وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعـة كربـلاء

كلية العلوم - قسم علوم الحياة

إستخلاص البروانثوسيانيدينات وتنقيتها جزئيًا من بذور العنب (*Vitis vinifera*) ونوى التمر (*Phoenix dactylifera*) ودراسة بعض من فعالياتها الحيوية

رسالة مقدمة

الى مجلس كلية العلوم - جامعة كربلاء

وهي جزء من متطلبات نيل شهادة ماجستير علوم في علوم الحياة

من قبل

مريم هادي جبار

بكالوريوس علوم حياة – جامعة كربلاء

2006

إشراف

أ.م.د. علي عبد الكاظم الغانمي

أ.م.د. ناجح هاشم كاظم

ربيع الثاني 1434 هـ

شباط 2013 م

وَمِنَ النَّخلِ مِن طَلعِها قِنوانٌ
دانِيَةٌ وَجَنّٰتٍ مِّن أَعنَابٍ والزَّيتُونَ وَالرُّمَّانَ
مُشتَبِهاً وَغَيرَ مُتَشَٰبِهٍ انظُرُوا الىٰ ثَمَرِهِ اذا
أَثمَرَ وَيَنعِهِۦٓ إِنَّ في ذٰلِكُم لأَيٰتٍ لِّقومٍ
يُؤمِنون ۝

صَدَقَ أللهُ العَلِيُ ألعَظِيْمُ

سورة «الأنعام» الآية 99

الأهداء

الى....

من قدمه الله في الاصطفاء محمد (ص) خاتم الأنبياء

واله الطاهرين مصابيح الدجى سيما قائمهم خاتم الاوصياء

الى من افتقده في مواجهة الصعاب

ترحما لروحه وقبلة تجثوا على ثراه (أبي)

الى من كان دعائها سر نجاحي

وحنانــها بلـسم جـــراحي (أمي)

الى مـن شـاركني حـضن الام

وبهم استمد عزتي واصـــراري (أخوتي وأخواتي)

شكر وتقدير

الحمدُ لله الذي جَعلَ الحمدَ مفتاحاً لذكرِهِ وخَلَقَ الأشياءَ ناطقةً بحمدهِ وشُكرِهِ ,والصلاةُ والسّلامُ على نَبيهِ مُحمّدٍ المُشتقِّ اسمُهُ من اسمِهِ المَحمودِ , وعلى آله الطاهرين أُولي المكارمِ والجودِ.

يطيب لي ان اتقدم بجزيل الشكر والتقدير والامتنان الى الاستاذ المساعد الدكتور علي عبد الكاظم والاستاذ المساعد الدكتور ناجح هاشم كاظم لأشرافهما المباشر على العمل وكتابة البحث فضلا عن النصائح القيمة والجهد والدعم السخي والذي أثمر بإخراج هذا العمل إلى حيز الوجود فجزاهم الله عني خير الجزاء.

ومن دواعي الوفاء ان اتقدم بخالص التقدير والاحترام الى عمادة كلية العلوم ورئاسة قسم علوم الحياة ومنتسبيها لمساعدتهم وتسهيلاتهم الأدارية .

ويطيب لي ان اتقدم بشكري وتقديري للأستاذ علاء عبد الحسين/ كلية العلوم التطبيقية /جامعة كربلاء لمتابعته التحليل الاحصائي الذي تطلبه البحث .

كما اتقدم بالشكر والعرفان الى عائلتي الذين كانوا عونا لي في هذا المشوار والى طلبة الدراسات العليا الذين شاركوني عناء الدرب والى كل من قدم لي يد المساعدة او النصيحة او اهداني جواب اطفئ به حيرة سؤالي وساهم في اتمام بحثي .

الباحثة

الخلاصة

تضمنت الدراسة الحالية استخلاص الفينولات الكلية والتانينات والبروانثوسيانيدينات من بذور العنب ونوى التمر بأستخدام ظروف استخلاص مختلفة كما تم تقييم الفعالية المضادة للأكسدة لهذين المستخلصين فضلا عن تنقية البروانثوسيانيدينات منهما,واظهرت النتائج مايأتي :-

1- بعد اجراء غربلة لمخلفات أثني عشر مستخلصا نباتيا اشتملت على قشور كل من اللالنكي والموز والرمان والبرتقال واوراق الاس وبذور كل من البرتقال والعنب ونوى التمر قبل الطبخ وبعده فضلا عن جلد ثمرة العنب ونخالة الحنطة وبثل الشاي الاسود, تصدر مستخلصا بذور العنب ونوى التمر جميع المستخلصات المدروسة من حيث المحتوى من البروانثوسيانيدينات ,لذا فقد تم اخضاع هذين المستخلصين لجميع مراحل الدراسة اللاحقة .

2- 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 البروانثوسيانيدينات من كلا المستخلصين .

3- 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.

4- تم دراسة الفعالية المضادة للأكسدة لمستخلصات بذور العنب ونوى التمر بأستخدام جذور ABTS وكانت اعلى فعالية مضادة للأكسدة لمستخلص بذور العنب بأستخدام الاسيتون 70% اذ كانت قيمة IC_{50} عند التركيز 0.05 ملغم/ مل ,اما اعلى فعالية مضادة للأكسدة لمستخلص نوى التمر فقد تم الحصول عليها بأستخدام الاسيتون 70% والميثانول 80% اذ كانت قيمتي IC_{50} عند التركيز 0.025 ملغم/ مل.

5- تم دراسة تأثير تراكيز عدة من مستخلصي بذور العنب ونوى التمر ضد بكتريا *Escherichia coli* و*Proteus ssp* و *Pseudomonas aeruginosa* و *Staphylococcus aureus* و *Streptococcus fecalis* و*Streptococcus pyogens* و كانت التراكيز المستخدمة هي (1 و5 و10 و15 و25) ملغم/مل باستعمال طريقة الانتشار في الاكار بوساطة الحفر (Agar well diffusion method) و كانت النتائج كالاتي :-

أ- ان اعلى فعالية تثبيطية لمستخلص بذور العنب كانت ضد بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* عند التركيز25 ملغم/مل وبقطر تثبيط 0.5±11.5 ملم .بينما بلغت التراكيز المثبطة الدنيا (MIC) 10 ملغم/ مل لكل من بكتريا Proteus s*sp* و *Staphylococcus aureus* و *Streptococcus pyogens* في حين بلغت (5 و15) ملغم/مل لكل من بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* و *Streptococcus fecalis* , في حين لم يبدي المستخلص المذكوراي فعالية تثبيطية ضد بكتريا *Escherichia coli* ولجميع التراكيز المستخدمة من المستخلص في هذه الدراسة.

ب- اظهر مستخلص نوى التمر فعالية تثبيطية ضد بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* و*Staphylococcus aureus* وبقطري تثبيط بلغا (0.25 ±10.75و0.25 ±9.25) ملم , عند التركيز 25 ملغم/مل , وقد بلغت التراكيز المثبطة الدنيا (MIC) لهما (5 و10) ملغم/مل ,على التوالي ولم تظهراي فعالية تثبيطية ضد الاجناس البكتيرية الاخرى التي اشتملت عليها الدراسة .

6- تمت تنقية البروانثوسيانيدينات من بذور العنب ونوى التمر بخطوتي تنقية اشتملت على استخدام الايثانول 95% وكروماتوغرافيا الادمصاص بأستخدام هلام Sephadex LH-20 ,اذ بلغت حصيلة البروانثوسيانيدينات في خطوتي التنقية (29.7 و24.5) و(17.48 و11.22)% لمستخلصي بذور العنب ونوى التمر, على التوالي.

7- عند فصل البروانثوسيانيدينات المنقاة بكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) لوحظ ظهور بقعة واحدة لمستخلصي بذور العنب ونوى التمر بقيمتي R_f مقدارهما 0.9025 و0.937 ,على التوالي, مقارنة بقيمة R_f للكاتكين القياسي والتي بلغت 0.976.

جدول المحتويات

التسلسل	المحتويات	الصفحة
	المقدمة	1
1	**استعراض المراجع**	
1-1	المركبات الفينولية (Phenolic compounds)	4
2-1	التانينات (Tannins)	5
1-2-1	استخدامات التانينات (Tannins applications)	6
2-2-1	تصنيف التانينات (Tannins classification)	7
3-1	البروانثوسيانيدينات (Proanthocyanidins)	9
1-3-1	استخدامات البروانثوسيانيدينات	11
4-1	الاكسدة (Oxidation)	12
1-4-1	الاكسدة في الاغذية	13
	1- الاكسدة التلقائية (Autoxidation)	13
	2- الاكسدة الحرارية (Thermal oxidation)	14
	3- الاكسدة الضوئية (Photooxidation)	14
	4- الاكسدة الانزيمية (Enzymatic oxidation)	15
2-4-1	مضادات الاكسدة (Antioxidants)	15
	1- مضادات الاكسدة الطبيعية (Natural antioxidants)	16
	2- مضادات الاكسدة الصناعية (Synthetic antioxidants)	16
5-1	البروانثوسيانيدينات وفعاليتها المضادة للأكسدة	16
6-1	استخلاص البروانثوسيانيدينات	19
7-1	تنقية وتوصيف البروانثوسيانيدينات	22

8-1	العنب (Grape)	24
9-1	نخلة التمر (Date palm)	26
2	**المواد وطرائق العمل**	
1-2	**المواد والاجهزة المستخدمة**	28
1-1-2	المواد الكيميائية المستخدمة والشركات المصنعة لها	28
2-1-2	الاجهزة المستخدمة والشركات المصنعة لها	29
2-2	**طرائق العمل**	30
1-2-2	النباتات المستخدمة في الدراسة	30
2-2-2	تهيئة النباتات للدراسة	31
3-2-2	استخلاص المواد الفينولية	31
4-2-2	تقدير المواد القابلة للأستخلاص	32
5-2-2	تقدير البروانثوسيانيدينات	32
6-2-2	تقدير التانينات	34
7-2-2	تقدير المحتوى الفينولي الكلي	37
3-2	غربلة المستخلصات النباتية لأنتخاب الافضل منها	39
4-2	تقدير الفعالية المضادة للأكسدة	39
5-2	تحديد الظروف المثلى لأستخلاص البروانثوسيانيدينات من النباتين المنتخبين	40
1-5-2	تحديد درجة الحرارة المثلى للأستخلاص	40
2-5-2	تحديد مدة الاستخلاص المثلى	41
3-5-2	تحديد سرعة الرج المثلى للأستخلاص	41
4-5-2	تحديد المذيب الافضل للأستخلاص	41
5-5-2	تحديد التركيز الامثل من المذيب للأستخلاص	41

6-2	الفعالية المضادة للبكتريا	42
1-6-2	العزلات البكتيرية المستخدمة في الدراسة	42
2-6-2	الاوساط الزرعية المستخدمة	42
3-6-2	تحضير اللقاح	44
4-6-2	الفعالية التثبيطية للمستخلصات النباتية ضد البكتريا	44
5-6-2	حفظ العزلات البكتيرية	45
7-2	التنقية الجزئية للبروانثوسيانيدينات من بذور العنب او نوى التمر	45
8-2	فصل البروانثوسيانيدينات المنقاة من بذور العنب ونوى التمر بطريقة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC)	47
3	**النتائج والمناقشة**	
1-3	غربلة المستخلصات النباتية من حيث محتواها من البروانثوسيانيدينات	49
2-3	تحديد الظروف المثلى لاستخلاص البروانثوسيانيدينات والتانينات والفينولات الكلية من بذور العنب ونوى التمر	53
1-2-3	تأثيردرجة حرارة الأستخلاص	53
2-2-3	تأثير مدة الاستخلاص	57
3-2-3	تأثير سرعة الرج	61
4-2-3	تأثير نوع المذيب	64
5-2-3	تأثير تركيز المذيب	68
3-3	الفعالية المضادة للأكسدة	73
4-3	الفعالية التثبيطية لمستخلصي بذور العنب ونوى التمر ضد البكتيريا	80
5-3	التنقية الجزئية للبروانثوسيانيدينات من مستخلصي بذور العنب ونوى التمر	84

	1- الاستخلاص بوساطة الكحول الاثيلي 95%	85
	2- كروماتوغرافيا الادمصاص بأستخدام الهلام Sephadex LH-20	86
6-3	فصل البروانثوسيانيدينات بكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC)	90
	الاستنتاجات والتوصيات	92
	المصادر	
	المصادر العربية	93
	المصادر الانكليزية	94

قائمة الأشكال

رقم الشكل	العنوان	الصفحة
1	الوحدة الاحادية لـ flavan-3-ol في البروانثوسيانيدينات	10
2	المنحنى القياسي لتقدير البروانثوسيانيدينات بأستخدام الكاتكين	34
3	المنحنى القياسي لتقدير التانينات بطريقة Folin -Denis	36
4	المنحنى القياسي لحامض الكاليك لتقدير الفينولات الكلية بطريقةFolin- Ciocalteu	38
5	تفاعل Vanillin-HCl	52

6	تأثير درجة الحرارة في استخلاص الفينولات الكلية و التانينات و البروانثوسيانيدينات من بذور العنب.	54
7	تأثير درجة الحرارة في استخلاص الفينولات الكلية و التانينات و البروانثوسيانيدينات من نوى التمر.	55
8	الفعالية المضادة للاكسدة لمستخلصي بذورالعنب ونوى التمرالمستخلصين عند درجتي حرارة (30 و25) م° على التوالي.	55
9	تأثير مدة الحضن في استخلاص الفينولات الكلية و التانينات و البروانثوسيانيدينات من بذور العنب .	58
10	تأثيرمدة الحضن في استخلاص الفينولات الكلية والتانينات والبروانثوسيانيدينات من نوى التمر.	59
11	الفعالية المضادة للاكسدة لمستخلص بذورالعنب ونوى التمر المعرضين لمدة استخلاص 12 ساعة.	60
12	تأثير سرعة الرج في استخلاص الفينولات الكلية والتانينات والبروانثوسيانيدين في بذورالعنب.	62
13	تأثير سرعة الرج في استخلاص الفينولات الكلية والتانينات والبروانثوسيانيدينات من نوى التمر.	62
14	الفعالية المضادة للاكسدة لمستخلصي بذورالعنب ونوى التمر عند الحضن بسرعة رج 50 دورة /دقيقة.	63
15	تأثير نوع المذيب في استخلاص الفينولات والتانينات والبروانثوسيانيدينات من بذورالعنب .	65
16	تأثير نوع المذيب في استخلاص الفينولات والتانينات والبروانثوسيانيدينات من نوى التمر.	66
17	تأثير نوع المذيب على نسبة المواد القابلة للأستخلاص من بذور العنب ونوى التمر.	67
18	تأثير تركيز الاسيتون في استخلاص الفينولات الكلية والتانينات والبروانثوسيانيدينات من بذور العنب .	69
19	تأثير تركيز الاسيتون في استخلاص الفينولات الكلية والتانينات والبروانثوسيانيدينات من نوى التمر .	69

20	تأثير تركيز الايثانول في استخلاص الفينولات الكلية والتانينات والبروانثوسيانيدينات من بذور العنب .	71
21	تأثير تركيز الميثانول في استخلاص الفينولات الكلية والتانينات والبروانثوسيانيدينات من نوى التمر .	71
22	تأثيرتركيزالاسيتون والايثانول في نسبة المواد القابلة للأستخلاص من بذورالعنب	72
23	تأثيرتركيزالاسيتون والميثانول في نسبة المواد القابلة للأستخلاص من نوى التمر	73
24	الفعالية المضادة للاكسدة للمضاد القياسي Trolox	74
25	الفعالية المضادة للاكسدة لبذورالعنب ونوى التمرالمستخلصين بأستخدام الاسيتون70%	75
26	الفعالية المضادة للاكسدة لبذورالعنب المستخلص بأستخدام الايثانول80% ونوى التمرالمستخلص بأستخدام الايثانول 50%.	76
27	الفعالية المضادة للاكسدة لبذورالعنب المستخلص بأستخدام الميثانول50% ونوى التمرالمستخلص بأستخدام الميثانول 80%.	78
28	الفعالية المضادة للاكسدة لبذورالعنب ونوى التمرالمستخلصين بأستخدام الايزوبروبانول 50%.	78
29	الفعالية المضادة للاكسدة لبذورالعنب ونوى التمرالمستخلصين بأستخدام خلات الاثيل 50%.	79
30	الفعالية المضادة للاكسدة لبذورالعنب ونوى التمرالمستخلصين بأستخدام الماء المقطر.	79
31	الفعالية المضادة للاكسدة لبذورالعنب ونوى التمرالمستخلصين بأستخدام حامض الفورميك 50%.	80
32	كروماتوغرافيا الادمصاص للفينولات الكلية والبروانثوسيانيدينات المستخلصة من بذور العنب بأستخدام الهلام Sephadex LH-20.	87
33	كروماتوغرافيا الادمصاص للفينولات الكلية والبروانثوسيانيدينات المستخلصة من نوى التمر بأستخدام الهلام Sephadex LH-20.	88

34	الفعالية المضادة للأكسدة لمستخلص بذورالعنب المنقى بـ Sephadex LH-20	89
35	الفعالية المضادة للأكسدة لمستخلص نوى التمر المنقى بـ Sephadex LH-20	89
36	كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) للبروانثوسيانيدينات المنقاة من بذور العنب ونوى التمر.	91

قائمة الجداول

رقم الجدول	العنوان	الصفحة
1	النباتات المستخدمة في الدراسة والاجزاء المستخدمة منها.	31
2	العزلات البكتيرية المستخدمة في الدراسة .	42
3	المحتوى من البروانثوسيانيدينات لبعض المستخلصات النباتية.	50
4	الفعالية التثبيطية لمستخلص بذور العنب ضد بعض الانواع البكتيرية.	82
5	الفعالية التثبيطية لمستخلص نوى التمر ضد بعض الانواع البكتيرية.	84
6	تنقية البروانثوسيانيدينات من مستخلصي بذور العنب ونوى التمر.	85

قائمة المختصرات

ABTS	(2,2`-azinobis-3 ethylbenzothiazo line 6-sulfonic acid)
BHA	Butylated hydroxyanisole
BHT	Butylated hydroxytoluene
DPPH	1-diphenyl-2-picryl hydrazyl
FRAP	Ferric reducing antioxidant potential
PG	Propyl gallate
PI	Percentage of Inhibition
R_f	Relative flow
ROS	Reactive oxygen species
TBHQ	Tertiary butylhydroxyquinone
TLC	Thin layer chromatography

المقدمة

Introduction

المقدمـة

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 (Najafi,2011) .وفي احصائية اخرى عن النواتج العرضية لصناعة النبيذ [والتي تشمل بذور (seeds) وجلد ثمار العنب اضافة الى السيقان (stalks)] اتضح ان هنالك مايقرب من 7 مليون طن تطرح سنويا من هذه المخلفات (Pinelo *et al*.,2006) .

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) (kähkönen *et al*,1999) ,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) و الأكسدة (Antioxidant) , كما حظيت التانينات بالعديد من الاستخدامات الاخرى مثل صناعة الجلود (Leather industry) والاخشاب (Wood industry) وعوامل تنظيف وتطهير (Cleaning and Aseptic Agents) .(Smith and Swein,1962;Luthar,1992)

يمكـــن تصـــنيف التانينـــات الـــى ثـــلاث مجـــاميع رئيســـة : التانينـــات القابلـــة للتحلـــل (Hydrolysable tannins) والتانينـات المكثفـة (Condensed tannins) والتانينـات المعقدة (Complex tannins) . لقد استقطبت التانينات المكثفة والتي تعرف ايضا بالبروانثوسيانيدينات (Proanthocyanidins) اهتمـام البـاحثين نظـرا لانتشـارها الواسـع فـي النباتـات الراقيـة مقارنـة بالنوعين الاخرين من التانينات اللذين يكون تواجدهما في الطبيعة محدودا (Cos *et al*.,2003).

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(kylli,2011; Rapport *et al*.,2001) .

تبـدي البروانثوسـيانيدينات فعاليـات مضـادة متنوعـة تتميـز بكونهـا مضـادة للبكتريـا (Antibacterial) و الفطريـات (Antifungal) و الفيروسـات (Antiviral) والابتـدائيات (Antiprotozoal) والسرطان (Anti-cancer) .كما تتميز هذه المركبات بالعديد من التطبيقات الطبية الاخرى والتي من اهمها دورها في حماية القلب (Cardioprotective) وذلك مـن خـلال تثبيـط اكسـدة LDL (Low-density Lipoprotein) وتثبيط تجمع الصفائح الدموية والتخثر وغيرها (Cos *et al*.,2003).

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 اكسـدة الدهـون (Inhibition of lipid peroxidation) وقـنص الأوكسـجـين المفـرد (Quenching of singlet oxygen) (Cos *et al*.,2003).

نظرا لأن سلامة الاغذية والحفاظ على قيمتها الغذائية واطالة عمرها الخزني والحد من التلف اثناء تداولها وخزنها تعد من الامور التي اثارت اهتمام المنتج والمستهلك على حد سواء ,لذا فأن

البروانثوسيانيدينات كمضادات اكسدة طبيعية (Natural Antioxidants) تمثل بدائل مناسبة لمضادات الاكسدة الصناعية (Synthetic Aantioxidants) التي اصبح استخدامها مثيرا للجدل من خلال امتلاكها لبعض التأثيرات السمية والسرطانية (El-Hela and Abdullah,2010).

يمتلك العراق ثروة نباتية كبيرة ,ونظرا لاهمية البروانثوسيانيدينات الكبيرة لذا فأن اهداف الدراسة تتمثل بالحصول على مصادر مهمة للبروانثوسيانيدينات من بعض النباتات المحلية عبر تحقيق المحاور الاتية:-

1- غربلة عدد من المخلفات النباتية من حيث محتواها من البروانثوسيانيدينات وانتخاب الافضل منها .

2- تحديد الظروف المثلى لاستخلاص البروانثوسيانيدينات من النبات المنتخب.

3- تقييم الفعالية المضادة للأكسدة (Antioxidant) والمضادة للأحياء المجهرية (Antimicrobial) التي يبديها النبات المنتخب.

4- تنقية البروانثوسيانيدينات من النبات بالطرائق المتاحة.

الفصل الأول

استعراض المراجع

Literatures Review

1-استعراض المراجع

1-1 المركبات الفينولية (Phenolic compounds) :-

"المركبات الفينولية " مصطلح عام يشير الى عدد كبير من المركبات (اكثر من 8000 مركب) مؤلفة من حلقة اروماتية واحدة على الاقل مع مجموعة واحدة او اكثر من مجاميع الهيدروكسيل (Cartea *et al.*,2011), متباينة في تركيبها من جزيئات بسيطة مثل الاحماض الفينولية (phenolic acids) الى مركبات عالية التبلمر مثل التانينات (Dai and Mumper,2010) , ويمكن ان يعرف المركب الفينولي بشكل ادق كيميائيا على انه المادة التي تتألف من حلقة اروماتية تحمل واحدة او اكثرمن بدائل الهيدروكسيل بما فيها مشتقاتها الوظيفية (الاسترات وايثرات المثيل والكلايكوسيدات .....الخ) وكقاعدة عامة الفينولات هي كل مواد الايض الثانوية الناتجة من مسارات Shikimate-phenylpropanoids-flavonoids (Lattanizo *et al.*,2006) .

تصنف الفينولات الى مركبات غير ذائبة (Non-soluble) مثل التانينات المكثفة (Condensed tannins) واللكنينات (Lignins) واحماض Hydroxycinammic المرتبطة بجدار الخلية .اما الصنف الثاني فهو مركبات ذائبة (Soluble) مثل الاحماض الفينولية (Phenolic acids) و Phenylpropanoids والفلافونويدات (Flavonoids) والكوينونات (Quinones) وجميعها تؤدي وظائف عدة في النباتات والحيوانات (Rispail *et al* .,2005).

