxic activities and phytochemical screening of some Algerian plants. European Journal of Scientific Research. ISSN 1450 – 216X, Vol.31, No. 2 (2009), pp: 289 – 295.

18- **Ardekani**, M.R.S.; Khanavi, M., Hajimahmoodi, M.; Jahangiri, M. and Hadjiakhoondi, A.(2010). Comparison of antioxidant activity and total phenol contents of some date seed varieties from Iran. Iranian Journal of Pharmaceutical Research (2010), 9(2): 141 – 146.

19- **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 (2009).

20- Turkmen, N. ;Velioglu, Y. S. ; Sari, F. and Polat, G. (2007). Effect of extraction condition on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea. Molecules, 2007, 12, 484 – 496, ISSN. 1420 – 3049.

21- Uma, D.B ; Ho, C.W. and Wan Aida , W.M.(2010). Optimization of extraction Parameters of total Phenolic compounds from Henna (*Lawsonia inermis*) leaves. Sains Malaysiana 39(1)(2010):119 – 128 .

22- Lapornik, B.; Prosek, M. and Wondra, A.G.(2005).Comparison of extracts prepared from plant by–products using different solvents and extraction time . Journal of Food Engineering 71 : 214–222.

23- Luthria, D.L.; Mukhopadhyay, S. and Kwansa, A.L. (2006). A systematic approach for extraction of phenolic compounds using parsley (*Petroselinum crispum*) flakes as a model substrate. Journal of the Science of Food and Agriculture . 86 : 1350 – 1358 (2006).

24- Ciou, J.Y.; Wang, C.C.R.; Chen, J. and Chiang, P.Y.(2008). Total phenolics content and antioxidant activity of extracts from dried water caltrop (*Trapa taiwanensis nakai*) hulls . Journal of Food and Drag Analysis , Vol.16 , No.2 , 2008 , pages 41 – 47 .

25- Loganayaki, N. ;Siddhuraju, P. and Manian, S. (2011). Antioxidant activity and free radical scavenging capacity of phenolic extracts from *Helicteres isora* L. and *Ceiba pentandra* L. J. Food Sci. Technol. Doi 10.1007/s 13197 – 011- 0389 – x. Springer. 5, May, 2011.

26- Konaté, K.; Kiendrébéogo, M.; Ouattara, M.B.; Souza, A.; Lamien – Meda, A.; Nongasida, Y.; Barro, N.; Millogo–Rasolodimby, J. and Nacoulma, O.G. (2011). Antibacterial potential of aqueous acetone extracts from five medicinal plants used traditionally to treat infectious diseases in Burkina Faso. Current Research Journal of Biological Sciences 3(5): 435 – 442, 2011. ISSN: 2041 – 0778.

27- 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. 2009 Str. 11 – 15 .