تحتاج النباتات للمركبات الفينولية لغرض التصبغ (Pigmentation) والنمو والتكاثر ومقاومة الممرضات والعديد من الوظائف الاخرى (Lattanizo *et al.*,2006) مثل جذب الحشرات لنشر البذور والتلقيح (Pollination) ,كما يمكنها ان تعمل كعوامل سيطرة للهرمونات النباتية , وقد حظيت المركبات الفينولية باهتمام كبير لوجودها المطلق في تشكيلة واسعة من الاغذية النباتية المستهلكة ولكونها من العوامل الوقائية ضد السرطان وامراض القلب بسبب خصائصها المضادة للأكسدة (Cartea *et al.*,2011) .

تـؤدي الفينـولات الغـذائيــة (Dietary phenols) العـديـد مــن الوظـائف الحيـوية تـتمثـل بـكـونــها مـضـــادة لـلألتهـابـــات (Anti –inflammation) والشيـخـوخــة (Anti - aging) ومـضـادة لتـصلـب الشــرايـيـن (Anti-atherosclerosis) وحمـايــة القـلـب والاوعيـة الدمويـة وتحسين وظائف بطانة الاوعية الدموية (Han *et al*.,2007) .

تتضـمن الفينـولات عـددا مـن التطبيقـات الصـناعية, ففـي مجـال الصـناعات الغذائيـة يمكـن استخدامها كمـواد حافظـة (El Hajj *et al*., 2012), كمـا يمكـن استـخدامها فـي مجـال التصـنيع الكيميائي لانتاج المبيدات الحشـرية والادويـة والاصبــاغ فضـلاً عن امكانيـة استخدامها فـي عمليـة القصر في صناعة الاوراق (Li *et al*.,2010) .

2-1 التانينات (Tannins)

اشتق مصطلح التانينات من الكلمة السلتية (Celtic word) القديمة للبلوط (oak) والتـي تعد المصدر الرئيس للتانين في صناعة الجلود (Hagerman ,2002) .

عرف Smith and Swein (1962) التـانينات علـى انها مركبـات فينوليـة ذائبــة بالمـاء ,لهـا اوزان جزيئية عاليـة تتـراوح بين(500-3000) دالـتن ,تظهـر التفـاعلات الفينوليـة الاعتياديـة ولـهـا صـفات خاصــة مثـل القابليـة علـى ترسـيب القلويـدات والجيلاتـين والبروتينـات الاخـرى وقـد بـيَن Khanbabaee and Ree (2001) بـأن هذا التعريـف لايشمل جميـع التانينـات لأنـه قد عزلـت مؤخراً جزيئات ذات كتل مولارية تصل الى 20,000 دالتن وقد صنفت علـى انهـا تانينـات اعتمـاداً على تراكيبها الجزيئية .

التانينات مواد ايض ثانوية معقدة جدا ذائبة بالمحاليل القطبية ويمكن تمييزها عن باقي المركبات الفينولية المتعددة بوساطة قابليتها على ترسيب البروتين (Silanikove *et al*.,2001) فالعديد من الفينـولات الذائبــة التــي لهــا خصــائص كيميائيــة وتركيبيــة مماثلــة للتانينــات لاترســب البــروتين (Reed,1995), فضــلاعن ذلـك تتميـز التانينــات عـن بــاقي انـواع المركبـات الفينوليـة الاخـرى

بارتباطها بالمركبات الاساسية والصبغات والمركبات الجزيئية الكبيرة والايونات المعدنية ونشاطها المضاد للاكسدة (Okuda and Ito,2011) .

التانينات مركبات غير ثابتة حرارياً (Thermolabile),عالية القطبية (Highly polar) , تكون صعبة التأين (Perret and Tabacchi,2001) تذوب في الماء عند درجات حرارة (20-35)مْ بأستثناء بعض التانينات ذات الاوزان الجزيئية العالية (Hassanpour *et al.*,2011) مكونة محاليل غروية تعتمد في درجة ذوبانها على درجة البلمرة (Bele *et al.*,2010) .

للتانينات دوران دفاعيان احدهما ضد الحيوانات العاشبة والاخر ضد الاحياء المجهرية (Downey,2010) اذ يزداد انتاج التانينات في بعض الحالات المرضية (Khanbabaee and Ree,2001).

ومن الخصائص غير المرغوبة للتانينات تثبيطها لانزيم (α-amylase) كما ان استخدامها بكميات كبيرة ينتج عنه تأثيرات سلبية على هضم الاحماض الامينية فضلا عن كونها ذات طعم قابض قوي (Luthar,1992) .

1-2-1 استخدامات التانينات (Tannins applications):-

ان للتانينات تطبيقات واسعة في المجالات الطبية والغذائية والصناعية الاخرى .

تحفز التانينات الشفاء السريع وتكوين انسجة جديدة في الجروح والانسجة المخاطية الملتهبة ,وتستخدم في علاج قرحة الدوالي والحروق الطفيفة والتهاب اللثة والاسهال المعوي والزكام وحالات التسمم بالمعادن ,وقد اثبتت هذه المركبات في السنوات الاخيرة نشاطها المضاد للفيروسات مما شجع امكانية استخدامها في علاج الامراض الفايروسية ومنها الآيدز (Rangari,2007).

اما في مجال التصنيع الغذائي فقد استخدمت التانينات بشكل رئيس في ترويق البيرة والنبيذ (Rangari,2007).

وفي المجال الصناعي استخدمت التانينات في دباغة جلود الحيوانات نظرا لقابليتها على التفاعل مع البروتينات الموجودة في جلود الحيوانات "الكولاجين" (Khanbabaee and Ree,2001; Hagerman ,2002). كما تم استخدام التانينات في صناعة الحبر وطباعة الاقمشة وكمثبت (Mordant) للون في الاصباغ ,اما في صناعة المطاط فقد استخدمت كمخثر(Coagulant) , وتدخل التانينات في انتاج حامض الكاليك (Gallic acid) والبايروكالول (Pyrogallol) فضلا عن امكانية استخدامها احيانا ككواشف في الكيمياء التحليلية (Rangari,2007).

2-2-1 تصنيف التانينات (Tannins classification):-

أ- التصنيف الاول :-

من الملاحظ بأن العديد من التانينات يمكن ان تتجزأ الى مكوناتها بالتحلل المائي عند معاملتها بالماء الحاراوانزيم Tannase وعليه يمكن تصنيف التانينات اعتمادًا على الصفات الكيميائية الى مجموعتين (Nonaka,1989;Würdig and Woller ,1989):-

1 - التانينات القابلة للتحلل المائي (Hydrolysable tannins): وهي مشتقات حامض الكاليك وتضم كلا من Gallotannins و Ellagitannins (Hagerman,2002) .

2- التانينات غير القابلة للتحلل المائي (Non- hydrolysable tannins): والتي يطلق عليها التانينات المكثفة (Condensed tannins).

ب -التصنيف الثاني :-

يعتمد هذا التصنيف على أستخدام مطيافية NMR والخصائص التركيبية بشكل اساسي بدلا من الصفات الكيميائية اذ يمكن تصنيف التانينات الى ثلاث مجاميع (Nonaka,1989;Luthar,1992):-

1- Hydrolysable tannins.

2- Condensed tannins .

3- Complex tannins .

وذكر Khanbabaee and Ree (2001) بانه يمكن ايضا تصنيف التانينات بالاعتماد على الصفات التركيبية الى اربعة اقسام :-

1- Gallotannins : وهي استرات polygallol للكلوكوز وان معاملتها مع الحوامض المعدنية و الميثانول والحرارة ينتج polyol و methyl gallate كما ان معاملتها مع الحوامض القوية ينتج حامض الكاليك و polyol (Hagerman,2002) .

2- Ellagitannins: وهي استرات حامض Hexahalroydiphenic (HHDP) اذ يتحلل الاخيرالى حامض الايلاجك في المحلول المائي (Hagerman,2002).

3- Complex tannins : مركبات تشتمل في تركيبها على وحدات flavan-3-ol مرتبطة كلايكوسيديا مع وحدة ellagitannin اوgallotannin وتعرف التانينات المعقدة بتحللها المائي الجزئي بسبب الاصرة C-C بين وحدة flavan-3-ol والجزء الكلايكوسيدي (Cos *et al.*,2003) ومن امثلتها stenophyllanin A و acutissimin B و mongolica A و stenophynin A (Luthar,1992).

4- التانينات المكثفة (Condensed tannins).

ج- التصنيف الثالث :-

وفقا الى Okuda and Ito (2011) يمكن تصنيف التانينات الى صنفين :-

1- تانينات Type A: وهي مركبات فينولية متعددة ثابتة التركيب الكيميائي ومن بين هذه المركبات التانينات المتحللة (Hydrolysable tannins) مثل Ellagitannins وانواعها المؤكسدة وبعض انواع Gallotannins و Caffetannins .

2- تانينات Type B: وهي مركبات فينولية متعددة متغيرة التركيب الكيميائي ,ان تراكيب ومكونات هذا النوع من التانينات الذي تم الحصول عليه من انواع معينة من النباتات غير متشابه ,اذ يتغير موسميا ويعتمد على ظروف نمو النبات والطريقة المستخدمة في انتاجه وتحضيره .

ومن الجدير بالذكر ان اقدم تصنيف للتانينات اعتمد على تفاعل التانينات مع املاح الحديد وعليه فقد صنفت التانينات الى (Gnamm,1949) :-

1- التانينات التي تعطي لوناً اخضر عند وجود املاح الحديد .

2- التانينات التي تعطي لوناً ازرق عند غياب املاح الحديد .

ان هذا التصنيف لم يعد يستخدم بكثرة نظرا لوجود عدد من المواد العضوية الطبيعية ,غير التانينات التي لها القابلية على التفاعل مع املاح الحديد منتجة لوناً اخضر .

3-1 البروانثوسيانيدينات (Proanthocyanidins-PACs) :-

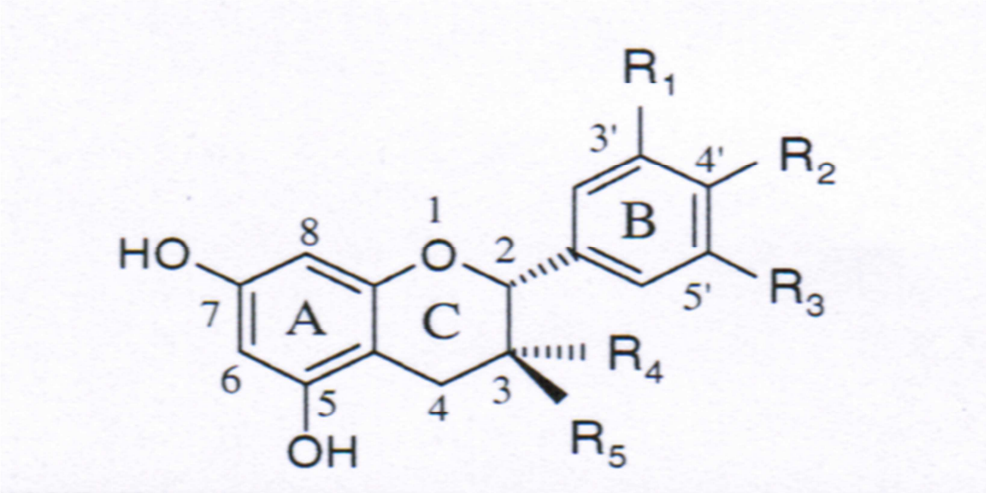
البروانثوسيانيدينات اوالتانينات المكثفة بوليمرات فلافونويدية واسعة الانتشار في المملكة النباتية (Huang,2012) مكونة من وحدات flavan-3-ol "Catechins" ذات الهيكل الفلافونويدي C_6-C_3-C_6 المرتبطة بأواصر interflavan C-C ومن وحدات البروانثوسيانيدينات الاكثرشيوعا الكاتكين Catechin (–) + والابي كاتكينEpicatechin(–) – و Gallocatechin و Epigallocatechin (kylli,2011) .

تتواجد البروانثوسيانيدينات في اوراق وثمار وقلف وبذور وازهار وجذورالعديد من النباتات (Rapport *et al.*,2001) اذ توجد بكثرة في الفواكه مثل العنب البري والتوت البري والتفاح والكمثرى كما توجد في الشاي والكاكاو (Valls *et al.*,2009) والخضروات والبندق .(Guang *et al.*,2001)

البروانثوسيانيدينات مركبات عديمة اللون تنتج مركبات الانثوسيانيدينات Anthocyanidins الملونة عند كسرالاصرة interflavan C-C بتسخينها في وسط حامضي

ولهذا سميت هذه المركبات بـ Proanthocyanidin , وان الوحدة التركيبية الاساسية للبروانثوسيانيدينات هي نواة flavan-3-ol الفينولية , الشكل (1) , والتي يمكن ان تضم انماط هيدروكسيل متنوعة عند الموقع -5 و-7 في الحلقة A والموقع-3 في الحلقة غيرالمتجانسة والموقع-'3 و-'4 و/أو-'5 في الحلقة B, وان انماط الهيدروكسيل تسمح بتمييزالبروانثوسيانيدينات الى اصناف عدة تتضمن بصورة اساسية Procyanidins و Prodelphinidins (وهما الاكثر شيوعاً) و Propelarganidins وProfisetinidins وProrobinetinidins(والتي تعد نادرة نسبياً) (Sun and Sprager,2005). كما ان التنوع التركيبي للبروانثوسيانيدينات ناتج ايضا من درجة ونمط Gallolyation و Glycosylation وMethoxylation (Koleckar *et al.* ,2008) اذ يضم الموقع -3 في الحلقة C مجموعة هيدروكسيل اوان يكون مؤسترا مع حامض الكاليك (Valls *et al.*,2009).

.



الشكل (1): الوحدة البنائية (flavan-3-ol) في البروانثوسيانيدينات (Prior and Gu,2005) .

ان تركيب البروانثوسيانيدينات لا يعتمد فقط على طبيعة وحدات flavan-3-ol المكونة لها وانما يعتمد ايضا على درجة البلمرة والمواقع الرابطة بين وحداتها (Sun and Sprager,2005) , فالبروانثوسيانيدينات مركبات ثنائية (Dimer) وقليلة الوحدات (Oligomer) ومتعددة الوحدات (Polymer) (El-Charras,2009) تصنع حيويا بعملية تكثيف لوحداته البنائية مع درجة بلمرة

من 2-50 وحـدة بنائيــة (Khanbabaee and Ree,2001) اذ تعد درجـة البلمرة وصفاً لحجم جزيئة البروانثوسيانيدين (Prior and Gu,2005).

وتقسم البروانثوسيانيدينات اعتماداً على نـوع الروابط بين الوحدات الاحادية (Monomer) الى نوعين :-

B-Type: ترتبط فيه وحدات الـ flavan الاحادية بآصرة C_4 ⟵ C_6 أو C_4 ⟵ C_8 .

A-Type: ويضم الآصرة C_7-O-C_2 أو C_5-O-C_2 بالاضافة الى الآصرة C_4⟵ C_6 أو C_4 ⟵ C_8 في النوع B-Type (Sun and Sprager,2005) .

1-3-1 استخدامات البروانثوسيانيدينات:-

تميـزت الـبروانثـوسيـانـيدات بتـأثيـراتهـا المـفيـدة لصـحـة الانسـان (Dixon *et al.*,2004) فبالأضافــة للفعاليــة المضــادة للاكســدة تــبدي البروانثـوسيانــيدينات فعاليــة مضــادة للالتــهابات والمــايكروبات ومـادة مانعـة للسرطان (Cancer chemopreventive) (Cos *et al.*,2003) ولقد بيـنت الدراسات بأن البروانثوسيانيدينات تساعد في (Shi *et al.*,2003) :-

1- حماية الجسم من اضرار الشمس .

2- تقوية الرؤية .

3- زيادة المرونة في المفاصل والشرايين والانسجة الجسمية مثل القلب .

4- تقوية الدورة الدموية من خلال تقوية الشعيرات الدموية والشرايين والاوردة .

كمــا تحمــي البروانثوســيانيدينات النباتــات مــن المــتطفلات الضــارة مثـل المايكروبــات والفطريات والحيوانـات العاشبة (Beecher,2004) وتعد هذه التـأثيرات الوقائيـة ضد الحيوانـات العاشبة والناتجة من الطعم القابض للبروانثوسيانيدينات ذات اهمية تطبيقية زراعية, كما يعد وجود

البروانثوسيانيدينات في محاصيل الاعلاف عامل جودة مهم (Dixon *et al.*,2004) اذ تعمل البروانثوسيانيدينات على (Aas,2003) :-

1- الزيادة في نمو الصوف والكتلة الجسمية وانتاج الحليب وكمية البروتين في الحليب .

2- مقاومة فقدان البروتين التي تسببها طفيليات المعي وقد تعمل على تحفيز الجهاز المناعي .

3- التأثيرفي يرقات الطفيليات بفقدانها لنشاطها عند مرورها في المعي.

4- تشكيل نظام بيئي غذائي في الاعلاف الحاوية على التانينات المكثفة للسيطرة على تأثير الطفيليات.

من الصفات الكيميائية الحيوية للبروانثوسيانيدينات الارتباط بالبروتين مؤدية الى مسخه ولذلك تستخدم في دباغة جلود الحيوانات (Beecher,2004) كما تستخدم البروانثوسيانيدينات في المواد اللاصقة للخشب وتنقية المياه فضلاً عن استخدامها كمادة مضافة للطين اثناء عمليات التنقيب عن النفط (Venter *et al.*,2012) .كما تعد البروانثوسيانيدينات مسؤولة عن الطعم المر والقابض لبعض الاغذية والمشروبات (Kenndy,2002).

4-1 الأكسدة (Oxidation):-

الاكسدة تفاعل كيميائي يتم من خلاله نقل الالكترونات من مادة الى عامل مؤكسد وعلى الرغم من ان تفاعلات الاكسدة تكون ضرورية للحياة الا انها يمكن ان تكون ضارة اذ ينتج عنها تكون الجذور الحرة التي تبدأ تفاعلات متسلسلة تؤدي الى تلف الخلايا (Hamid *et al.*,2010) .

الجذور الحرة جزيئات أو ذرات تحمل واحدة أو اكثر من الالكترونات الخارجية المفردة مما يجعلها ذات فعالية عالية وتميل لتكوين اواصر ثابتة,وهذا الاستقرار يتطلب الحصول على الكترونات من جزيئات اخرى (Mahajan and Tandon,2004;Simkó *et al.*,2011) مثل DNA والانزيمات واغشية الخلايا مما يؤدي الى حصول تغير في التركيب البنائي لهذه الجزيئات

وبالتالي تلف الخلايا (Dauqan *et al.*,2011) فللجذور الحرة علاقة ببعض الامراض الخطيرة بما في ذلك مرض باركنسون والزهايمر وتصلب الشرايين والنوبات القلبية (Sochor *et al.*,2010) ومع ذلك فالجذور الحرة (انواع الاوكسجين الفعالة ,ROS) عند التراكيز المتوسطة تكون ضرورية للعديد من التفاعلات الدفاعية فهي وسائط اساسية للملتهمات المايكروبية وازالة السموم وموت الخلايا المبرمج (Salganik,2001).

1-4-1 الأكسدة في الاغذية :-

تعد الأكسدة الدهنية أحد الاسباب الرئيسة لتلف الاغذية اذ تؤدي الى تغيرات في الطعم والقوام والمظهر والتغذية فضلا عن تقصير العمر الخزني للأغذية فالهيدروبيروكسيدات (التي تمثل الناتج الاولي) تكون غيرمستقرة وتتحلل لاحقا مكونة مركبات ثانوية قلقة منتجة لطعم قوي ولاذع مثل الالديهايدات والكيتونات والاحماض العضوية و Epoxide والبوليمرات (Frankel,1991;Sun *et al.*,2011).

هنالك اليات كيميائية مختلفة مسؤولة عن اكسدة الدهون والزيوت خلال عمليات التصنيع والخزن والطبخ وهي (Choe and Min,2009) :-

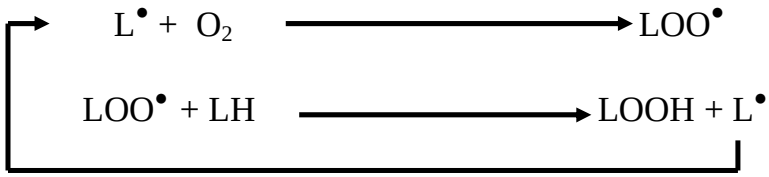
1- الاكسدة التلقائية (Autoxidation) :-

وهي عملية تأكسدية متلفة للحوامض الدهنية غير المشبعة تتم بوساطة عملية تحفيز ذاتي تتضمن الية تفاعل متسلسلة للجذور الحرة وتشتمل على ثلاث مراحل (Wanasundara and Shahidi,2005):-

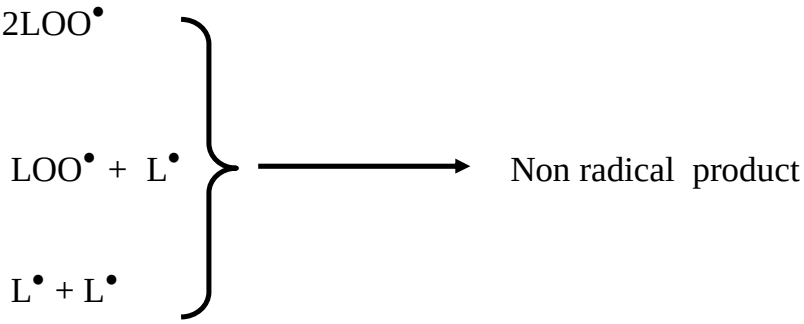
1- الابتداء (Initation) .

$$LH \xrightarrow{\text{initiator}} L^{\bullet} + H^{\bullet}$$

2- التكاثر (Propagation).



3- الانهاء (Termination) .



- الجذور الحرة , LH الحوامض الدهنية (Shahidi and Zhong,2005)

2- الاكسدة الحرارية (Thermal oxidation) :-

يؤدي تسخين الزيوت الى تغيرات كيميائية عديدة من ضمنها الأكسدة (Choe and Mine,2009),وان الآلية الكيميائية للأكسدة الحرارية مشابهة للأكسدة التلقائية ولكنها اسرع اذ يتحلل الهيدروبيروكسيد بسرعة الى نواتج الاكسدة الثانوية (Choe and Mine,2007).

3- الأكسدة الضوئية (Photooxidation):-

تتضمن الأكسدة الضوئية (photooxidation) تفاعل مباشر للضوء النشط والاوكسجين المفرد مع الاحماض الدهنية غير المشبعة يتبعه تكوين الهيدروبيروكسيدات (Akoh and Min,2002) فالضوء يسرع من الأكسدة الدهنية وخصوصا بوجود المحسسات الضوئية (photosensitzers) مثل الكلوروفيل (Choe and Mine,2006),اذ يحدث photosensitzied oxidation بوجود جزيئات "محسسات " قادرة على امتصاص

الضوء المرئي اوالضوء قرب الاشعة فوق البنفسجية UV لتصبح في حالة اثارة الكترونية (Wanasundara and Shahidi,2005).

4- الأكسدة الأنزيمية (Enzymatic oxidation) :-

تم تحديد بعض الأنزيمات التي لها القابلية على الشروع بالأكسدة الدهنية ومن بينها انزيم Lipoxygenase (LOX) الذي يعمل على فصل ذرة الهيدروجين من المجاميع المثيلية (Interrupted methylen) في تركيب الأحماض الدهنية المتعددة غيرالمشبعة وتحريرالهيدروبيروكسيد المرتبط بالاحماض الدهنية (Akoh and Mine,2002) .

2-4-1 مضادات الأكسدة (Antioxidants) :-

مضادات الأكسدة مجموعة من المواد التي عند استخدامها بتراكيز منخفضة تثبط او تؤخرعملية الأكسدة بينما تؤكسد نفسها (Rathore *et al.*,2011) ,واشار Dai and Mumper (2010) الى ان مضادات الأكسدة مركبات يمكنها ان تؤخر او تثبط او تمنع اكسدة المواد القابلة للأكسدة عن طريق كبح الجذور الحرة وتقليل الجهد التأكسدي.

تصنف مضادات الأكسدة اعتماداًعلى اليه العمل الى مجموعتين هما ,مضادات الأكسدة الاولية (Primary antioxidants) والتي تكسر سسلسلة تفاعل الأكسدة بوساطة وهب ذرة الهيدروجين وتكوين جذور أكثر استقراراً, ومضادات الاكسدة الثانوية (Secondary antioxidant) والتي تعمل على ابطاء سرعة عملية الأكسدة بآليات عدة منها الارتباط بالمعادن (Cheleating of metals) , وهب H الى مضادات الأكسدة الاولية ,امتصاص الأشعة فوق البنفسجية , تحليل بيروكسيد الهيدروجين والانواع غير الجذرية الاخرى واقتناص الاوكسجين , ووفقا لهذا التصنيف هنالك مضادات أكسدة تبدي أكثرمن آلية واحدة في التثبيط وتسمى مضادات الأكسدة متعددة الوظائف (Multiple function antioxidants) (Wanasundara and Shahidi,2005;Shahidi and Zhong,2005).

يعتقد ان مضادات الأكسدة تعمل على تثبيط اكسدة الدهون من خلال وهب ذرات الهيدروجين ويمكن ان يتم ذلك اما بوساطة مضادات اكسدة طبيعية او صناعية (Hilton,1989) .

1- مضادات الأكسدة الطبيعية (Natural antioxidants):-

وهي مركبات طبيعية من اصل نباتي,عالية او واطئة الوزن الجزيئي تختلف في التركيب والخصائص الكيميائية والفيزيائية وآلية وموقع العمل (Wanasundara and Shahidi,2005;Kumar,2011) , ان التأثيرات الدفاعية لمضادات الأكسدة الطبيعية في الفواكه والخضروات ترتبط بثلاث مجاميع وهي الفيتامينات والكاروتينويدات والفينولات (Thaipong *et al.*,2006).

2- مضادات الأكسدة الصناعية (Synthetic antioxidants) :-

وهي مواد كيميائية تستخدم لتحقيق الثبوتية في الدهون والزيوت والاغذية المحتوية على الدهون وغالبا ماتكون ذات اساس فينولي,هنالك العديد من المركبات المعروفة بنشاطها المضاد للأكسدة ولكن عددا قليلاً منها يستخدم مع الاغذية بسبب قواعد السلامة الصارمة (Wanasundara and Shahidi,2005) منها Butylated hydroxyanisole (BHA) و Butylated hydroxytoluene (BHT) و Tertiary butylhydroxyquinone (TBHQ) و Propylgallate (PG) و Ethoxyquin (Akoh,2002) .

5-1 البروانثوسيانيدينات وفعاليتها المضادة للاكسدة :-

توسعت الاستخدامات العلاجية للبروانثوسيانيدينات بسبب فعاليتها المضادة للأكسدة (Fine,2000) فقد استخدمت البروانثوسيانيدينات في اوروبا بصورة اساسية في علاج الاضطرابات الوعائية مثل اضطراب الاوردة وتوسع الدوالي ومشاكل الاوعية الدموية الدقيقة بضمنها هشاشة الاوعية الشعيرية والتهاب الشبكية وفيما يأتي السمات الاساسية

للبروانثوسيانيدينات والتي تشكل الاساس المنطقي في استخدامها لعلاج الاضطرابات الوعائية والتي اثبتت مختبريا (Murray and Pizzorno,1999):-

1- التخصصية بالجذور الحرة الهيدروكسيلية .

2- اقتناص الجذور الحرة وبيروكسيدات الدهون .

3- تؤخروبشكل ملحوظ بدأ الاكسدة الدهنية (Lipid peroxidation).

4- الارتباط بجزيئات الحديد الحرة مما يساعد في تثبيط الاكسدة الدهنية المحفزة بأيونات الحديد .

5- التثبيط غير التنافسي لانزيم Xanthine oxidase المولد الرئيس للجذور الحرة.

6- تثبيط انزيمات Collagenase و Elastase و Hyaluranidase المحللة لتراكيب الانسجة الرابطة مما يسبب زيادة النفاذية .

في محاولة لفصل وتشخيص المركبات الفعالة من براعم نبات *Mammea longifolia* وجد بأن هذه المركبات هي البروانثوسيانيدينات قليلة الوحدات بدرجة بلمرة 2-10 ,وقد كانت هذه الدراسة الاولى التي تبين احتواء هذه البراعم على البروسيانيدينات (Procyanidins) قليلة الوحدات الكابحة للجذور الحرة والمضادة للاكسدة (Rao *et al.*,2004) .

وفي دراسة شملت الثمار الحجرية (Fruit stones) و الأغلفة (Pericarps) لثمار نبات *Litchi chinensis* كمصادر للبروانثوسيانيدينات البوليمرية مع دراسة فعاليتها المضادة للاكسدة بأستخدام جذور 2,2`- 1−diphenyl-2-picryl hydrazl (DPPH) و azinobis-3 ethylbenzothiazo line 6-sulfonic acid (ABTS) وطريقة ferric reducing/ antioxidant potential (FRAP) . اظهرت نتائج هذه الدراسة بأن بوليمرات البروانثوسيانيدينات للبذور(Fruit stones litchi) والاعلى في درجة البلمرة , ابدت فعالية مضادة للاكسدة اقوى من بوليمرات غلاف الثمرةlitche pericarp . (Zhou *et al.*,2011)

لقد اظهرت البروانثوسيانيدينات المستخلصة من قلف ساق وقلف جذور واوراق نبات *Acacia canfusa* فعالية مضادة للاكسدة جيدة بأستخدام جذور (DPPH) و طريقة (FRAP) اذ يحتوي مستخلص قلف الساق وقلف الجذورعلى Propelargonidin وProcyanidin بينما يحتوي مستخلص الاوراق على Propelargonidin و Procyanidin و Prodelphinidine مع سيادة للبروسيانيدين في كل المستخلصات (Wei *et al.*,2010) .

كما قام (2011)He *et al.* بمقارنة الفعالية المضادة للاكسدة لمستخلصات الميثانول لاربعة انواع من جنس نبات *Carya* بأستخدام جذور(DPPH) وReducing power و Superoxide anion اذ لوحظ في هذه الدراسة امتلاك مستخلص *C. dabieshanensis* اعلى فعالية مضادة للاكسدة بينما اظهر مستخلص *C. illinoensis* اوطأ فعالية مضادة للاكسدة من بين المستخلصات المدروسة, وقد لوحظ وجود علاقة بين محتوى المستخلصات من الفينولات الكلية والبروانثوسيانيدينات مع خصائصها المضادة للاكسدة .

وفي دراسة هدفت الى الكشف عن تركيب البروانثوسيانيدينات البوليمرية والفعالية الكابحة للجذور الحرة في ورق وقلف الساق والجذور الدقيقة لنبات *Grevillea robusta* وبأستخدام جذر (ABTS) وجد ان الفعالية المضادة للاكسدة للبروانثوسيانيدينات اعلى من حامض الاسكوربيك ومضاد الاكسدة الصناعي (BHA) (Wei *et al.*,2012) .

قدمت نتائج الدراسة التي قام بها (2004) Gonçalves *et al.* دليلا واضحا على ان الالية المضادة للاكسدة لنبات مخالب القط *Uncaria tomentosa* والتي تقوم عليها الفعالية المضادة للالتهابات لهذا النبات , تدعم التأثيرات الحيوية للبروانثوسيانيدينات، وبخاصة الفعالية المضادة للأكسدة والكابحة للجذور الحرة .

6-1 استخلاص البروانثوسيانيدينات :-

تستخدم المستخلصات النباتية بصورة واسعة في الصناعة الغذائية والدوائية والتجميلية , فالنباتات تضم مدىً واسعاً من المركبات الفعالة حيويا مثل الدهون والعطور والنكهات والصبغات والمغذيات والمواد الكيميائية النباتية (Phytochemicals) الاخرى وقد تم دراسة تقنيات الاستخلاص بشكل واسع من اجل الحصول على المركبات الطبيعية المشار اليها من النباتات لاغراض تجارية (Wang and Weller,2006) .

البروانثوسيانيدينات مركبات عالية الفعالية وتعد واحدة من المركبات الطبيعية غير الثابتة فهي معرضة للأكسدة الانزيمية بفعل انزيمات Polyphenol oxidases فضلاعن الأكسدة التلقائية, اضافة الى الصفات المذكورة اعلاه فان التغاير التركيبي والمدى الواسع من الاوزان الجزيئية لهذه المركبات يجعل التحليل الكمي لها يمثل تحديا كبيرا لذا تعد الاحتياطات ضرورية عند تحضيروخزن النماذج فقد يكون للطرائق المستخدمة تأثيرا على نتائج تحليل البروانثوسيانيدينات, كما ان تحليل النماذج الطازجة يعد طريقة غيرعملية ويفضل تجفيد النماذج لغرض حفظها (Prior and Gu,2005) .

يعد استخلاص البروانثوسيانيدينات الخطوة الاولى لتحديد تركيب الوحدات البنائية لهذه المركبات(Kennedy,2002) وغالبا ماتستخلص البروانثوسيانيدينات باستخدام المذيبات العضوية المائية (Prior and Gu,2005) ويعد استخدام الاسيتون والميثانول مع نسب مختلفة من الماء مع او بدون الحامض الاكثر شيوعاً (Kennedy,2002) وقد اظهرت بعض الدراسات بأن الميثانول افضل مذيب لاستخلاص المركبات ذات الاوزان الجزيئية الواطئة بينما اتضح ان الاسيتون 70% ذو امكانية عالية في الاستخلاص الشامل للبروانثوسيانيدينات بضمنها البوليمرات (Prior and Gu,2005).

لاتستخدم خلات الاثيل وثنائي اثيل ايثر(diethyl ether) كمذيبي استخلاص لبذور العنب للاغراض التحضيرية والكمية اذ تعمل خلات الاثيل على استخلاص الكاتيكينات والبروسيانيدينات

قليلة الوحدات (oligomer procyanidins) بكميات قليلة بينما يعمل ثنائي اثيل ايثر على استخلاص الكاتيكينات فقط وبكميات قليلة ايضا (Sun and Sprager,2005) في حين يعد النظام المذيبي (الماء/خلات الاثيل) مثاليا لاستخلاص البروانثوسيانيدينات من بذور العنب للأغراض التحليلية (Liu and White,2012).

اما في مايخص المذيبات الحامضية فلا ينصح بأستخدامها نظرا لكفاءة الميثانول والاسيتون في الاستخلاص فضلا عن ان المذيبات الحامضية محفزة لتحلل البروانثوسيانيدينات خلال عملية الاستخلاص فضلا عن صعوبة ازالة الحامض من المستخلص النهائي ,كما ان عملية تركيز المستخلص النهائي لغرض تحليله بالطرائق الاخرى يزيد من خطر التحلل (Sun and Sprager,2005).

يعد الماء كمذيب استخلاص ذو اهمية في تحضير منتجات Procyanidins للصناعات الغذائية والصيدلانية لأنه غير سام كما انه يعطي حصيلة مقبولة من Procyanidins الا انه يتطلب طرائق تحليل اضافية للتخلص من البروتينات والسكريات المتعددة المصاحبة لعملية الاستخلاص , ان اختيار المذيب لأستخلاص الفينولات يعتمد على طبيعة الانسجة النباتية ونوع الفينول ويعتمد فيما اذا كان الهدف تحليلي او كمي (Sun and Sprager,2005) اذ يتحكم نوع المذيب "قطبيته" المستخدم بذائبية المركبات الفينولية كما هو شأن درجة البلمرة وتداخل الفينولات مع المكونات النباتية الاخرى لتشكل معقدات غير ذائبة (Naczk and Shahidi,2004) .

قارن Atale *et al.* (2011) الفعالية المضادة للأكسدة وكفاءة ومحتوى المستخلصات المختلفة لبذورنبات *Syzygium cumini* من البروانثوسيانيدينات والمركبات الاساسية الاخرى بأستخدام مذيبات عدة وتم الحصول على كميات وافرة من البروانثوسيانيدينات في مسستخلصي الايثانول والميثانول وكميات متوسطة منه في المستخلص المائي واقل منها في مستخلصي الكلوروفورم وثنائي اثيل ايثر(diethyl ether) في حين لم يسجل وجود البروانثوسيانيدينات في مستخلصي الهكسان(n-hexane) والبنزين (benzene) .

تعد تقنية الأستخلاص بمساعدة الموجات فوق الصوتية (Ultrasound-assisted extraction) غير مكلفة ,بسيطة ,مختزلة لدرجة حرارة التشغيل مما يساعد في استخلاص المركبات غير الثابتة حراريا ومن المزايا الاساسية الاخرى لهذه التقنية في الاستخلاص الصلب-السائل هي زيادة حصيلة الاستخلاص,لذا تعد طريقة بديلة لطرائق الاستخلاص التقليدية (Wang and Weller,2006) .

قام Chun-hui *et al.* (2008) بأستخلاص البروانثوسيانيدينات من التفاح بأستخدام تقنية Ultrasound وقارن النتائج مع الطرائق التقليدية الاخرى ,فقد كانت كمية البروانثوسيانيدينات المستخلصة 0.14 ملغم/ مل بأستخدام الايثانول 50% عند درجة حرارة 70م° ورقم هيدروجيني (pH=4) لمدة ساعتين بأستخدام Ultrasound في حين ادى استخدام الطرائق التقليدية الاخرى المتمثلة بأستخدام الايثانول 80% عند درجة حرارة 90م° ورقم هيدروجيني(pH=4) ولمدة ساعتين الى الحصول على البروانثوسيانيدينات بتركيز 0.126 ملغم/ مل مما يعني زيادة كفاءة الاستخلاص بنسبة 10.9% بأستخدام Ultrasound extraction وبدرجة حرارة اقل مع استهلاك اقل للمذيب.

اما تقنية Microwave extraction فتعد وسيلة بديلة للأستخلاص الصلب-السائل في استخلاص مواد الايض الثانوية من النباتات وقد استخدمت لأستخلاص المغذيات لأسباب عدة تتمثل في اختزال وقت الاستخلاص و استهلاك اقل للمذيب فضلا عن زيادة حصيلة الاستخلاص (Wang and Weller,2006) .

في دراسة تناولت المقارنة بين ثلاث طرائق لأستخلاص التانينات من نباتات الرازبيري *Rubus idaeus* *والسفرجل* *Cydonia oblonga* *والحميض* *Rumex acetosa* وجد بأن Microwave extraction افضل خيار لاستخلاص التانينات من المواد النباتية الجافة في حين اعطت طريقتي الاستخلاص under reflux و sonication نتائج متشابهة الا ان الكمية المستخلصة كانت اقل (Cobzac *et al.*,2005) .

درس Tao *et al.* (2011) تأثيرالرقم الهيدروجيني وتركيز الانزيم ودرجة الحرارة في انتاج البروانثوسيانيدينات من بذور العنب بأستخدام تقنية الأستخلاص بمساعدة انزيم السيليليز Cellulase-assisted extraction اذ تم الحصول على حصيلة مقدارها 3.37% عند الرقم الهيدروجيني (pH=4.4) وتركيز انزيمي 0.4 % ودرجة حرارة 47.8م°.

7-1 تنقية وتوصيف البروانثوسيانيدينات:-

ان الطبيعة الكيميائية للفينولات متنوعة من مركبات بسيطة الى عالية التبلمر والتي قد تتواجد بشكل معقدات مع الكربوهيدرات والبروتين والمكونات النباتية الاخرى ,لذلك فأن المستخلصات الفينولية للمواد النباتية تكون عادة مزيج من الاصناف المختلفة للفينولات الذائبة في نظام المذيب المستخدم مما قد يتطلب خطوات اضافية لازالة المواد غير الفينولية مثل الشمع والدهون والكلوروفيل والتربينات (Terpenes) (Nasczk and Shahidi,2004).

يعد التوليف بين الاستخلاص السائل – السائل وكروماتوغرافيا الادمصاص وسيلة فعالة في ازالة الشوائب (impurities) فأستخدام الكلوروفورم في الاستخلاص السائل –السائل فعالاً جداً في ازالة المركبات الذائبة بالدهون مثل الكاروتينويدات والكلوروفيل والزيوت والشموع اما خلات الاثيل فتعد فعالة جدًا في ازالة الوحدات الاحادية لـ flavan-3-ol والمتواجدة مع البروانثوسيانيدينات (Kenndy,2002) .

توجد طرائق عدة لتحديد وتوصيف البروانثوسيانيدينات الا ان التقنيات الخمسة الاكثر شيوعا هي تقنية HPLC و Gas chromatography و Carbon and Hydrogen Nuclear Magnatic Resonance (NMR) وتستخدم لاغراض تشخيصية (Identification purposes),و Near infrared spectroscopy وهي طريقة سهلة وغير متلفة قادرة على تحديد وقياس عدد معقد من المكونات الخاصة والعامة في كل من العينات السائلة والصلبة بضمنها المواد الصلبة المذابة (dissolved solid) و تراكيز الحامض و الكثافة و pH والتلوث المايكروبي والنسبة المئوية للمحتوى الزيتي والكاربوهيدرات و البروتين

والرطوبة كما ان هذه التقنية قادرة على تحديد تراكيز المكونات الكيميائية الخاصة , وتقنية طيف الكتلة Mass spectroscopy وتستخدم في تحديد التركيب الكيميائي , تعد تقنية HPLC الاكثر شيوعا في تحديد وجود مركبات البروانثوسيانيدينات في المستخلص بأستخدام التشخيص بالاشعة فوق البنفسجي (UV) اعتمادا على التداخلات غير التساهمية بين المركبات (Liu and White,2012).

تعد عملية ازالة البلمرة (depolymerization) بوجود الحامض والكواشف الباحثة عن النواة (Nucleophile) يتبعه التحليل بـ HPLC وسيلة مفيدة في تقدير كمية البروانثوسيانيدينات وتوصيفها فأزالة البلمرة تسمح بتحديد طبيعة وتركيز الوحدات الممتدة والوحدات الطرفية وتحديد متوسط درجة البلمرة (mDP) والنسبة المئوية للـ Galloylation (%G) في البروانثوسيانيدينات (Sun and Sprager,2005) .

اشار Martin *et al.*(2012) الى امكانية استخدام مطيافية الكتلة (MALDI-TOF/TOF) في تحليل البروانثوسيانيدينات من نبات القرفة *Cinnamomum zeylanicum* لاول مرة وقد كشفت هذه التقنية ان بروانثوسيانيدينات نبات القرفة اكثر تعقيدا مما كان يعتقد سابقا فقد بينت احتواء قلف القرفة على مزيج من Procyanidinsو Prodelphinidins و Propelargonidins .

تمكن Vivas *et al.* (2004) من أستخدام مطيافية الكتلة Thioacidolysis / liquid chromatography /electrospray ionization /mass Spectrometery (thioacidolysis /LC/ESA/MS) في تمييزوتحديد طبيعة وحدات Flavan-3-ol (الكاتكين والابي كاتكين لتانينات البروسيانيدين و Gallocatechine و Epigallocatechine لتانينات Prodelphinidine) ودرجة Galloylation ومتوسط درجة البلمرة للبروانثوسيانيدين في ساق وبذور وجلد العنب .

اما Abe *et al.*(2008) فقد نجح في توضيح تركيب البروانثوسيانيدينات رباعية وخماسية الوحدات الاحادية للتفاح غير الناضج بأستخدام تقنية Low temperature NMR عند درجة حرارة - 34م° فقد كان تركيب البرانثوسيانيدينات رباعية الوحدات :

epicatechin-(4β-6)-epicatechin-(4β-8)-epicatechin-(4β-8)-epicatechin

اما تركيب البرانثوسيانيدينات خماسية الوحدات فقد كان:

epicatechin-(4β-8)epicatechin-(4β-8)-epicatechin-(4β-8)-epicatechin- (4β-8)-epicatechin.

على الرغم من ان HPLC هي التقنية الشائعة لتحليل وتوصيف الفينولات الغذائية الا انه في السنوات الاخيرة تم التوجه لتقنية بديلة وهي Capillary electrophorsis (CE) وذلك بسبب الكفاءة العالية في الفصل والاستهلاك الاقل للمذيب والحاجة الى كمية صغيرة من النموذج فضلا عن سرعة الفصل التي تقتصر على دقائق عدة, ويشير مصطلح (CE) الى عدد من تقنيات الفصل ذات خصائص تشغيلية ومباديء فصل مختلفة , ومن الممكن استخدام هذه التقنية كوسيلة لتوصيف مزائج بوليمرات البروانثوسيانيدينات فهذه التقنية تعمل على الفصل السريع للمكونات التي مرت بعملية ازالة البلمرة (Depolymerization) بعد معاملتها بالسيستائين(Thiolysis) (Valls *et al.*,2009) .

8-1 العنب (Grape ,Grapevine)

الاسم العلمي : *Vitis vinifera* L.

اسم العائلة : العنبيات Vitaceae

يعد العنب واحداًمن اكثرالفواكه انتشاراً في العالم سواءً بشكله الطازج او بشكل عصير العنب والنبيذ والزبيب (Mencarelli and Di Renzo,2005), يضم العنب ثلاثة انواع رئيسة ,العنب الاوربي *V. vinifera* وعنب امريكا الشمالية *V. labrusca, V. rotundifolia* والهجين الفرنسي (Xia *et al.*,2010) .

يعد العنب الاوروبي *V. vinifera* من الانواع الرئيسة للعنب ويمثل 95% من الانتاج العالمي (Mencarelli and Di Renzo,2005). ينتشر العنب في آسيا وأمريكا الشمالية وأوروبا حيث الظروف المناخية القارية المعتدلة ومناطق البحر الابيض المتوسط والمناطق شبه الاستوائية (Terral *et al.*,2010).

اشجار العنب نباتات متعرشة بلحاء متقشر وجذع ضعيف متفرع الى اغصان طويلة يتطور منها اغصان ثانوية اوراقها متبادلة مفصصة وعريضة تتنوع احجامها بأختلاف ضروب العنب ,تكون ازهارها عناقيد متفرعة (1-3)عنقود لكل غصن (Reed,2009) ,ثمارها عنبية ,طرية ,بيضوية او كروية او اهليليجية الشكل , تحتوي على (2-3) بذور اوتكون لابذرية والجلد فيها اخضر او اصفر اواحمر او ارجواني-اسود ملتصق باللب (Duke,1998) .

توفر الاعناب خصائص غذائية وطبية عديدة فالعنب مصدر جيد للكاربوهيدرات (12-18)% , بينما تبلغ نسبة البروتينات والدهون[(0.5-0.6) و(0.3-0.4)]%,على التوالي , في حين يشكل الماء 82% كما تحتوي على كميات كبيرة من البوتاسيوم (0.1-0.2)% وكميات صغيرة من الكالسيوم (0.01-0.02)% والفسفور(0.01-0.08)%,فضلا عن احتوائه على بعض الفيتامينات والتي تشمل فيتامين C (0.01-0.02)% وفيتامين A (0.001-0.0015)% (Yadav *el al.*,2009) ,واشار Duke (1998) الى احتواء ثمار العنب على احماض المالیك (Malic acid) والتارتاريك (Tartaric acid) والراسميك (Racemic acid), كما تحتوي الثمار غير الناضجة على حامض الاوكزاليك (Oxalic acid) .

تحتوي بذور العنب على (60-70)% من فينولات العنب ,تتواجد بصورة مشتقات flavan-3-ol (Asi and hosseinzadeh,2009) فبذور العنب من المصادر الغنية بالبروانثوسيانيدينات (Banner Bio,2008) .

يظهر مستخلص البروانثوسيانيدينات لبذور العنب تشكيلة واسعة من الفوائد منها خصائص كابحة للجذور الحرة تفوق مضادات الاكسدة الشائعة مثل فيتامين E وC اذ يعمل على حماية الخلايا من الأكسدة الدهنية (Lipid peroxidation) وتجزؤ الـ DNA ويعمل على حماية القلب من

خـــلال الحفـــاظ علـــى وظـــائف عضـــلة القلـــب بعـــد نقـــص التروية و اعـــادة الضـــخ (Ischemia and Reperfusion), كما انه يبدي تأثيرا تآزريا مع الكروم متعدد النيكوتينيت (Chromium polynicotinate) لتقليل مستوى الكوليسترول الكلي ,كما يقوم هذا المستخلص بتثبيط نمو الخلايا السرطانية في حين يشجع نمو الخلايا البشرية الطبيعية ويحميها من سمية العلاج الكيميائي (Leigh and Jacen,2003) ,كما دلت التجارب المختبرية على ان مستخلصات بذور العنب العالية المحتوى بالبروانثوسيانيدينات يمكن ان تكون عوامل طبيعية واعدة في علاج تسوس جذورالاسنان (Wu,2009) .

9-1 نخلة التمر (Date palm) :-

تعد شجرة نخلة التمر من اقدم اشجار الفواكه المزروعة وقد اطلق عليها العرب اسم النخلة او شجرة الحياة (Tree of life) (Vyawahare *et al.*,2009).

نخيل التمرمن عائلة النخيليات Palmaceae (Arecaceae) ينتمي الى الجنس *Phoenix* والنوع .*dactylifera* L وفق تصنيف العالم السويدي الاصل لينيس(Linnaeus),وشجرة النخيل من النباتات ذوات الفلقة الواحدة ,ثنائية المسكن اواحادية الجنس ,كما يتميز نخيل التمرعن باقي الانواع في الجنس Phoenix بقابليته على انتاج الفسائل(غالب,2012).

تتصف ثمار النخيل الناضجة بكونها عبارة عن ثمرة لبية احادية البذرة يختلف شكلها بأختلاف الاصـــناف ويتفـــاوت طولهـــامن 20-110 مليمتـــر, يوجـــد فـــي التمورمالايقـــل عـــن 15 مـــن العناصرالمعدنية بنسب مختلفة منها البورون والكالسيوم والكوبالت والنحاس والحديد والمغنسيوم والمنغنيـز والفسفوروالصوديـوم والزنـك والفـلورين المهـم فـي حمـاية الاسنـان من التسـوس (Al-seeni,2012) والبوتاسـيوم (بمقـدار ضـعفين ونصـف الكميـة الموجـودة فـي المـوز) وتتميزالتمور بمحتـوى عـالي مـن السـكريات (50-60)%,كمـا تحتـوي علـى فيتامينـات B1,B2 والنياسين (Augstburger *et al.*,2002), بينما تحتوي على البروتينات والرماد والدهون بنسب [(2.3-3.85 و 2.15-3.46 و 0.1-0.46)]%,على التوالي , (Hasnaoui *et al.*,2010).

وتعد التمور من المصادر الجيدة لمضادات الاكسدة (11687-20604) مايكرومول (محسوبة على اساس مكافيء التروكس/غرام) والانثوسيانين والكاروتينويدات والاحماض الفينولية المرتبطة والحرة والفينولات (Al-Farsi *et al.*,2005).

اما نوى (بذور) ثمار النخيل فهي عبارة عن جسم صلب مستطيل الشكل اومجنح او مضلع في بعض الاصناف مدبب نوعا ماعند طرفيها تحتل عادة وسط الثمرة تقريبا ,ويكون احد سطحيها (الجانب الظهري) محدب فيه نقرة منخفضة صغيرة مستديرة تسمى النقير (Micropyle) موقعها يختلف بأختلاف الاصناف ,اما السطح الاخر (الجانب السطحي) فيه شق او حز (Furrow) او اخدود (Groove) تمتد على طول البذرة وقد يكون الحز او الاخدود واسعاً او ضيقاً او قد ينفرج عند احدى النهايتين او يضيق في الوسط او قد يكون غائراً وضحل ,اما ذنب البذرة فقد يكون مدبب او مستدق او مستدير حسب الصنف (غالب,2012).

تشكل البذور(النوى) نسبة (6-12)% من وزن الثمرة (Najafi,2011) عديمة الرائحة ذو لون بني فاتح الى غامق وطعم رتيب مع مرارة طفيفة, تحتوي على رطوبة وبروتين ودهون والياف حامضية (Acid detergent fiber) والياف متعادلة (Neuteral detergent fiber) ورماد بنسب [(7.1-10.3) و(5.0-6.3) و(9.9-13.5) و (46-15) و(65-69) و(1.0-1.8)] % ,على التوالي, (Hamada *et al.*,2002) وكمية عالية من الفينولات 3102-4430 مايكروغرام لكل 100غرام (Al-Farsi *et al.*,2006).

يستخدم نوى التمر في الوقت الحاضر كاعلاف للحيوانات (الماشية والاغنام والدواجن) ,كما يعد نوى التمر ذو قيمة غذائية جيدة نظرا لمحتواه من الالياف الغذائية المناسبة لتحضير المكملات الغذائية (Najafi,2011) فضلا عن استخدامه في تحضير القهوة والتي تعرف بـ "Date coffee" (Vyawahare *et al.*,2009).

كما اشير في دراسة سابقة الى دور مستخلص نوى التمر في استعادة الكبد المتسمم لوظائفه الطبيعية والحماية ضد تسمم الكبد بـ "رابع كلوريد الكاربون " في الفئران (Al-Qarawi *et al.*,2004) ,كما اشار(Kaiantaripour *et al.*(2012 الى دوره في الحماية من اضرار الذوي الدماغي (Cerebal ischemic).

الفصل الثاني

المواد وطرائق العمل

Materials and Methods

2- المواد وطرائق العمل

2-1 المواد و الاجهزة المستخدمة:

2-1-1 المواد الكيميائية المستخدمة و الشركات المصنعة لها:

ت	اسم المادة	الشركة المصنعة
1	المضاد الحيوي Gentamicin	Alpha-AleppoPharmaceutical Ind.-Syria
2	حامض الهيدروكلوريك (Hydrochloric acid) HCl	Analytical Rasayan
3	الفانيلين (Vanillin) $C_8H_8O_3$	Sigama-Aldrich
4	كاربونات الصوديوم Na_2CO_3	BDH
5	$K_2S_2O_8$ Potassium persulfate	BDH
6	كاتكين (+(–)Catechine hydrate) $C_{15}H_{14}O_6.H_2O$	Sigama-Aldrich
7	خلات الاثيل (Ethyl acetate) $C_4H_8O_2$	Fluka
8	ميثانول مطلق (Absolute Methanol) CH_3OH	GCC-UK
9	حامض الخليك الثلجي (Glacial acetic acid) CH_3COOH	GCC-UK
10	Folin Ciocalteu	GCC-UK
11	Folin Denis	GCC-UK
12	كحول الايزوبروبايل (Iso-propyl Alcohol)	Evans medical Ltc langhurst,Horshan, England
13	Mannitol Salt agar	Himedia-India
14	Nutrient broth	Himedia-India
15	Nutrient agar	Himedia-India
16	ABTS(2,2`-azinobis-3 ethylbenzothiazo	Himedia-India

	line 6-sulfonic acid)$C_{18}H_{24}N_6O_6S_4$	
Himedia-India	Muller Hinton agar	17
Himedia-India	حامض الكاليك (Gallic acid)	18
Sigama-Aldrich	Trolox	19
Merck-Germany	صفائح السيليكا	20
Pharmacia-Sweden	Sephadex LH-20	21
Scharlau- European Union	اسيتون C_3H_6O (Acetone)	22
Scharlau-European Union	ايثانول مطلق C_2H_5OH (Absolute Ethanol)	23
Schorlau- European Union	هيدروكسيد البوتاسيوم KOH	24
SEARLE	حامض الفورميكHCOOH	25
Thomas Baker-India	كلوريد الصوديوم NaCl	26

2-1-2 الاجهزة المستخدمة و الشركات المصنعة لها :

ت	اسم الجهاز	الشركة المصنعة
1	حا□نة (Incubator)	Binder – Germany
2	ميزان حساس (Sensitive Balance)	Denver – Germany
3	حا□نة (Incubator)	Fisher Scientific – Germany
4	جهاز تقطير (Distiller)	GFL-Germany
5	جهاز طرد مركزي (Centrifuge)	Hettich – Germany
6	ماصات دقيقة(Micropipettes)	Human-Germany
7	مضخة تفريغ (Vacuum pump)	Japan

8	هود بايلوجي (Laminar air flow cabinet)	Jeio-Tech-Korea
9	حا□نة هزازة (Shaker incubator)	Labtech-Korea
10	جهاز مزج ذو الصفيحة الساخنة (Hot plate Magnetic Stirrer)	Labtech-Korea
11	ثلاجة (Refrigerator)	LG-Korea
12	جهاز قياس الرقم الهيدروجيني (pH-meter)	Mauritius-Germany
13	مطحنة كهربائية (Coffee grinder)	Maximan-PRS
14	مازج(Vortex)	ROMA-Italy
15	ميزان عادي	Sartorius – Germany
16	جهاز المطياف الضوئي (Spectrophotometer)	Tudor – Korea
17	مؤصدة(Autoclave)	YX-280B-China

2-2 طرائق العمل :

2-2-1 النباتات المستخدمة في الدراسة :

استخدمت في هذه الدراسة اجزاء نباتية مختلفة لتسع نباتات تم الحصول عليها من الاسواق المحلية حسب ما هو موضح في الجدول (1) .

جدول (1): النباتات المستخدمة في الدراسة والاجزاء المستخدمة منها .

ت	الاسم المحلي	الاسم العلمي	الجزء المستخدم من النبات
1	الاس	***Myrtus communis* L.**	الاوراق
2	البرتقال	***Citrus sinensis* L.**	البذور و القشور
3	التمر	***Phoenix dactylifera* L.**	البذور
4	القمح	***Triticum aestivum* L.**	(القشور) النخالة
5	الرمان	***Punica granatum L.***	القشور
6	الشاي الاسود	***Camellia sinensis* L.**	الاوراق
7	العنب	***Vitis vinifera* L.**	البذور و الجلد
8	اللالنكي	***Citrus reticulate* L.**	القشور
9	الموز	***Musa acuminata* L.**	القشور

2-2-2 تهيئة النباتات للدراسة:-

نظفت الاجزاء النباتية المستخدمة في هذه الدراسة بماء الحنفية ثم جففت في الجو العادي اذ طحنت بعد ذلك مرات عدة و لحين الحصول على مسحوق ناعم من كل جزء نباتي.

2-2-3 استخلاص المواد الفينولية:-

استخدمت الطريقة الموصوفة من قبل Ahmed *et al.* (1998) في استخلاص المواد الفينولية من النباتات قيد الدراسة مع بعض التحوير وعلى النحو الاتي:

1- وضع7.5 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) .

2- وضعت الدوارق في حاضنة هزازة (Shaker)على درجة حرارة 35 م^0 بسرعة رج 100 دورة / دقيقة و لمدة 24 ساعة.

3- رشحت المستخلصات على مرحلتين الاولى باستخدام الشاش الطبي أما الثانية فكانت تحت التفريغ باستعمال مضخة تفريغ (Vacuum pump) وباستعمال ورق الترشيح.

4- أهمل الراسب في حين وضع الراشح في صواني معدنية (Trays) ,و تم تجفيفها جيداً بدرجة حرارة الغرفة. قشطت المستخلصات المذكورة بعد تمام جفافها و تم وزنها.

2-2-4 تقدير المواد القابلة للاستخلاص:-

تم حساب المواد القابلة للاستخلاص حسب الطريقة الموصوفة من قبل الخفاجي واخرين(2009) و كالاتي:

نسبة المواد القابلة للاستخلاص % ={ وزن المستخلص الجاف (غم)/ الوزن الاصلي لمسحوق النبات(غم) }×100

2-2-5 تقدير البروانثوسيانيدينات:-

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

عمل المنحنى القياسي للكاتكين:-

1- المحاليل المستخدمة:

- **محلول رقم (1)**- فانيلين (Vanillin) 1% :

حضر هذا المحلول بأذابة 1غم من الفانيلين في كمية من الميثانول المطلق واكمل الحجم الى100 مل بأستخدام الميثانول المطلق .

- **محلول رقم (2)-** حامض الهيدروكلوريك (HCl) 8% :

حضر هذا المحلول بأضافة 22.6 مل من HCl تركيز35.4% الى 77.4 مل ميثانول مطلق ثم مزج المحلول جيدا.

- **محلول رقم (3)-** محلول الكاتكين القياسي بتركيز 400 مايكروغرام/مل:

حضر هذا المحلول بأذابة 40 ملغم من الكاتكين في كمية من الميثانول المطلق و بعد اتمام عملية الاذابة اكمل الحجم الى 100 مل بالميثانول المطلق .

حضرت تراكيز متدرجة من الكاتكين (محلول رقم3) بحسب الجدول الاتي:

رقم الانبوب	حجم محلول الكاتكين (مل)	حجم محلول الميثانول المطلق (مل)	الحجم النهائي (مل)	التركيز النهائي(مايكروغرام/مل)
1	0.0	4	4	0.0
2	0.25	3.75	4	25
3	0.5	3.5	4	50
4	1	3	4	100
5	1.5	2.5	4	150
6	2	2	4	200
7	2.5	1.5	4	250
8	3	1	4	300
9	3.5	0.5	4	350
10	4	0.0	4	400

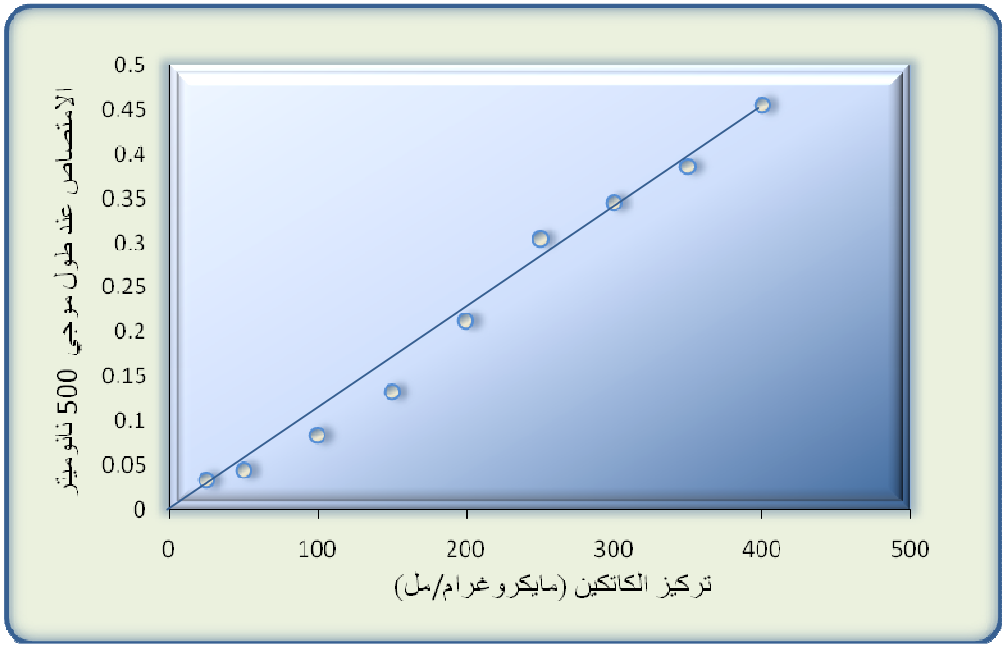
2- طريقة التقدير:-

1- اضيف 2.5 مل من الفانيلين 1% الى 1مل من كل تركيز من التراكيز المذكورة اعلاه الموضوعة في انابيب اختبار.

2- اضيف 2.5 مل من حامض الهيدروكلوريك 8% الى كل انبوبة اختبار و مزج المحلول جيدا.

3- حضنت النماذج في الحمام المائي لمدة 20 دقيقة بدرجة حرارة 30 م°.

4- تم قياس الامتصاص على طول موجي 500 نانوميتر لثلاث مكررات و رسم المنحنى القياسي لأمتصاص الضوء مقابل تركيز الكاتكين ,الشكل (2).



الشكل (2) : المنحنى القياسي لتقدير البروانثوسيانيدينات بأستخدام الكاتكين .

قدرت كمية البروانثوسيانيدينات في المستخلصات النباتية بطريقة عمل المنحني القياسي نفسها مع استبدال محلول الكاتكين القياسي بالمستخلص النباتي بعد تخفيفه الى التركيز المناسب.

6-2-2 تقدير التانينات :

قدرت كمية التانينات خلال مراحل الدراسة بأتباع الطريقة الموصوفة من قبل Khomdram and Singh (2011) مع بعض التحوير واعتمادا على المنحني القياسي للكاتكين (+(-)catechine) .

عمل المنحني القياسي :

1- المحاليل المستخدمة:

- **محلول رقم (1)**- محلول الكاتكين القياسي (100 مايكروغرام/مليلتر):

حضر هذا المحلول بأذابة 10 ملغم من الكاتكين في كمية من الميثانول المطلق و بعد اتمام عملية الاذابة اكمل الحجم الى 100 مل باستخدام الماء المقطر.

- **محلول رقم (2)** – محلول فولن- دنس 50% :

اضيف 5 مل من كاشف فولن-دنس الى5 مل ماء مقطر للحصول على تركيز50%.

- **محلول رقم (3)**- كاربونات الصوديوم بتركيز 7%:

اذيب 7 غم من كاربونات الصوديوم في كمية من الماء المقطر و بعد اتمام عملية الاذابة اكمل الحجم الى100 مل بالماء المقطر ايضا.

حضرت تراكيز متدرجة من محلول الكاتيكين (محلول رقم 1) بحسب الجدول الآتي:

رقم الانبوب	حجم محلول الكاتكين (مل)	حجم الماء المقطر (مل)	تركيز محلول الكاتكين (مايكروغرام/مل)
1	0.0	2.0	0.0
2	0.2	1.8	10
3	0.6	1.4	30
4	1.0	1.0	50
5	1.4	0.6	70
6	1.8	0.2	90
7	2.0	0.0	100

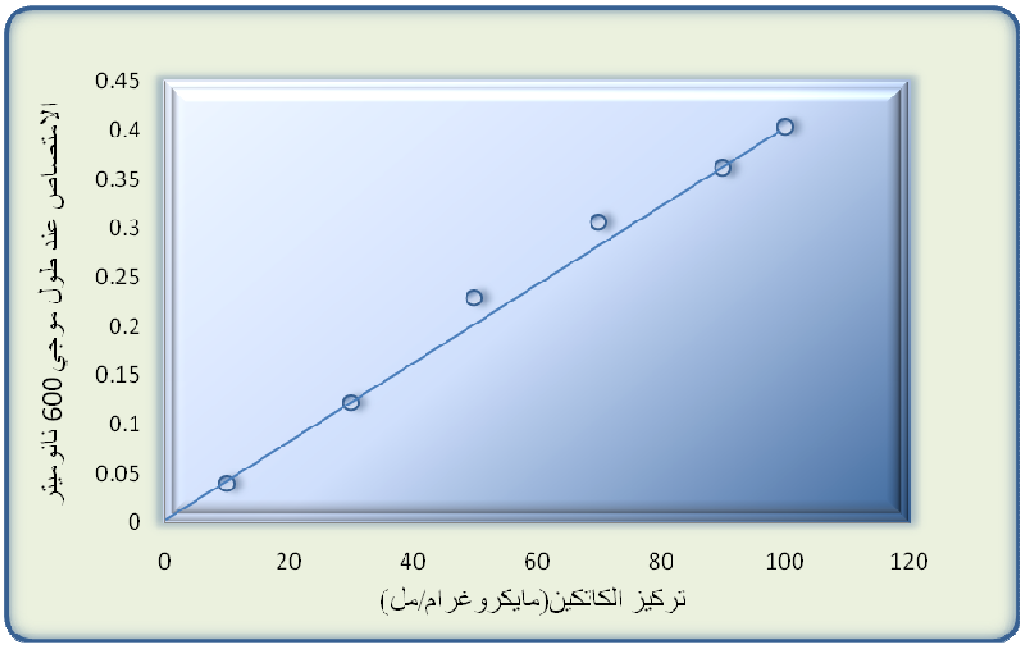
2- طريقة التقدير:

1- اضيف 7.5 مل ماء مقطر الى 1.0 مل من كل من التراكيز المذكورة اعلاه و وضعت في انابيب اختبار سعة 10 مل.

2- اضيف 0.5 مل من محلول فولن- دنس 50% الى كل انبوبة.

3- اضيف 1 مل من محلول كاربونات الصوديوم (7%) و اكمل الحجم بالماء المقطر ليصبح الحجم 10 مل.

4- حضن المزيج بدرجة حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة و تم قياس الامتصاص على طول موجي 600 نانوميتر,الشكل (3).



الشكل(3): المنحنى القياسي لتقدير التانينات بطريقة Folin -Denis .

تم تقدير كمية التانينات في المستخلصات النباتية بطريقة عمل المنحني القياسي نفسها و لكن بأستبدال الكاتكين بالمستخلص النباتي بعد عمل التخفيف المناسب له.

7-2-2 تقدير المحتوى الفينولي الكلي :

تم تقدير المحتوى الفينولي الكلي للمستخلصات النباتية بحسب الطريقة الموصوفة من قبل Budrat and Shotipruk (2008) مع بعض التحوير وحسب الاتي :-

عمل المنحنى القياسي :-

1- المحاليل المستخدمة :-

- **محلول رقم (1)**- محلول حامض الكاليك بتركيز 100 مايكروغرام/مل **:**

اذيب 10 ملغم من حامض الكاليك في كمية مناسبة من الماء المقطر و بعد اتمام الاذابة اكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر ايضا .

- **محلول رقم (2)**- محلول فولن- سيوكالتيو 50% :

اضيف 2 مل من كاشف فولن الى 2 مل ماء مقطر للحصول على تركيز 50% .

- **محلول رقم (3)**- كاربونات الصوديوم بتركيز 7%:

اذيب7 غم من كاربونات الصوديوم في كمية من الماء المقطر و بعد اتمام عملية الاذابة اكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر ايضا.

رقم الانبوب	حامض الكاليك(مل)	حجم الماء المقطر (مل)	التركيز النهائي (مايكروغرام/مل)
1	0.0	1.0	0.0
2	0.1	0.9	10
3	0.3	0.7	30
4	0.5	0.5	50
5	0.7	0.3	70
6	0.9	0.1	90
7	1.0	0.0	100

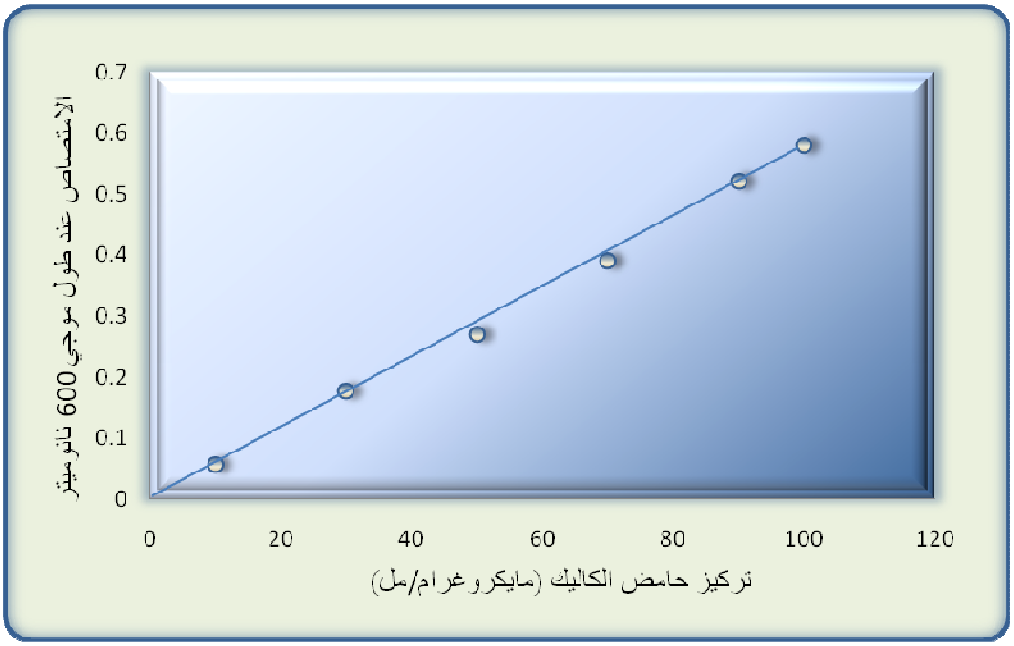
2- طريقة التقدير:

1- اضيف 7.5 مل ماء مقطر الى 1.0 مل من كل من التراكيز المذكورة اعلاه و وضعت في انابيب اختبار سعة 10 مل.

2- اضيف 0.5 مل من محلول فولن- سيوكالتيو الى كل انبوبة.

3-اضيف 1 مل من محلول كاربونات الصوديوم (7%) و اكمل الحجم بالماء المقطر ليصبح الحجم 10 مل.

5-حضن المزيج بدرجة حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة و تم قياس الامتصاص على طول موجي 600 نانوميتر (الشكل 4) .



الشكل (4): المنحنى القياسي لحامض الكاليك لتقدير الفينولات الكلية بطريقة folin- Ciocalteu .

تم تقدير المحتوى الفينولي الكلي للمستخلصات قيد الدراسة بالطريقة السابقة نفسها بأستبدال حامض الكاليك بالمستخلص النباتي بعد تخفيفه الى التركيز المناسب.

3-2 غربلة المستخلصات النباتية لأنتخاب الافضل منها :-

تم غربلة النباتات المشار اليها في الفقرة (2-2-1) لتحديد محتواها من البروانثوسيانيدينات ,وذلك بغية اختيار افضل نباتين لاستخدامهما في هذه الدراسة .

4-2 تقديرالفعالية المضادة للاكسدة :

قدرت الفعالية المضادة للاكسدة وفقا للطريقة الموصوفة من قبل Budrat and Shotipruk (2008) مع بعض التحوير بحسب الآتي :-

1- المحاليل المستخدمة :

- **محلول رقم** (1)- ميثانول 50%:

حضر هذا المحلول بأضافة 100 مل ماء مقطر الى 100 مل ميثانول مطلق.

- **محلول رقم (2)**- محلول هيدروكسيد البوتاسيوم (0.1M) :

حضر هذا المحلول بأذابة 0.5611 غم من هيدروكسيد البوتاسيوم في كمية من الماء المقطر و بعد اتمام عملية الاذابة اكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر ايضاً.

- **محلول رقم (3)**- محلول خلات البوتاسيوم (0.1M) :

تم تحضير هذا المحلول بمزج 0.6 مل من حامض الخليك الثلجي مع كمية من الماء المقطر و عدل الرقم الهيدروجيني الى 4.7 بأستعمال محلول هيدروكسيد البوتاسيوم (0.1M) ثم اكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر.

- **محلول رقم (4)**- محلول

(2,2`-azinobis-3 ethylbenzothiazoline6-sulfonic acid (ABTS)(1Mm)

والحاوي على [Potassium persulfate (2.45 mM)] :

حضر هذا المحلول بأذابة 0.066 غم من بيرسلفات البوتاسيوم في كمية من محلول خلات البوتاسيوم (0.1M) ثم اضيف 0.055 غم من الجذر ABTS الى المحلول و بعد اتمام عملية الاذابة اكمل الحجم الى 100 مل باستعمال محلول خلات البوتاسيوم.

1- طريقة التقدير :

1- تم عمل سلسلة من التخافيف للمستخلصات النباتية بأستعمال ميثانول 50% (انحصرت تراكيز المستخلصات بين 1ملغم/مل الى 5 مايكروغرام/مل).

2- خفف محلول ABTS ليعطي امتصاصا مقداره (0.7±0.02) عند طول موجي 734 نانوميتر بعد تصفير الجهاز بمحلول خلات البوتاسيوم المنظم , ثم اضيف 3 مل من المحلول اعلاه الى 0.3 مل من كل تركيز من تراكيز المستخلص النباتي.

3- رجت الانابيب باستخدام جهاز المازج (Vortex) و حضن المزيج بدرجة حرارة الغرفة لمدة 10 دقائق .

4- تم قياس الامتصاص بطول موجي 734 نانوميتر.

قدرت نسبة تثبيط الجذر ABTS بحسب المعادلة الاتية:

$$\mathbf{PI\ (\%) = [\ 1-(A_t / A_r)\ ] *100}$$

اذ ان A_t و A_r هما امتصاصيتي العينة و ABTS , على التوالي.

2-5 تحديد الظروف المثلى لاستخلاص البروانثوسيانيدينات من النباتين المنتخبين:-

2-5-1 تحديد درجة الحرارة المثلى للأستخلاص:

تم دراسة تأثير درجة الحرارة في استخلاص البروانثوسيانيدينات من النباتين المنتخبين 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 و الفعالية المضادة للأكسدة بالطرائق الموصوفة سابقاً.

2-5-2 تحديد مدة الاستخلاص المثلى:

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

3-5-2 تحديد سرعة الرج المثلى للأستخلاص:

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 فضلا عن الفعالية المضادة للأكسدة وذلك بعد إتمام عملية الاستخلاص و الترشيح و تجفيف النماذج .

4-5-2 تحديد المذيب الافضل للأستخلاص:

استخدمت مذيبات مختلفة لأستخلاص البروانثوسيانيدينات من النباتين قيد الدراسة اشتملت هذه المذيبات على : الايثانول والميثانول والاسيتون والايزوبروبانول وحامض الفورميك وخلات الاثيل فضلاًعن الماء المقطر، و اجريت عملية الاستخلاص كما ورد في الفقرة (3-2-2) , و بعد الحصول على المستخلص الجاف بشكله النهائي تم تقدير البروانثوسيانيدينات و التانينات و المحتوى الفينولي الكلي و الفعالية المضادة للاكسدة لجميع المستخلصات , فضلاً عن حساب نسبة المواد القابلة للاستخلاص.

5-5-2 تحديد التركيز الامثل من المذيب للأستخلاص:

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 , فضلاعن الفعالية المضادة للأكسدة .

6-2 الفعالية المضادة للبكتريا :

2-6-1العزلات البكتيرية المستخدمة في الدراسة :

استخدمت ست عزلات بكتيرية تم الحصول عليها من كلية العلوم/ قسم علوم الحياة /جامعة كربلاء وذلك لاختبار الفعالية التثبيطية للمستخلصات النباتية قيد الدراسة و العزلات هي:

جدول (2): العزلات البكتيرية المستخدمة في الدراسة .

ت	الاسم العلمي	الاستجابة لصبغة غرام
1	*Escherichia coli*	سالبة
2	*Proteus ssp*	سالبة
3	*Pseudomonas aeruginosa*	سالبة
4	*Staphylococcus aureus*	موجبة
5	*Streptococcus fecalis*	موجبة
6	*Streptococcus pyogens*	موجبة

2-6-2 الاوساط الزرعية المستخدمة:-

1-الوسط المغذي السائل (Nutrient broth):

حضر بحسب تعليمات الشركة المجهزة بأذابة 13 غم من الوسط في1 لتر من الماء المقطر , و تم تعقيم الوسط باستخدام جهاز المؤصدة بدرجة حرارة121م° و لمدة15 دقيقة و قد تم استخدام هذا الوسط لتنشيط العزلات البكتيرية.

2- الوسط المغذي الصلب(Nutrient agar):

حضر بحسب تعليمات الشركة المجهزة باذابة 28 غم في 1لتر من الماء المقطروسخن الوسط لضمان اذابته ثم قسم الوسط الى قسمين : وزع القسم الأول (500 مل) في أنابيب اختبار , بينما ترك القسم الثاني (500 مل) المتبقية في الدورق الذي حضر فيه أصلاً . عقم الوسط باستخدام المؤصدة وبعد إكمال عملية التعقيم وضعت الأنابيب الخاصة بالقسم الأول بشكل مائل لعمل (Slants) بينما برد القسم الثاني الى درجة 45-50°م وتم صبه في أطباق بتري معقمة . و قد استخدمت الاطباق للتأكد من نقاوة العزلات البكتيرية و لتنمية بكتريا *P. aeruginosa* بينما استخدمت انابيب الاختبار لحفظ العزلات.

3- وسط Mannitol Salt agar:

حضر بحسب تعليمات الشركة المجهزة بأذابة111 غم في1 لتر ماء مقطر و عقم بالمؤصدة , و تم صبه في اطباق بتري و قد استخدم هذا الوسط لتنمية بكتريا *Staphylococcus aureus*.

4- وسط Muller Hinton agar :

حضر بحسب تعليمات الشركة المجهزة بأذابة 38 غم في 1 لتر من الماء المقطر, و عقم باستخدام المؤصدة , وتم صبه في أطباق بتري معقمة , و قد تم استخدام هذا الوسط لغرض اختبار الفعالية التثبيطية للمستخلصات النباتية ضد البكتريا.

5- المحلول الملحي الفسيولوجي :

حضر باذابة 0.85 غم من كلوريد الصوديوم في 50 مل ماء مقطر , وبعد اتمام عملية الاذابة اكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر ايضاً.

3-6-2 تحضير اللقاح :

استخدم الوسط المغذي السائل لغرض تحضير اللقاح , اذ وزع الوسط في انابيب اختبار بواقع 10 مل لكل انبوبة وعقم بالمؤصدة . وحضر اللقاح لكل عزلة بكتيرية بنقل قطعة من الاكار ذات قطر5 ملم من كل عزلة من العزلات المنماة على وسط المغذي الصلب بعد التاكد من نقاوتها(كلا على انفراد) الى الانابيب المخصصة لها وحضنت الانابيب بدرجة حرارة 37 درجة مئوية ولمدة 24 ساعة .

4-6-2 الفعالية التثبيطية للمستخلصات النباتية □د البكتريا:

تم اختبار الفعالية التثبيطية لمستخلص الاسيتون 70% لبذور العنب ونوى التمر ضد ست عزلات بكتيرية والمبينة في الجدول رقم(2) وبتركيز (1 و 5 و10 و 15 و 25) ملغم/مل وفق طريقة الأنتشار في الاكار بوساطة الحفر (Egorove ,1985) بحسب الآتي :-

1- تم عمل سلسلة من التخافيف العشرية لكل عزلة بكتيرية و لغاية الحصول على التخفيف المناسب لكل عزلة منها.

2- سحب 0.1 مل من التخفيف المناسب لكل عزلة بكتيرية , و اضيف الى اطباق حاوية على 20 مل من وسط Muller Hinton agar , الصلب وتم نشره جيداً على سطح الطبق بوساطة الناشر L-Shape و تركت الاطباق مدة ساعة في الثلاجة .

3- تم عمل حفر على سطح الاكار باستخدام الثاقب الفليني ذو قطر 5 ملم بحيث كانت المسافة متساوية بين حفرة و اخرى.

4- خففت المستخلصات النباتية بالمحلول الملحي الفسيولوجي (Normal saline) للحصول على تراكيز متدرجة تراوحت بين (1- 25) ملغم/مل.

5- وضع (40) مايكروليتر من كل تركيز من تراكيز المستخلصات قيد الدراسة في كل حفرة , و حضنت لمدة ساعة في الثلاجة , و من ثم حضنت في الحاضنة بدرجة 37 مئوية لمدة 24 ساعة, و تم استخدام المضاد الحيوي Gentamicin كسيطرة موجبة .

6- تم قياس اقطار تثبيط نمو البكتريا (ملم) باستعمال المسطرة بعد اكتمال فترة الحضن.

2-6-5 حفظ العزلات البكتيرية:

تم حفظ العزلات البكتيرية و ذلك بزرعها في انابيب اختبار مائلة (Slants) حاوية على الوسط المغذي الصلب , وحضنت لمدة 18 ساعة لتنميتها في درجة حرارة 37 درجة مئوية و بعدها حفظت بالثلاجة, اذ يتم تجديد المزارع كل شهرين.

2-7 التنقية الجزئية للبروانثوسيانيدينات من بذور العنب ونوى التمر :

تمت تنقية البروانثوسيانيدينات من الاجزاء النباتية للنباتين قيد الدراسة باتباع طريقة تنقية التانينات الموصوفة من قبل (2007).Al-Ghanimi *et al* وفق للآتي :-

تم استخلاص البروانثوسيانيدينات من بذور العنب ونوى التمر باستخدام 70% اسيتون, وحسب طرائق الاستخلاص الموصوفة سابقاً, ثم خضع المستخلصان لخطوات التنقية الاتية :-

1- الاستخلاص بالايثانول 95%

وزن 1غم من كل مستخلص نباتي (متحصل عليه من الخطوة الاولى) و تمت اذابته في 5 مل من الايثانول 95% (كلا على انفراد) و تم رج المزيج جيداً , اعقب ذلك اجراء عملية طرد مركزي للنماذج بسرعة 5000 دورة/دقيقة و لمدة 5 دقائق , اذ اهمل الراسب في حين احتفظ بالراشح لاستخدامه في خطوة التنقية التالية. و جرت عملية تقدير البروانثوسيانيدينات وفق الطرائق الموصوفة سابقاً.

2- كروماتوغرافي الادمصاص باستخدام الهلام Sephadex LH-20:

أ- تهيئة الهلام Sephadex LH-20 :

وزن 20 غم من الهلام Sephadex LH-20 و اضيف له 250 مل من الايثانول 95% للسماح له بالانتفاخ , و اجريت تبديلات عدة للمذيب , كما تم اجراء ترشيح تحت التفريغ للهلام لضمان طرد الغازات , و اخيراً اعيدت عملية وضع الهلام في الايثانول 95% و تم صبه في عمود زجاجي بابعاد (2×16) سم , و اجريت له موازنة لليوم التالي بالمذيب ذاته اذ أصبح العمود جاهزا لعملية الفصل.

أ- اضافة النموذج :

اضيف 4 مل من كل راشح نباتي خارج من خطوة التنقية بالايثانول 95% الى سطح عمود الهلام Sephadex LH-20 و جرت عملية الفصل بمرحلتين هما:-

1) مرحلة الغسل (Wash)

تم غسل العمود بما يعادل ضعفي حجمه باستخدام الايثانول 95% و ذلك للتخلص من جميع المواد غير المرتبطة بالهلام, اذ تم جمع الاجزاء بواقع (3) مل لكل جزء و بسرعة جريان مقدارها 1 مل/دقيقة.

2) مرحلة الاسترداد (Elution)

تم استرداد البروانثوسيانيدينات من الهلام بتغيير المذيب و ذلك باستخدام الاسيتون 70% بدلاً من الايثانول 95% و جرت عملية الاسترداد بجمع الاجزاء بواقع 3 مل لكل جزء و بسرعة جريان مقدارها 1 مل/دقيقة ايضا.

قدرت البروانثوسيانيدينات و الفينولات الكلية لكل جزء من الاجزاء المستردة بالطرائق السابق وصفها, و رسمت العلاقة بين كمية البروانثوسيانيدينات و كذلك الفينولات الكلية مقابل ارقام الاجزاء الـ (.Fractions No) .

وأخيرا جمعت الاجزاء الحاوية على البروانثوسيانيدينات و تم قياس حجمها و تقدير كمية البروانثوسيانيدينات فيها .

8-2 فصل البروانثوسيانيدينات المنقاة من بذور العنب ونوى التمر بطريقة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) :-

استخدمت الطريقة الموصوفة من قبل Karamać *et al.* (2005) في فصل البروانثوسيانيدينات المنقاة من بذور العنب ونوى التمر بطريقة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC).

- **المواد و المحاليل المستخدمة**

1-محلول رقم(1)- مزيج مذيبات الفصل (ماء مقطر: ميثانول مطلق : كلوروفورم) **:-**

حضر هذا المحلول بمزج 10 مل من الماء المقطر مع 35 مل من الميثانول المطلق مع 65مل من الكلوروفورم.

2- محلول الاظهار : Vanillin/HCl

حضر 100 مل من هذا المحلول بمزج 80 مل من الميثانول المطلق مع 20 مل من حامض الهيدروكلوريك مع 4 غم من الفانيلين.

3- صفيحة سيلكا بابعاد (20×20) سم

4- حوض ترحيل (Tank)

تم تحميل الصفيحة بـ (5) مايكروليتر من البروانثوسانيدينات المنقاة من المستخلصين قيد الدراسة (كلا على انفراد) , فضلاً عن الكاتكين القياسي , اذ تم تحميل النماذج على خط مواز للحافة السفلى للصفيحة و يبعد عنها مسافة 3 سم , اما المسافة بين النماذج و الحواف الجانبية للصفيحة و كذلك بين نموذج واخر فكانت2 سم.

وضعت بعد ذلك الصفيحة في حوض الترحيل الحاوي على محلول رقم (1) , و تمت مراقبة سريان المذيب و تم ايقاف عملية الفصل عند وصول المذيب الى مسافة تبعد1 سم عن الحافة العليا للصفيحة اذ تم اخراج الصفيحة و تركت تجف بجو الغرفة. تم رش الصفيحة برذاذ من محلول الاظهار , و بعد جفافها بشكل كامل تم تحديد مواقع البقع (spots) المفصولة , و تم قياس المسافة التي قطعتها البقعة و كذلك المسافة التي تحركها المذيب لحساب قيمة الحركة النسبية R_f و كما يأتي:

R_f = المسافة التي قطعها النموذج/ المسافة التي قطعها المذيب

الفصل الثالث

النتائج والمناقشة

Results and Discussion

3- النتائج والمناقشة

3-1غربلة المستخلصات النباتية من حيث محتواها من البروانثوسيانيدينات:-

اجريت عملية الغربلة لأثني عشر مستخلصاً نباتياً لتحديد الأكثر منها محتوى من البروانثوسيانيدينات اذ اشتملت المستخلصات المذكورة على قشور كل من اللالنكي والموز والرمان والبرتقال واوراق الاس وبذور كل من البرتقال والعنب ونوى التمر قبل الطبخ وبعده فضلا عن جلد ثمرة العنب ونخالة الحنطة وبثل الشاي الاسود,وقد اظهرت النتائج الموضحة في الجدول (3) وجود فروقات واضحة بين المستخلصات المدروسة,اذ تصدر مستخلصا بذور العنب ونوى التمر قائمة المستخلصات المدروسة فقد كانتا الاغنى في محتواهما من البروانثوسيانيدينات بتركيزين مقدارهما (5.58 و9.03) ملغم/ غم,على التوالي.

ويوضح الجدول نفسه ان مستخلصات نخالة الحنطة وقشور الموز وبذور البرتقال فقيرة بمحتواها من البروانثوسيانيدينات بأعطائها اقل التراكيز والتي بلغت(0.0072 و0.008 و 0.009) ملغم/غم للمستخلصات المذكورة,على التوالي,بينما اعطى مستخلصا قشور الرمان وبثل الشاي تراكيز متوسطة بلغت (1.54 و3.72) ملغم/غم ,على التوالي,ايضا.

وعند التمعن في الجدول (3) يلاحظ انحصار كمية البروانثوسيانيدينات بين (0.0072- 9.03) ملغم/غم ,وتعد النتيجة المستحصل عليها من هذه الدراسة اقل مما وجده Buyukcapar and Kamalak (2007) والذي بين ان كمية البروانثوسيانيدينات تراوحت مابين (6.03-28.41) غم/كيلوغرا مادة جافة,وذلك في دراسة شملت عددا من بذور البقوليات المستخدمة كأعلاف في تغذية الاسماك,في حين حصل Karonen *et al.*(2006) على تراكيزاعلى من البروانثوسيانيدينات بلغت (44-145) ملغم/غم وذلك عند دراسة محتوى وتركيب البروانثوسيانيدينات في مستخلصات اوراق تسعة انواع لنبات البتولا.

وكانت نتائج بذور العنب والشاي مقاربة لما وجده Hosseinian *et al.* (2007) في مستخلصات ستة فواكه اشتملت على Berries وchoke cherries وsea buckthorn, اذ

تراوحت تراكيز البروانثوسيانيدينات بين (504.77-275.55) ملغم/100غم .فضلا عن نتائج بذور العنب و نوى التمر المقاربة لكمية التانينات المكثفة في سبع وعشرين نوعاًمن الكونولا وأحد

جدول (3): المحتوى من البروانثوسيانيدينات لبعض المستخلصات النباتية .

ت	النبات	الجزء المستخدم	البروانثوسيانيدينات (ملغم/غم)	نسبة المواد القابلة للاستخلاص(%)
1	الاس	اوراق	0.113	16.4
2	البرتقال	قشور	0.016	15.3
3	البرتقال	بذور	0.009	5.5
4	التمر	نوى	9.03	7.2
5	التمر	نوى (مطبوخ)	0.25	3.3
6	القمح	قشور(النخالة)	0.0072	4.5
7	الرمان	قشور	1.54	20.8
8	الشاي الاسود	اوراق (مغلية)	3.72	2
9	العنب	بذور	5.58	5.7
10	العنب	جلد	0.019	33
11	اللالنكي	قشور	0.038	11.6
12	الموز	قشور	0.008	21.06

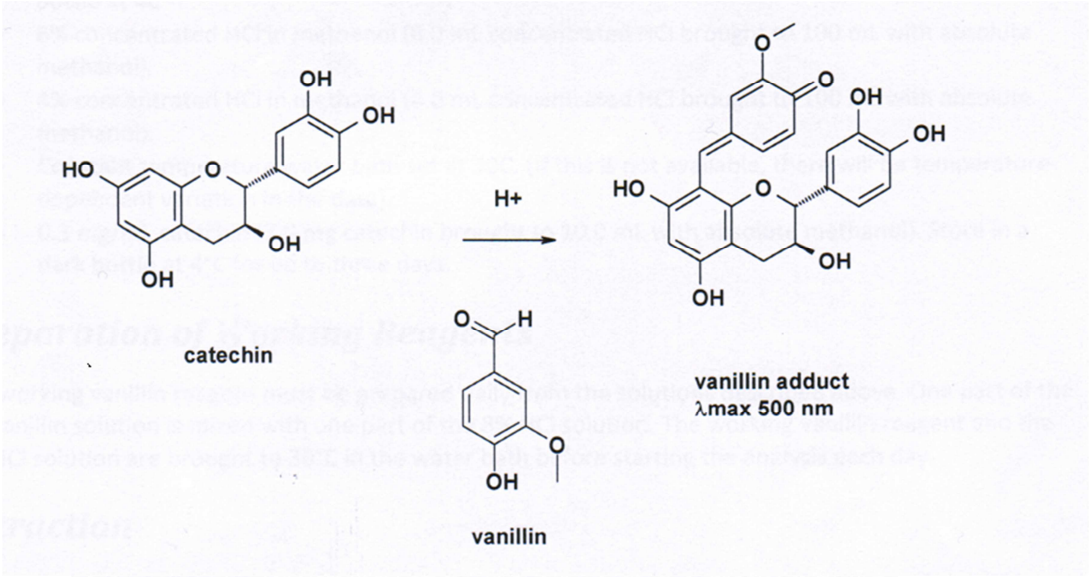
انواع الخردل الهندي اذ تراوحت التركيز بين (0.59-1.53) غم/100غم ,وقد تبين ان التذبذب في تركيز التانينات مصاحبا لتغاير الكلوروفيل وحامض الفايتيك (phytic acid) بين الانواع المختلفة والذي يمكن ان يعزى الى التأثيرات المناخية ومرحلة النضج اوالتداخل بين هذه العوامل (Khattab *et al*.,2010) .

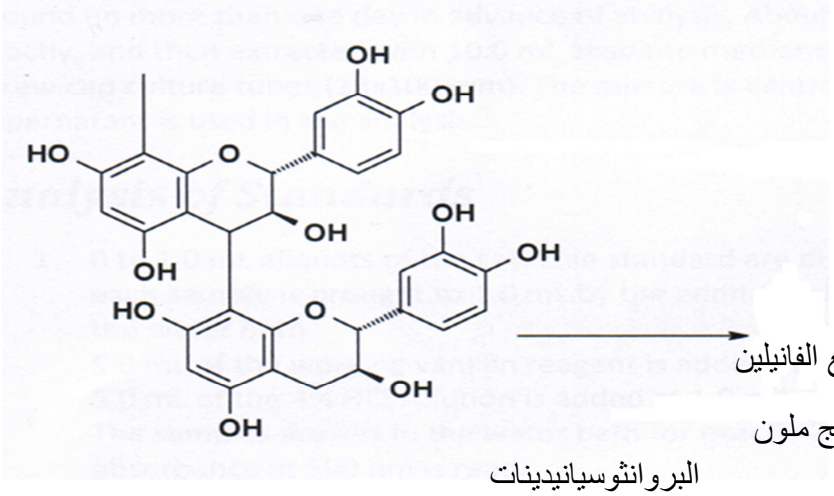
ان محتوى بذور وجلد العنب من البروانثوسيانيدينات مقارب لمحتوى مستخلصات اوراق وسيقان نبات *Celtis africana* والذي بلغ (0.21±0.37 و0.25± 4.58) ملغم/غم وزن جاف,على التوالي,محسوبة على اساس الكويرستين (Adedapo et al,2009), واقل من محتوى قلف وابر (needles) الصنوبر.*Pinus cembra* L اذ بلغ (74.3 و12.7) ملغم/غم من المستخلص محسوبة على اساس السيانيدين (Apeteri *et al*.,2011) , كما حصل Busse-Valverde *et al*. (2010) على تركيز اقل من البروانثوسيانيدينات في جلد العنب لثلاثة انواع مقارنة مع كمية البروانثوسيانيدينات في بذور هذه الانواع الثلاثة ,وانه من المتوقع امتلاك كل مكون من النواتج الثانوية للعنب تراكيب فينولية مختلفة,كما يتضح ان المستخلصات المأخوذة من اجزاء مختلفة لنبات العنب تمتلك خصائص مختلفة كل منها يمثل سمة للجزء المأخوذ منه (الجلد ,البذور اوالساق) (Pinelo *et al*.,2005) .

كما يظهرالجدول (3) تباين المستخلصات النباتية من حيث نسبة المواد القابلة للاستخلا ,فقد تميزت مستخلصات جلد العنب وقشورالموزوالرمان بأعلى نسبة بلغت (33 و 21.06 و20.8)%,على التوالي, بينما اظهرت مستخلصات الشاي ونوى التمرالمطبوخ والنخالة اوطأ نسبة بلغت (2 و3.3 و4.5)% ,على التوالي, ويمكن ان يعزى هذا التباين في النسب الى الاختلاف في توفر المواد القابلة للاستخلا نظرا للتغاير في التركيب الكيميائي للنبات (Senthilkumar *et al*.,2012).

وفي ضوء نتائج تقدير البروانثوسيانيدينات للنباتات المدروسة فقد تم اختيار بذور العنب ونوى التمرللدراسة اللاحقة,ولابد من التنويه الى ان نوع العنب الذي استخدمت بذوره في هذه الدراسة يعرف محليا بأسم الحلواني بينما يعود النوى الى التمر الزهدي.

ومما يجدر الأشارة اليه ان الطريقة المستخدمة في تقدير البروانثوسيانيدينات في هذه الدراسة هي Vanillin-HCl وتعد هذه الطريقة طريقة حساسة ,بسيطة نسبيا ومتخصصة بـ flavan-3-ols dihydrochalcones, والتانينات المكثفة المعقدة, وان الفلافانول (Flavanol)على عكس غالبية الفينولات الطبيعية يتفاعل مع الفانيلين في وسط حامضي ليسفر عن ناتج ملون بقيمة امتصا عظمى عند الطول الموجي 500 نانومتر(Muchuweti *et al.*,2005) ,ويمكن توضيح ذلك في الشكل (5).





يتفاعل مع الفانيلين

ليعطي ناتج ملون

البروانثوسيانيدينات

الشكل(5):تفاعل Vanillin-HCl (Hagerman,2002).

يفضل استخدا الفانيلين (ميثانول) في عملية التقدير لسببين ,الاول: ان اختبار الفانيلين (الميثانول) غير حساس للميثانول الموجود في المستخلص, والثاني: ان الوحدات الاحادية التي قد تكون متواجدة في المستخلصات النباتية ذات استجابة قليلة في هذا التقدير فتعطي لوناً اضعف مقارنة بالبوليمرات وبذلك يكون التداخل اقل (Hagerman,2002).

2-3 تحديد الظروف المثلى لاستخلاص البروانثوسيانيدينات والتانينات والفينولات من بذور العنب ونوى التمر.

يعد الاستخلا بالمذيبات من اكثر الطرائق المستخدمة شيوعاً في تحضير المستخلصات من المواد النباتية,وذلك لسهولة استخدامها وكفائتها وقابليتها التطبيقية الواسعة,ويعتمد ناتج الاستخلا الكيميائي على نوع المذيب وقطبيته ودرجة حرارة ومدة الاستخلا ونسبة النموذج الى المذيب فضلاًعن التركيب الكيميائي والخصائص الفيزيائية للنموذج (Dai and Mumper,2010) كما تعتمد كفاءة عملية الاستخلا على الاهتزاز الميكانيكي (Kim and Lee,2002) .

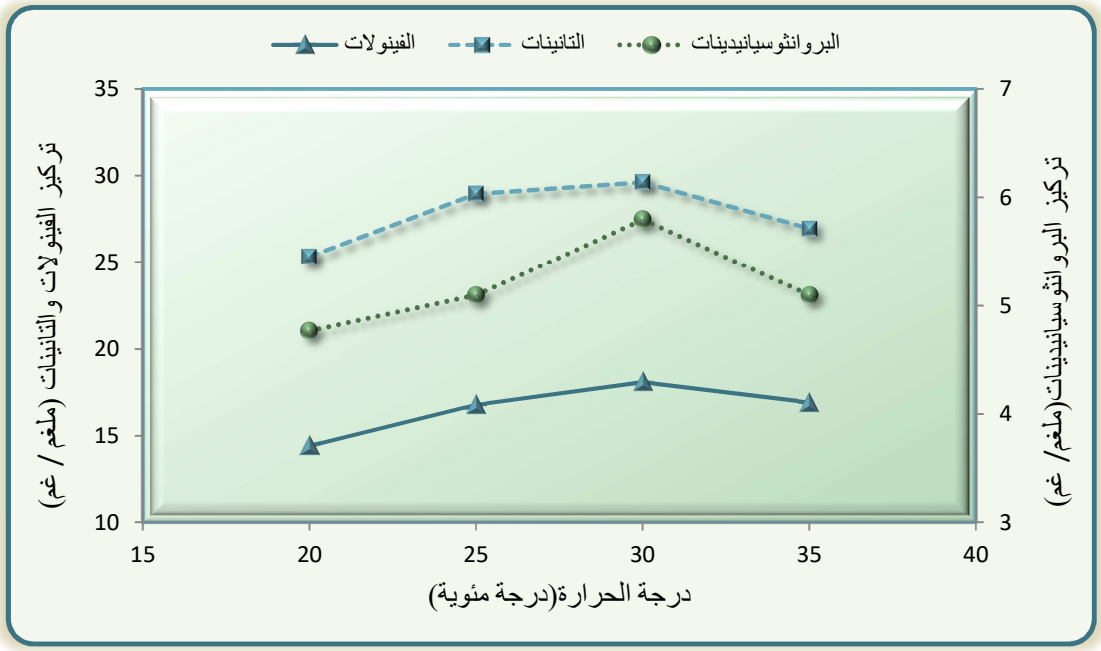
1-2-3 تأثيردرجة حرارة الأستخلاص:-

يتم اختيار درجة حرارة الاستخلا لتحقيق افضل توازن للمنتج من حيث الذائبية والانتقائية وضغط بخار المذيب وانتشار المذاب فضلا عن التحسس اللوني للمنتج (Lokeswari and Sujatha,2011).

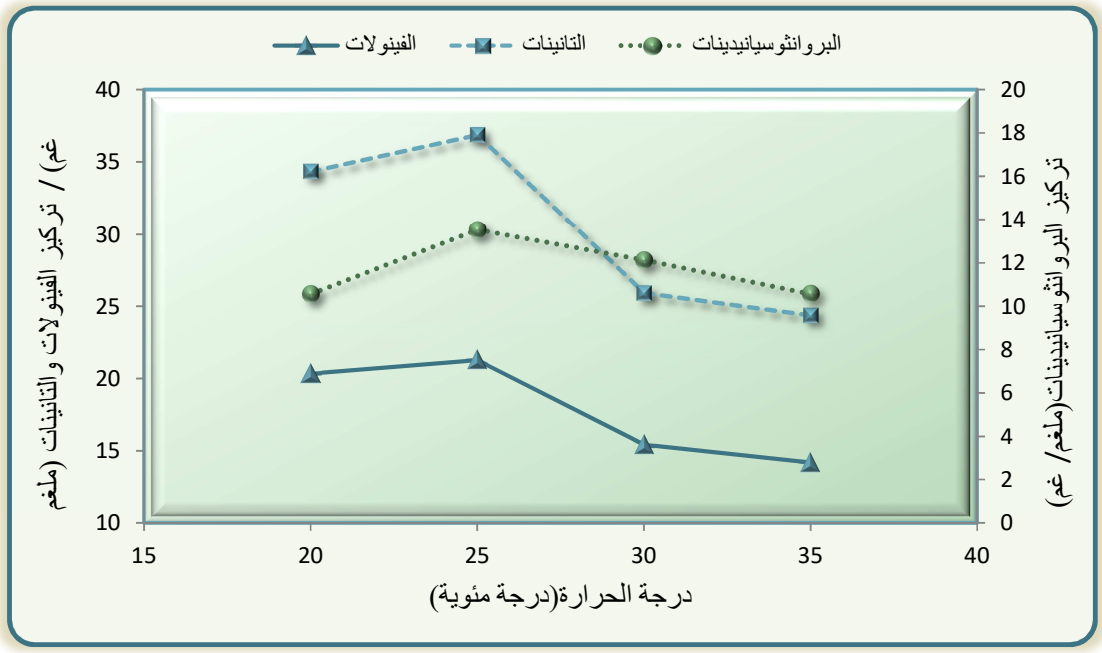
تم دراسة تأثير اربع درجات حرارية (20 و25 و 30 و35)° لاستخلا البروانثوسانيدينات والتانينات والفينولات الكلية من بذور العنب ونوى التمربأستخدا الميثانول 50% كمذيب استخلا اذ استخدمت الحاضنة الهزازة بسرعة رج 100 دورة/دقيقة لمدة 24 ساعة ,ويبين الشكلان 6 و7 ان افضل درجة حرارة لاستخلا بذور العنب 30° اذ بلغ تركيز البروانثوسيانيدينات والتانينات والفينولات (5.8 و18.09و29.62) ملغم/غم ,على التوالي , في حين كانت درجة الحرارة 25° هي

الافضل لاستخلاصها من نوى التمراذ بلغت التراكيز (13.52و21.285 و36.868) ملغم/غم للمركبات المذكورة سابقاً,على التوالي, كما يتضح من الشكلين (6 و7) انخفاض تراكيز المركبات المدروسة لكلا المستخلصين عند ارتفاع درجة حرارة الاستخلا .

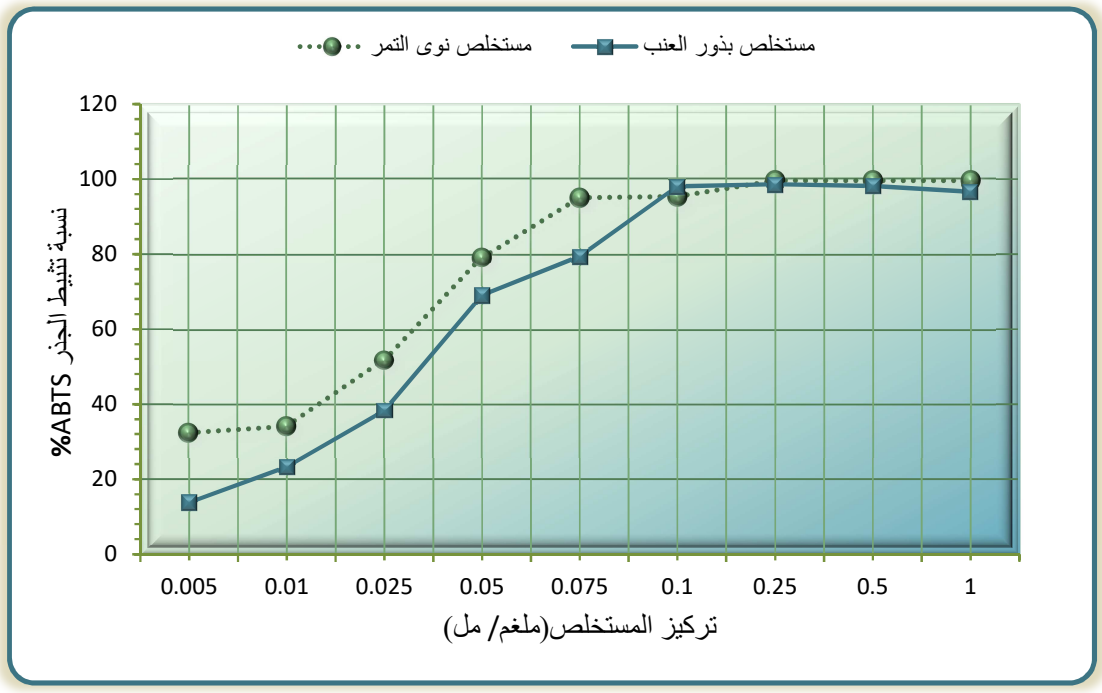
ابدى مستخلص بذور العنب عند درجة حرارة 30 فعالية مضادة للاكسدة عند التركيز0.05 ملغم/مل اذ كانت قيمة IC_{50} عند هذا التركيز69.02 %في حين ابدى التركيز0.025 ملغم/مل لمستخلص نوى التمر عند درجة حرارة 25 فعالية مضادة للاكسدة وكانت نسبة تثبيط الجذر(IC_{50}) 52%, الشكل (8).



الشكل (6): تأثير درجة الحرارة في استخلاص الفينولات الكلية و التانينات و البروانثوسيانيدينات من بذور العنب .



الشكل (7): تأثير درجة الحرارة في استخلاص الفينولات الكلية و التانينات و البروانثوسيانيدينات من نوى التمر.



الشكل(8):الفعالية المضادة للاكسدة لمستخلصي بذورالعنب ونوى التمرالمستخلصين عند درجتي حرارة (30 و25)□° على التوالي.

ان الزيادة في درجة الحرارة تحفز ذوبان المواد المراد تحليليها فضلا عن انخفاض اللزوجة والشد السطحي للمذيبات عند درجات الحرارة الاعلى والتي تساعد المذيب للوصول الى النسيج النباتي مما يؤدي الى تحسين معدل الأستخلا (Dai and Mumper,2010).

تعد درجة الحرارة المثلى المستحصل عليها من نتائج دراستنا مقاربة لما وجده Bharathi *et al.*(2011) اذ كانت درجة الحرارة 26.18 هي الاكفأ في استخلا المركبات الفينولية من نبات *Avicennia marina* .ان درجة الحرارة العالية تحفز اكسدة الفينولات المتعددة (Yang *et al.*,2009), اذ اوضح Galanakis *et al.* (2010) بأن المعاملة الحرارية الاولية عند درجة الحرارة 50-60 ^{o} تعمل على تنشيط انزيم Polyphenol oxidase (PPO) مما يقلل من تركيز الفينولات وبالتالي الفعالية المضادة للاكسدة.

وجد Uma *et al.*(2010) ان درجة الحرارة 39.57 ^{o} هي الامثل لاستخلا 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 55 ^{o} وهذا يزيد من كلفة الاستخلا من وجهة النظر الصناعية,ان التبخر يجعل نظا مذيب الاستخلا اكثر تركيزا والتراكيز العالية ستزيد من ارتفاع محتوى المذيب العضوي مما يقلل القطبية وبالتالي يربك عملية استخلا الفينولات ,لذلك يفضل اختيار درجات الحرارة المتوسطة (25 و35 و 45) ^{o} كأقل واوسط واعلى المستويات ,على التوالي.

ان درجات الحرارة العالية تحفز التحلل المائي والاستخلا 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 (Lokeswari and Sujatha,2011).

لاتتفق النتائج المستحصل عليها من هذه الدراسة مع نتائج Moosophin *et al.*(2010) اذ حصل على اعلى تركيز للتانينات عند درجة حرارة 80 ^{o} من قشرة mangosteen كما اتفق معه Bucić-Kojić *et al.*(2011) بأن 80 ^{o} افضل درجة حرارة لأستخلا 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:-

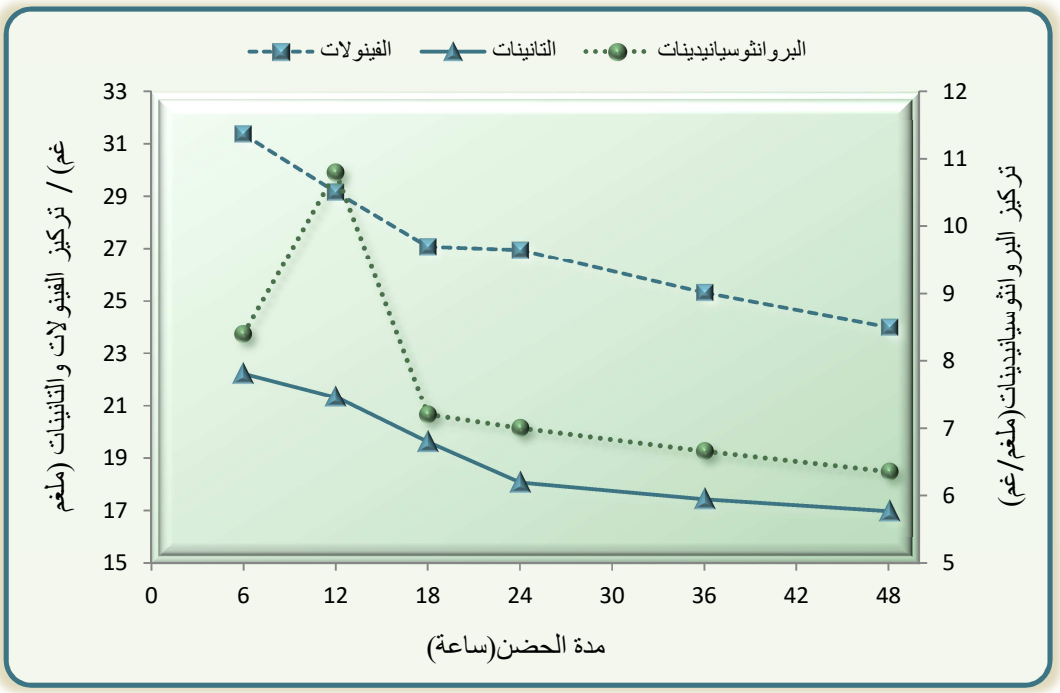
تم حضن المستخلصات النباتية لبذورالعنب ونوى التمر عند درجة الحرارة المثلى لاستخلا البروانثوسيانيدينات من كل منهما لست فترات حضن (6 و12 و18 و24 و36 و48) ساعة .

ابدى مستخلص بذور العنب اختلافا في المدة اللازمة للحصول على اعلى كمية من الفينولات والتانينات والبروانثوسيانيدينات,ويوضح الشكل(9) 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) (Silva *et al.*, 2007) .

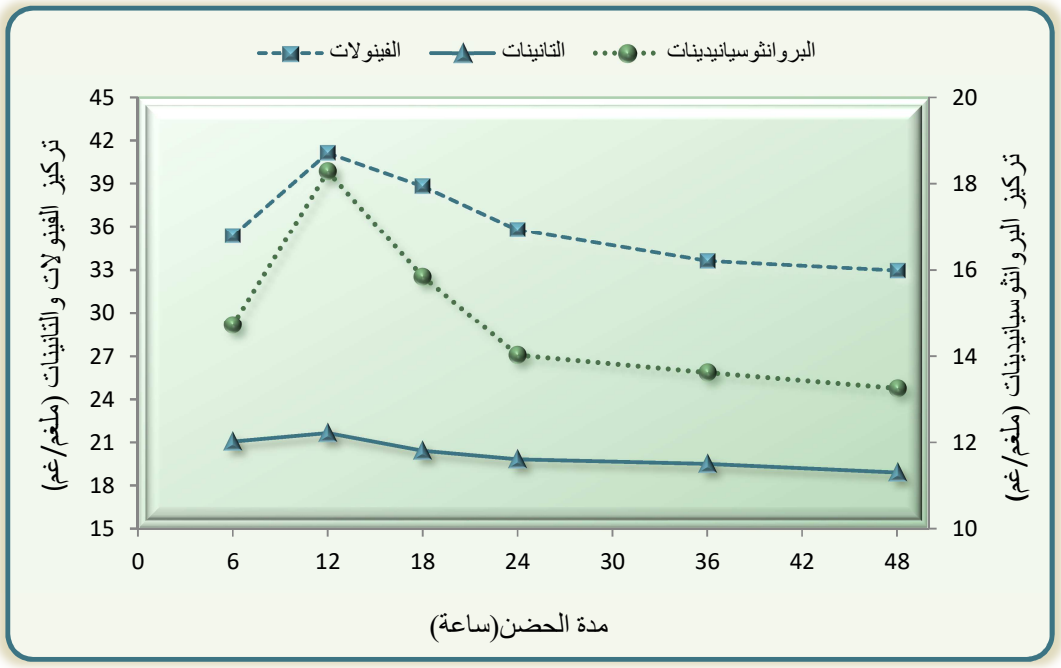
يلاحظ من الشكل(10) ان الفينولات والتانينات والبروانثوسيانيدينات تسلك المسلك ذاته في مستخلصات نوى التمر,فقد بلغ الاستخلا اقصاه خلال مدة حضن استمرت 12 ساعة بتركيز (41.13 و 21.64 و18.29) ملغم/غم للمواد الثلاثة قيد الدراسة ,على التوالي .كما يتضح من الشكل ذاته بأن اختلاف مدد الحضن اقل تأثيرا على استخلا التانينات من الفينولات والبروانثوسيانيدينات.

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 الاستخلا الاضافي غير ذي فائدة في استخلا مضادات الاكسدة الفينولية (Silva *et al.*, 2007)، فضلا عن أن إطالة وقت الاستخلا قد يؤدي الى اكسدة الفينولات عن طريق التعرض للضوء او الاوكسجين (Chan *et al.*, 2009) .

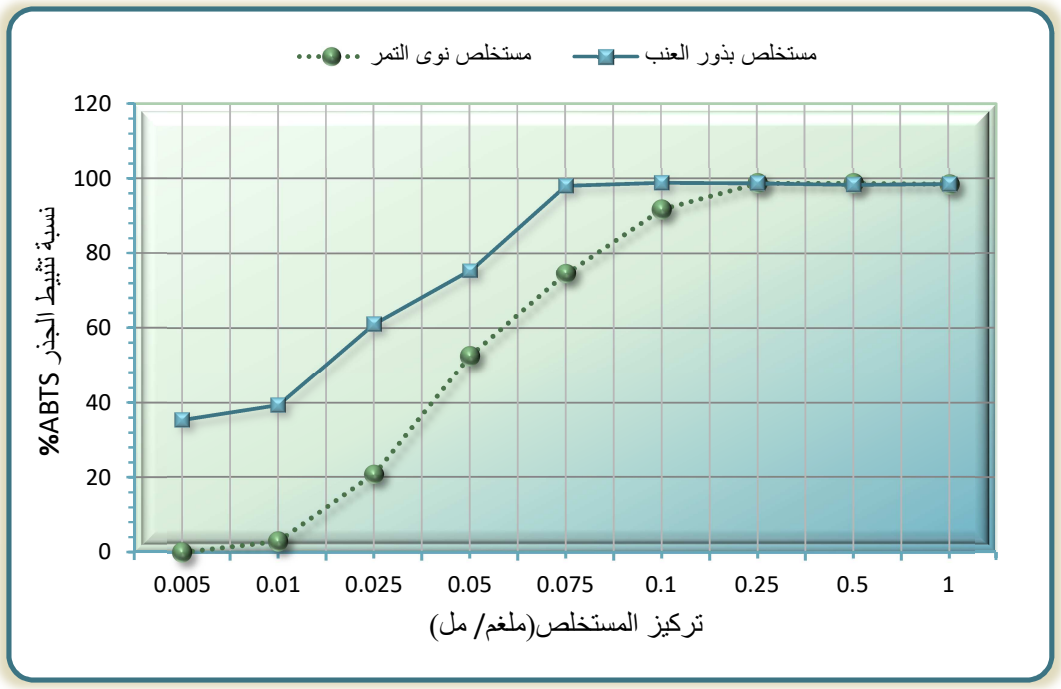


الشكل (9) :تأثير مدة الحضن في استخلاص الفينولات الكلية و التانينات و البروانثوسيانيدينات من بذور العنب .



الشكل(10):تأثيرمدة الحضن في استخلاص الفينولات الكلية والتانينات والبروانثوسيانيدينات من نوى التمر.

يوضح الشكل (11) ان لمستخلص بذورالعنب بعد 12 ساعة من الاستخلا فعالية مضادة للأكسدة, اذ كانت قيمة IC_{50} عند التركيز0.025 ملغم/مل ,وهي اعلى من الفعالية المضادة للأكسدة لهذا المستخلص المعرض لمدة استخلا عدد ساعاتها 24 ساعة,الشكل (8),اذ اقترنت الزيادة في الفعالية المضادة للأكسدة مع ارتفاع الكمية المستخلصة من الفينولات والتانينات والبروانثوسيانيدينات , في حين ابدى مستخلص نوى التمر المستخلص تحت نفس الظروف فعالية مضادة للأكسدة عند التركيز 0.05 ملغم/مل ,وهي اقل من الفعالية المضادة للأكسدة لمستخلص نوى التمر المعرض لمدة استخلا قدرها 24 ساعة ,الشكل(8),على الرغم من ارتفاع تركيز كل من الفينولات والتانينات والبروانثوسيانيدينات المستخلصة , ومن الممكن ان يعزى ذلك الى وجود المركبات الفينولية الاحادية (monophenols) ذات الفعالية المضادة للأكسدة الاقل كفاءة من الفينولات المتعددة (polyphenols) (Qian and Nihorimbere,2004) فضلا عن الشوائب غير الفينولية القادرة على التفاعل مع كاشف فولن- سيوكالتيو واختزال المولبيدنيو مكونة لونا ازرقا قابل للقياس طيفيا (Sub ku *et al*.,2007) .



الشكل (11):الفعالية المضادة للاكسدة لمستخلص بذورالعنب ونوى التمر المعرضين لمدة استخلاص 12 ساعة.

يتم تحديد المدى الزمني اعتمادا على سمات اقتصادية وعملية ,اذ ان المدة الزمنية الاطول تسبب زيادة في الكلفة وقد لوحظ عد وجود اختلافات كبيرة بين كمية الفينولات المستخلصة بأستخد مدد الحضن القصيرة مقارنة بالمدد الطويلة لذا تعد المدد القصيرة اكثر عملية وغير مكلفة , فقد وجد ان (73.78 و 36.5 و 25) دقيقة هوالزمن المثالي لاستخلا الفينولات الكلية من اوراق نبات *Lawsonia inermis* (Uma *et al.*,2010) ونبات *Avicennia marina* (Bharathi *et al.*,2011) ونبات *Centella asiatica* (Chew *et al.*,2011) على التوالي , في حين كانت المدة (30 و80) دقيقة مثالية لاستخلا التانينات من نبات *Caesalpinia coriaria* (Lokeswari and Sujatha,2011) واوراق وجذور وسيقان وبذور نبات الهندباء البرية *Cichorium intybus* (Shad *et al.*,2012), على التوالي.

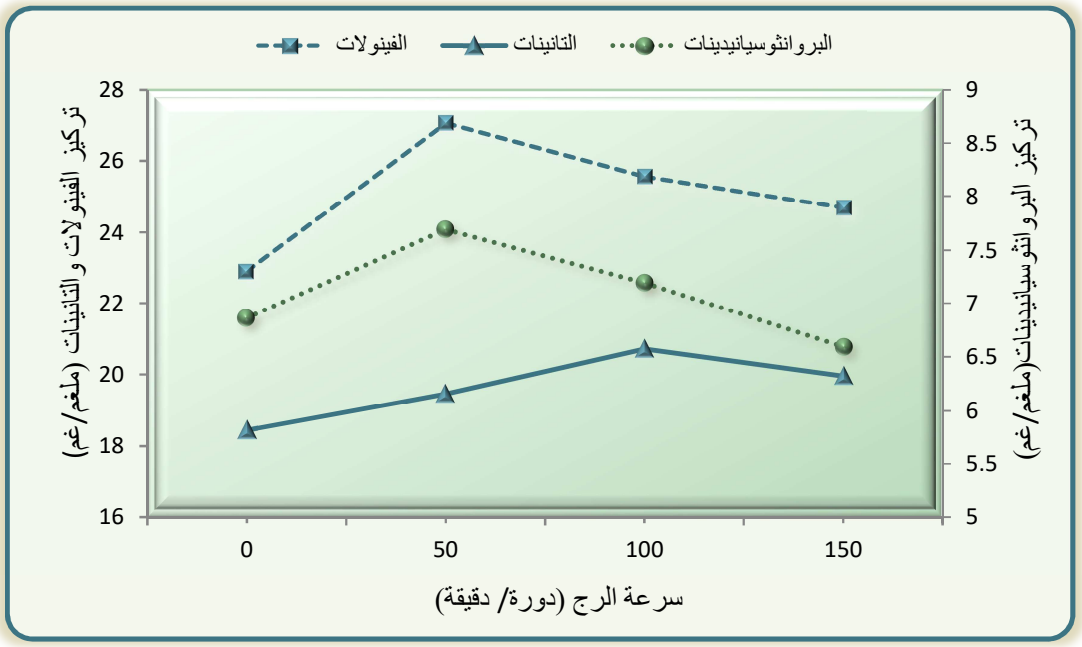
ان نتائج هذه الدراسة لاتتفق مع ماتوصل اليه Wang *et al*.(2011) فقد كان الزمن 4 ساعات كافياً للحصول على اعلى كمية من الفينولات والبروانثوسيانيدينات والفلافونويدات من قشور الرمان بأستخدا□ خلات الاثيل كمذيب استخلا □.

3-2-3 تأثير سرعة الرج :-

استنـاداًالـى نتـائج التجـارب السـابقة مـن حيـث افضـل درجـة حـرارة وفتـرة زمنيـة لاسـتخلا □ البروانثوسيانيدينات من بذور العنب ونوى التمر ,وبأسـتخدا□ الميثـانول 50% تـم دراسـة تـأثير سـرع الرج (0 و50 و100 و150) دورة / دقيقة في استخلا □ الفينولات والتانينات والبروانثوسيانيدينات من بذور العنب ونوى التمر.

بلغت اعلى كمية مستخلصة من الفينولات الكلية والبروانثوسيانيدينات في بذور العنب عند سـرعة رج 50 دورة/دقيقـة بينمـا بلغـت التانينـات اقصـى تركيـز عنـد سـرعة رج 100دورة/دقيقـة بتركيز (27.06 و7.7و20.74) ملغم/غم,علـى التوالي,وكـان اقل تركيـز للفينـولات والتانينـات عنـد الاسـتخلا □ تحـت ظـروف سـاكنة (سـرعة الـرج = صـفر) بتركيـز(22.92 و18.45) ملغـم/غـم وللبروانثوسـيانيدينات عنـد الاسـتخلا □ بسـرعة رج 150دورة/دقيقـة بتركيـز 6.6 ملغـم/غـم, (الشكل 12).

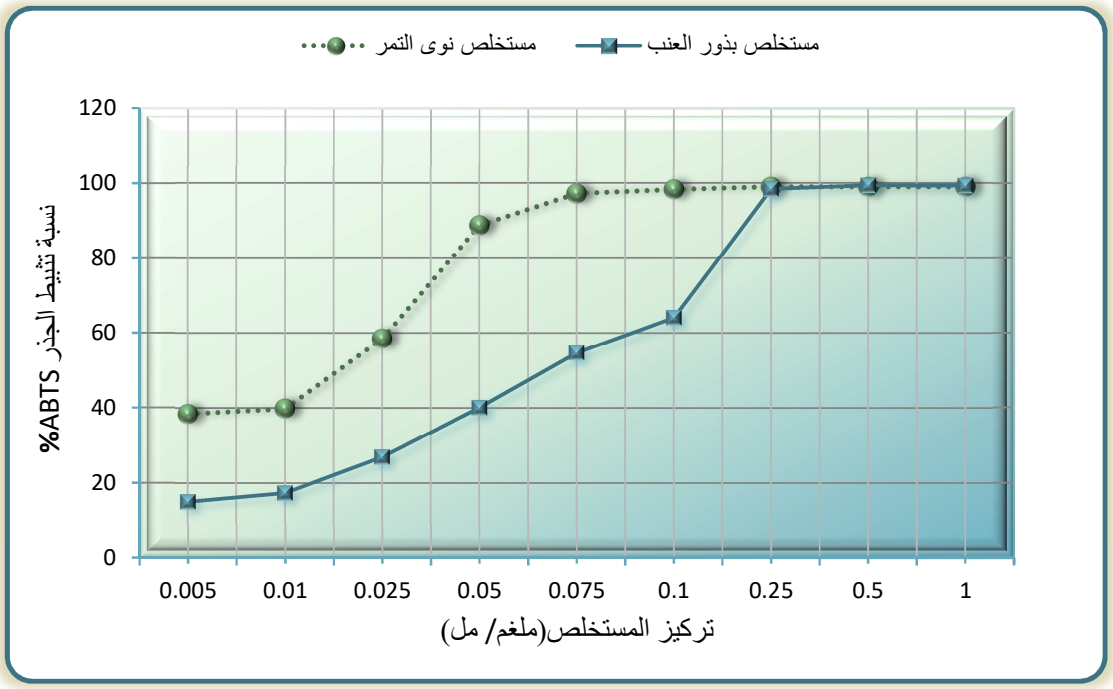
امـا فـي مسـتخلص نـوى التمـر,(الشـكل13),فقـد بلـغ تركيـز كـل مـن الفينـولات والتانينـات والبروانثوسيانيدينات اقصاه عند الاستخلا □ بسرعة رج 50 دورة/دقيقة وبواقع (46.63 و23.94 و20.9) ملغـم/غـم ,علـى التـوالي,في حـين كـان اوطـأ تركيـز للفينـولات والبروانثوسـيانيدينات عنـد الاسـتخلا □ بظـروف سـاكنة وللتانينـات عنـد الاسـتخلا □ بسـرعة رج 150 دورة/ دقيقـة وبواقـع (39.93 و 13.52 و20.43) ملغم/غم ,على التوالي.



الشكل (12):تأثير سرعة الرج في استخلاص الفينولات الكلية والتانينات والبروانثوسيانيدينات في بذورالعنب.

الشكل (13):تأثير سرعة الرج في استخلاص الفينولات الكلية والتانينات والبروانثوسيانيدينات في نوى التمر.

ابدى مستخلص بذور العنب عند الاستخلا بسرعة رج 50 دورة/دقيقة فعالية مضادة للأكسدة عند التركيز 0.075 ملغم/مل , لذا تعد سرعة الرج 100دورة/دقيقة والموضحة في الشكلين (8 و11)افضل من سرعة الرج 50 دورة/دقيقة في استخلا المواد المضادة للأكسدة من بذور العنب ,(الشكل 14), ويوضح الشكل نفسه ان لمستخلص نوى التمر فعالية مضادة للأكسدة عند الحضن بسرعة 50 دورة/دقيقة عند التركيز 0.025 ملغم/مل.



الشكل (14): الفعالية المضادة للاكسدة لمستخلص بذورالعنب ونوى التمر عند الحضن بسرعة رج 50 دورة /دقيقة.

لاتتفق النتائج المستحصلة من هذه الدراسة مع ماأشار اليه Hosseinian and Mazza(2009) الذي تمكن من استخلا البروانثوسيانيدينات بتراكيز تراوحت بين (862.5-115.6) ملغم/ 100غم لعدد من النباتات بأستخدا سرعة الرج 120دورة/دقيقة,كما لايتفق ايضا مع ماوجده Sousa *et al.* (2008) اذ تم استخدا سرعة رج (150) دورة/دقيقة لاستخلا الفينولات الكلية من زيت المائدة اذ تراوحت تراكيزها بين (29.88-5.58)) ملغم/غم.

استخلصت الفينولات والبروانثوسيانيدينات والفلافونويدات من قبل Apetrei *et al.*(2011), بأستخدا سرعة الرج (500) دورة/دقيقة (Magnatic stirrer) لمدة ساعة عند درجة حرارة الغرفة , و Bucić-Kojić *et al.*(2011) بأستخدا سرعة الرج (200) دورة/دقيقة .

4-2-3 تأثير نوع المذيب :-

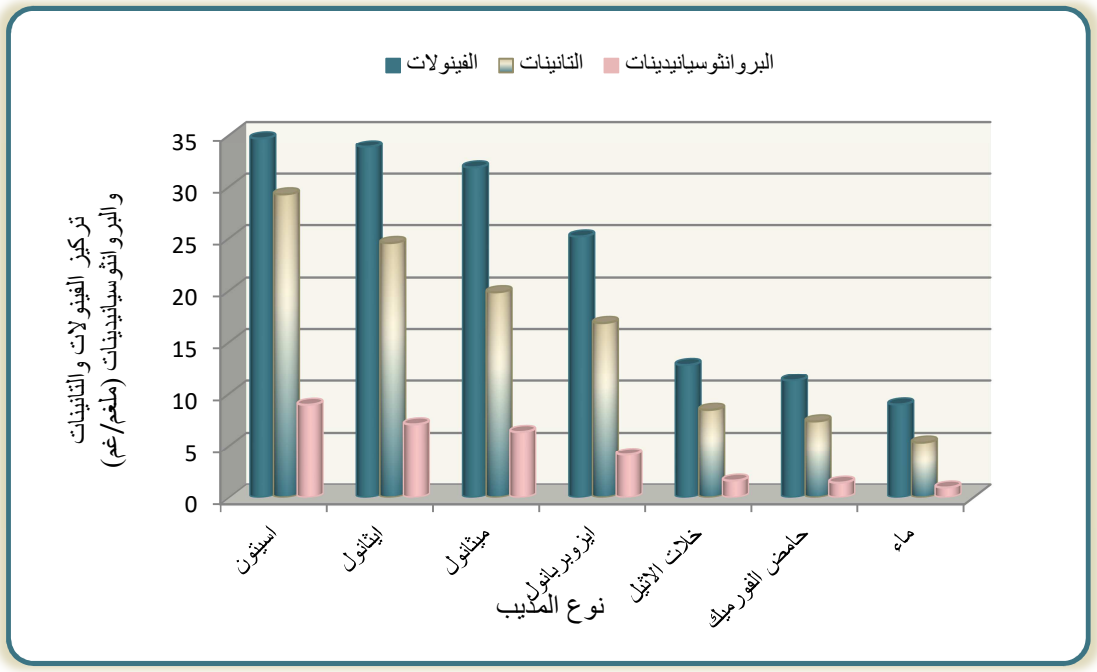
تعد خطوة اختيار مذيب استخلا النماذج النباتية المعقدة امرا بالغ الاهمية لانها سوف تحدد كمية ونوع المركبات الفينولية المستخلصة (Hismath *et al.*,2011) اذ ان كفاءة عملية الاستخلا تعتمد على المذيب والفينول المستخلص (Jakopic *et al.*,2009), لذا تم اختيارعدد من المذيبات المختلفة القطبية و بتركيز 50% اشتملت على الاسيتون والايثانول والميثانول وخلات الاثيل والايزوبروبانول وحامض الفورميك فضلا عن الماء بغية دراسة تاثيرها في استخلا 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 (Jayaprakasha *et al.*,2001).

2- ان اضافة الماء الى المذيبات العضوية تؤدي الى اضعاف الروابط الهيدروجينية في المحاليل المائية اذ يتميز استخدا المذيبات العضوية المطلقة بأنخفاض ذائبية الفينولات المتعددة والذي يكون ناجما عن تعزيز الروابط الهيدروجينية بين الفينولات المتعددة والبروتينات في تلك المحاليل (Wissam *et al.*,2012).

يظهر الشكل (15) 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 .

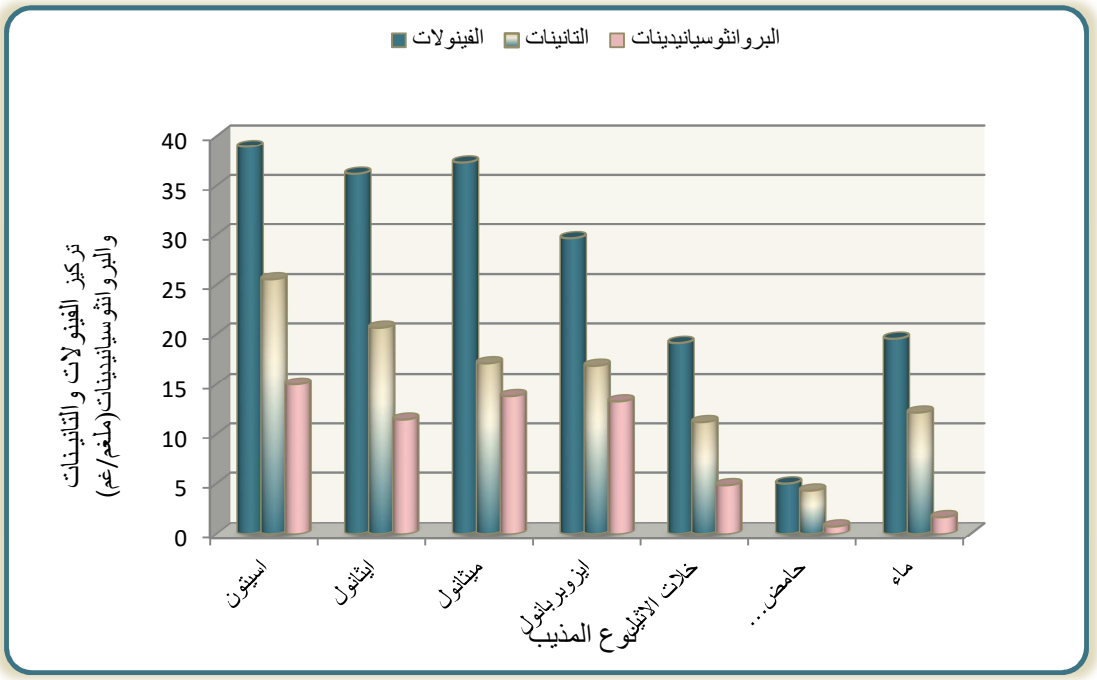


الشكل (15): تأثير نوع المذيب في استخلاص الفينولات والتانينات والبروانثوسيانيدينات من بذورالعنب .

وهذا يتفق مع النتائج المستحصل عليها عند استخلا البروانثوسيانيدينات من نبات *Radix Sanguisorbae* فقد كان الاسيتون هو المذيب الاكفأ يليه الايثانول ثم الميثانول , وذلك لانتقائية الاسيتون العالية وقابيليته القوية على استخلا البروانثوسيانيدينات (China papers,2010),كما تفوق الاسيتون على عدد من المذيبات اذ ترتبت كفاءة تلك المذيبات كالآتي الاسيتون ثم خلات الاثيل ثم الميثانول ثم الماء ثم الكلوروفورم ثم الايثر في استخلا الفينولات والتانينات والفلافونويدات والفلافونول من اوراق نبات *Terminalia chebula* Retz. (Kathhirvel and Sujatha ,2012).

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 , كما يظهر الشكل (17) تفوق مستخلصي الاسيتون وخلات الاثيل لنوى التمر بنسبة المواد القابلة للأستخلا , ويبدو واضحا من النتائج عد وجود علاقة بين وزن المواد القابلة للاستخلا والمحتوى من الفينولات او التانينات اوالبروانثوسيانيدينات. وكذلك اظهر مستخلصا خلات الاثيل والايزوبروبانول لبذور العنب اعلى نسبة من المواد القابلة للأستخلا واللتين بلغتا (17.7و16.5)%,على التوالي, بينما كانت نسبة المواد القابلة للأستخلا للمستخلص المائي (5.1 و2.1) % وهي الاوطأ من بين جميع مستخلصات بذور العنب ونوى التمر,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 (16): تأثير نوع المذيب في استخلاص الفينولات والتانينات والبروانثوسيانيدينات من نوى التمر.

الشكل (17):تأثير نوع المذيب في نسبة المواد القابلة للأستخلاص من بذور العنب ونوى التمر.

تعزى كفاءة الاسيتون في استخلا التانينات من النموذجين قيد الدراسة الى قابليته على تثبيط تكوين رواسب بين التانينات والبروتينات (Hagerman and Robbins,1987) كما ان هنالك اعتقاداً قوياًان زيادة الوزن الجزيئي للمذيب, هو انخفاض لقطبيته مما يسمح باستخلا المواد ذات الاوزان الجزيئية المشابهة والذي يمكن ان يرتبط بمبدأ " الشبيه يذيب شبيهه " او" القطبية مقابل القطبية " (Uma *et al.*,2010) كما اشار Kennedy (2002) الى ان سبب تفضيل الاسيتون على الميثانول في استخلا البروانثوسيانيدينات لقابليته على اذابة المواد المحتوية على البروانثوسيانيدينات غير الذائبة بالميثانول.

يتفق جزء من هذه النتائج مع ماتوصل اليه Drużyńska *et al.* (2007) حيث تفوق الاسيتون80% في استخلاصه للفينولات الكلية من الشاي الاخضر بينما اظهر الماء تفوقه على جميع المذيبات المستخدمة في الدراسة في استخلاصه للكاتكينات.

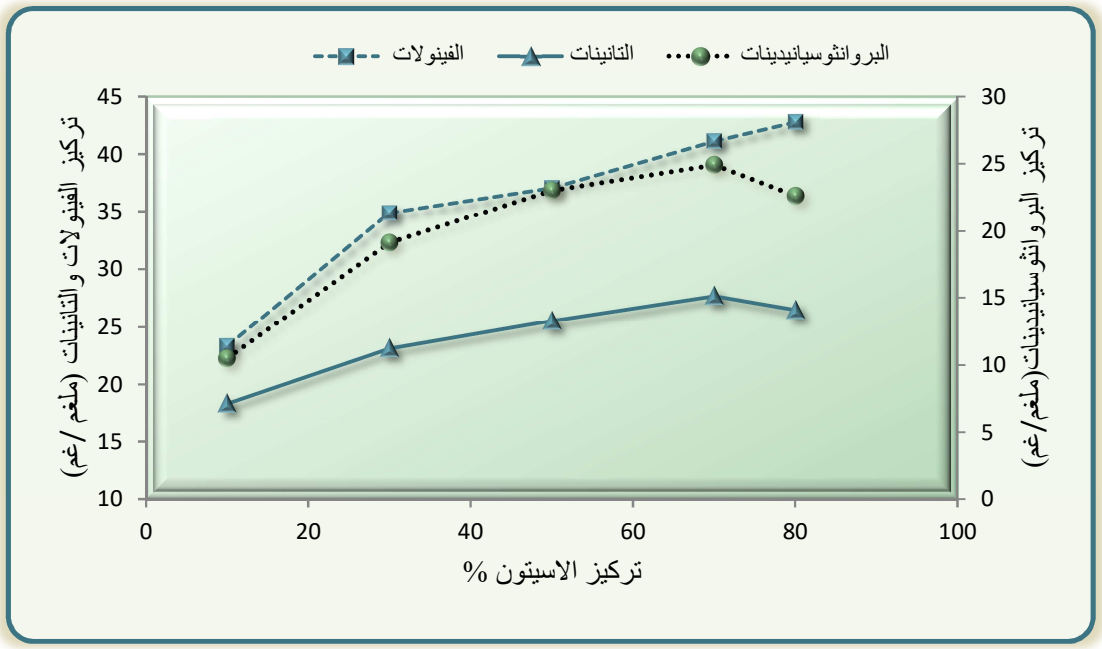
وفي ضوء ماتقدم يتبين ان المذيبات (الاسيتون ,الايثانول ,الميثانول)اكثر كفاءة من المذيبات (خلات الاثيل ,حامض الفورميك ,ايزوبروبانول) في استخلاص الفينولات والتانينات والبروانثوسيانيدينات من بذور العنب ونوى التمر, وعلى الرغم من قطبية الماء العالية الا ان محتواه من المركبات المدروسة كانت قليلة وقد يعزى السبب في ذلك الى قابلية الماء على استخلاص المركبات الفعالة الذائبة بالماء فقط فضلاعن وجود الشوائب والمواد المتبقية في المستخلصات المائية (Mohammedi and Atik,2011).وهذا يتفق مع النتائج التي حصل عليها Iqbal *et al*. (2012) اذ تفوق المستخلص الميثانولي لاوراق نبات الشيح *Artemisia annua* L. في محتواه الفينولي على مستخلصات الهكسان وخلات الاثيل والكلوروفورم والماء.

5-2-3 تأثير تركيز المذيب:-

نظرا لكفاءة الاسيتون في استخلاص المركبات المدروسة من بذور العنب ونوى التمر فضلا عن كفاءة الايثانول والميثانول في استخلاص البروانثوسيانيدينات من بذور العنب ونوى التمرعلى التوالي, فقد تم دراسة كفاءة التراكيز المختلفة لهذه المذيبات في استخلاص المركبات المدروسة من المستخلصين قيد الدراسة.

يتبين من الشكلين 18 و19 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.

الشكل(18):تأثير تركيز الاسيتون في استخلاص الفينولات الكلية والتانينات والبروانثوسيانيدينات من بذور العنب .



الشكل(19):تأثير تركيز الاسيتون في استخلاص الفينولات الكلية والتانينات والبروانثوسيانيدينات من نوى التمر.

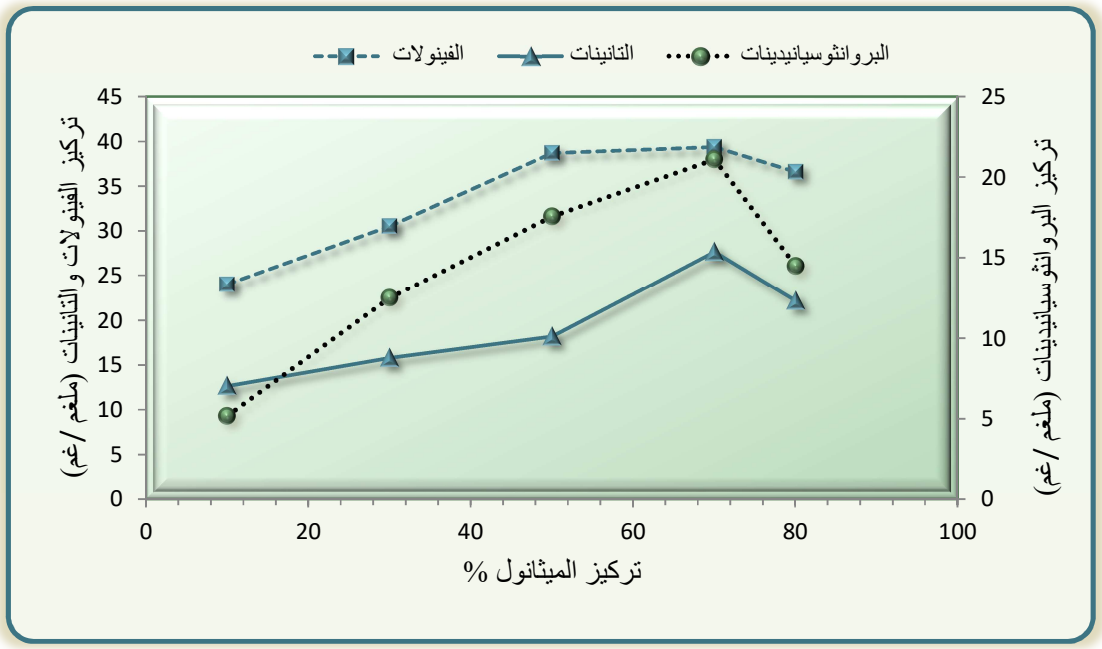
يزداد تركيز الفينولات والتانينات والبروانثوسيانيدينات بزيادة تركيز الايثانول المستخدم لاستخلاص بذور العنب حيث بلغ اعلى تركيزلهذه المركبات عند اعلى تركيز للايثانول 80% والتي بلغت (38.6 و30.51 و10.38) ملغم/غم, على التوالي ,(الشكل 20), اذاظهرت دراسة سابقة بأن اضافة الايثانول بتراكيز واطئة (5-20) مل لكل 100مل يزيد من تراكيز الالياف الغذائية والذي يتبعه اختزال تركيز الفينولات في وسط الايثانول (Galanakis *et al.*,2010).

تتفق نتائج هذه الدراسة مع ماورد في دراسة سابقة اذ وجد ان الايثانول 80% الاكفأ في استخلاص الفينولات والبروانثوسيانيدينات من ثمار التين المجفدة (Bucić-Kojić *et al.*,2011) , بينما كان الايثانول بتركيز 40% الاكفأ في الحصول على اعلى تركيز للمركبات الفينولية من مستخلص نبات *Morinda citrifolia* والتي بلغت 919.95 ملغم/100غم . (Thoo *et al.*,2010)

يمتلك الايثانول عدداً من المزايا منها رخص ثمنه وامكانية اعادة استخدامه وكونه غير سام فضلا عن قابليته على منح ذرة الهيدروجين الى الكوينونات (quinones) (الفينولات المؤكسدة) واعادة تنشيط مجاميع الهيدروكسيل التي تعزز من كفاءة الفعالية المضادة للأكسدة ,وبذلك يمكن حفظ الفينولات في الايثانول من اجل الحفاظ على الفعالية المضادة للأكسدة للمستخلص (Galanakis *et al.*,2010).

اما عند استخدام الميثانول كمذيب استخلاص لنوى التمر فيوضح الشكل (21) ازدياد كمية الفينولات والتانينات والبروانثوسيانيدينات مع زيادة تركيز الميثانول الى ان تم الحصول على اعلى تركيزعند التركيز 70% والذي بلغ (39.39 و27.72 و21.12) ملغم /غم ,على التوالي.

الشكل(20):تأثير تركيز الايثانول في استخلاص الفينولات الكلية والتانينات والبروانثوسيانيدينات من بذور العنب.

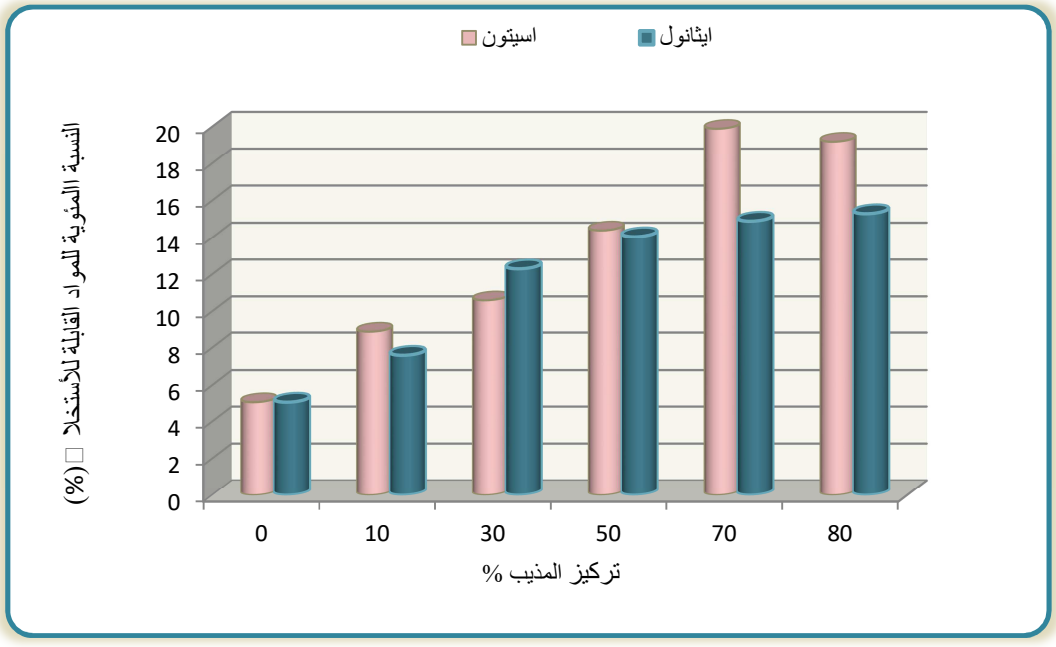


الشكل(21): تأثير تركيز الميثانول في استخلاص الفينولات الكلية والتانينات والبروانثوسيانيدينات من نوى التمر.

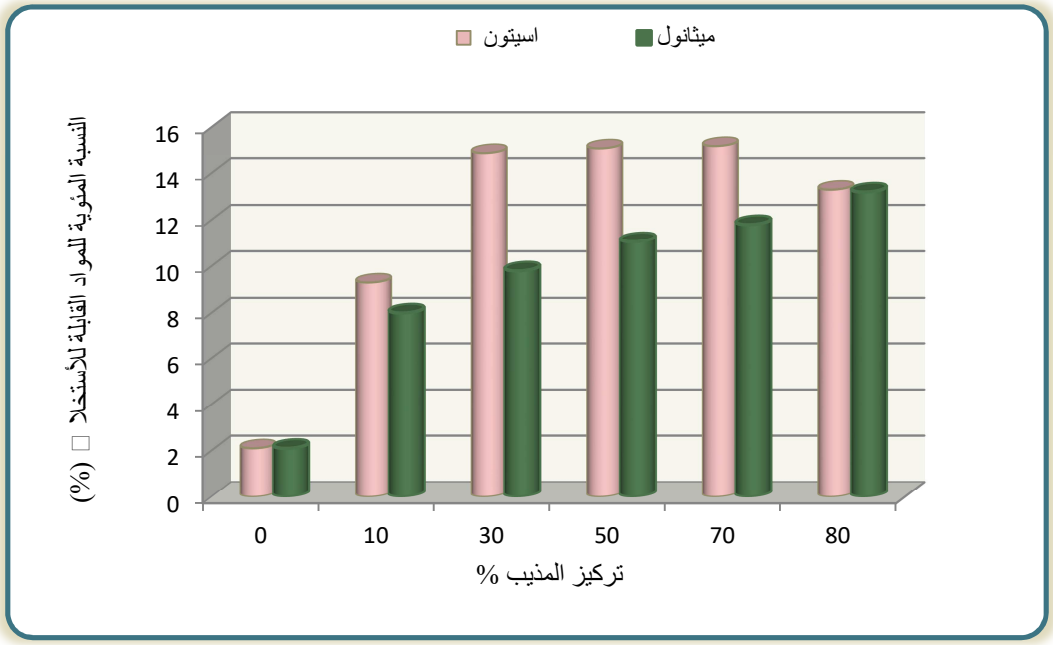
في دراسة شملت استخدا تراكيز مختلفة من الاسيتون والايثانول ابدت التراكيز 50-70% للاسيتون و50% للايثانول كفاءة عالية لاستخلا التانينات من جلد ثمار العنب (Grape skin) (Doweny and Hanlin,2010) في حين ابدى كل من الاسيتون 30% والايثانول 30% كفائته في استخلا الفينولات من اوراق المريمية (Dent *et al.*,2012).

ان اضافة الماء الى الاسيتون والايثانول والميثانول بنسب مختلفة ماهوالا تعديل لقطبية المذيب الكحولي واذا ماتحقق ذلك, فأن مثل هذه الانظمة تكون قادرة على استخلا المواد الفينولية من طرفي القطبية (المواد عالية القطبية والواطئة القطبية) فضلا عن المواد المتوسطة القطبية (Zhang *et al.*,2007).

يوضح الشكلان 22 و23 ان اعلى نسبة من المواد القابلة للاستخلا من مستخلصي بذور العنب ونوى التمر تم الحصول عليها بأستخدا الاسيتون 70% اذ بلغت (19.9و15.2)%,على التوالي, وهي اعلى من نسبتي المواد القابلة للأستخلا عند استخدا الايثانول والميثانول ,واللتين بلغتا (15.3و13.2)% ,على التوالي ,عند التركيز 80% .



الشكل (22):تأثيرتركيزالاسيتون والايثانول في نسبة المواد القابلة للأستخلاص من بذورالعنب .

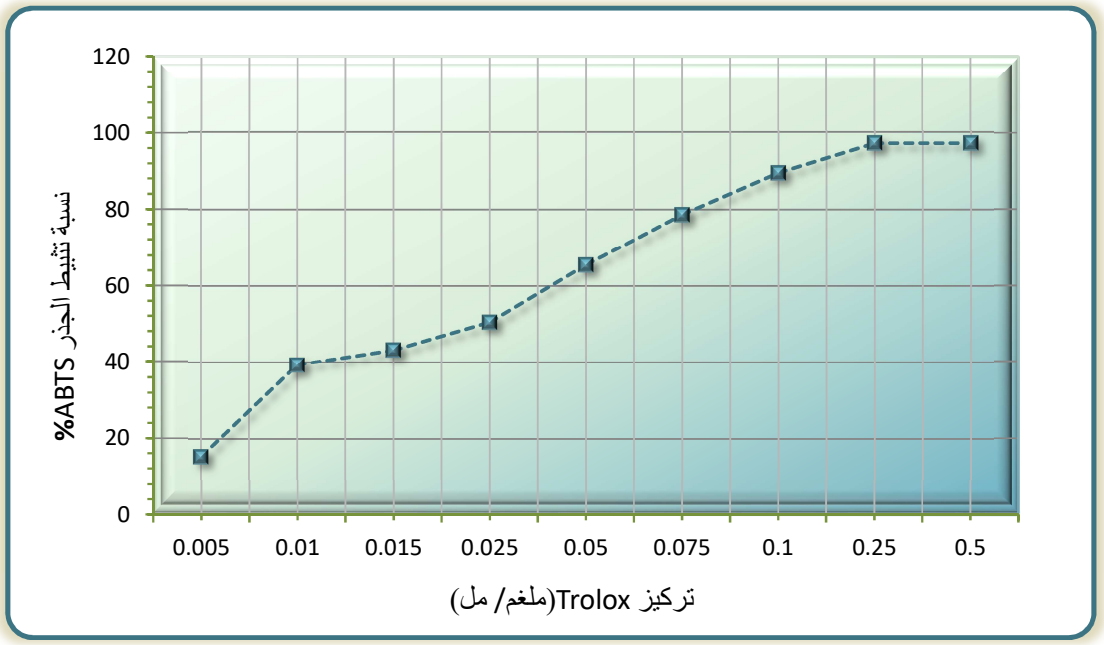


الشكل (23):تأثيرتركيزالاسيتون والميثانول في نسبة المواد القابلة للأستخلاص من نوى التمر.

3-3 الفعالية المضادة للأكسدة :-

قدرت الفعالية المضادة للأكسدة للمستخلصات المختلفة لبذور العنب ونوى التمر من خلال تحديد تركيز المستخلص الذي له القابلية على اختزال او تثبيط امتصاصية الجذر الحر $ABTS^{\cdot}$ الى النصف IC_{50} والذي عادة مايعبرعنه بشكل النسبة المئوية للتثبيط (PI%) .

تبين الاشكال (25-31) اختلاف الفعالية المضادة للأكسدة بأختلاف المذيب والنموذج النباتي ,اذ ابدى الاسيتون70% والميثانول 80% كفائتهما في استخلا المواد المضادة للأكسدة من نوى التمراذ كانت قيمة IC_{50} عند التركيز 25 مايكروغرا/مل , وهي مساوية لتركيزمضاد الاكسدة القياسي Trolox القادرعلى اختزال او تثبيط امتصاصية الجذر الحر $ABTS^{\cdot}$ الى النصف ,(الشكل 24),وتساوت الفعالية المضادة للأكسدة لمسخلصي الايثانول 50% والايزوبروبانول 50% لنوى التمروالاسيتون70% لبذور العنب اذ كانت قيمة IC_{50} عند التركيز 50 مايكروغرا/مل.

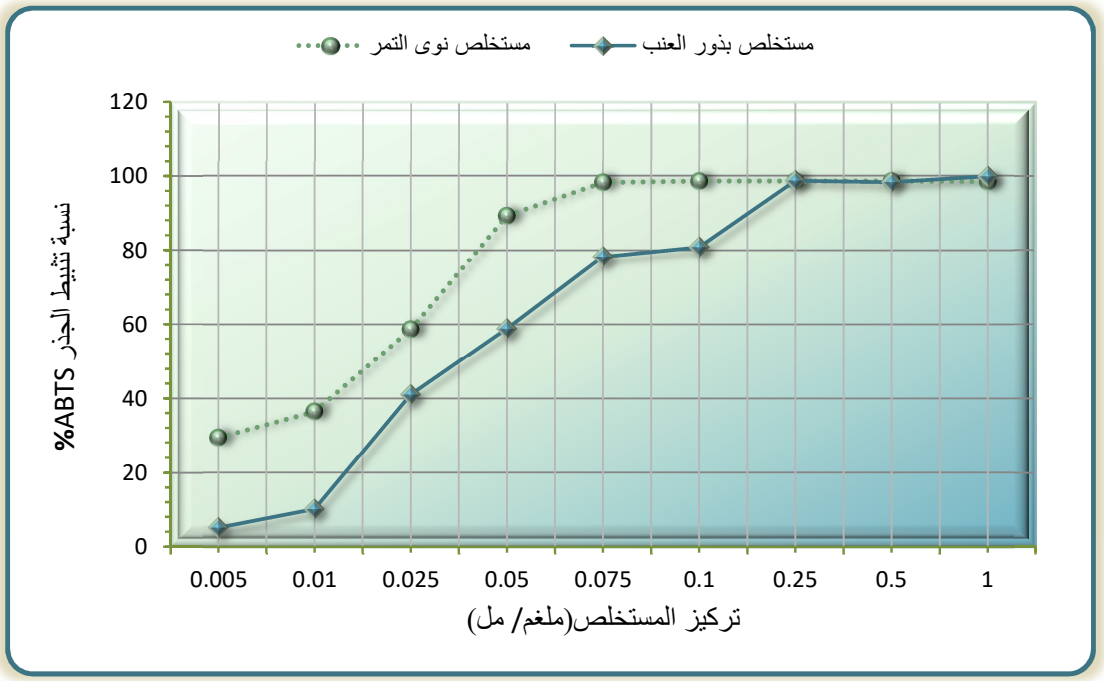


الشكل (24):الفعالية المضادة للاكسدة للمضاد القياسي Trolox.

اظهر مستخلص خلات الاثيل 50% والماء المقطر لبذور العنب فضلا عن مستخلص حامض الفورميك 50% للمستخلصين قيد الدراسة فعالية مضادة للأكسدة ضعيفة اذ كانت قيمة IC_{50} عند التركيز 0.25 ملغم/مل,[الاشكال (29 و30و31)].

ظهرت الفعالية المضادة للأكسدة لمستخلصي الايثانول 80% والميثانول 50% لبذور العنب عند التركيز 0.075 ملغم/مل,[الشكلان(26 و27)], في حين ابدت مستخلصات الماء المقطروخلات الاثيل 50% لنوى التمرفعالية في كبح الجذور الحرة عند التركيز 0.1 ملغم/مل,[الشكلان (29 و30)].

اكد العديد من الباحثين منهم Liu *et al.* (2002) , Mazandarani *et al.*(2012) و Khan *et al.*(2012) على العلاقة الايجابية بين الفعالية المضادة للأكسدة والمحتوى الفينولي للمستخلصات المدروسة ,وهذا يتفق مع النتائج المستحصلة من هذه الدراسة فضلاعن ملاحظة مثل هذه العلاقة مع المحتوى من التانينات والبروانثوسيانيدينات ولكلا النموذجين ,اذ تفوقت مستخلصات الاسيتون والايثانول والميثانول ذات المحتوى العالي من الفينولات والتانينات والبروانثوسيانيدينات من حيث الفعالية المضادة للأكسدة على مستخلصات حامض الفورميك والماء وخلات الاثيل القليلة المحتوى من المركبات المدروسة في حين كان مستخلص الايزوبروبانول متوسط من حيث محتواه



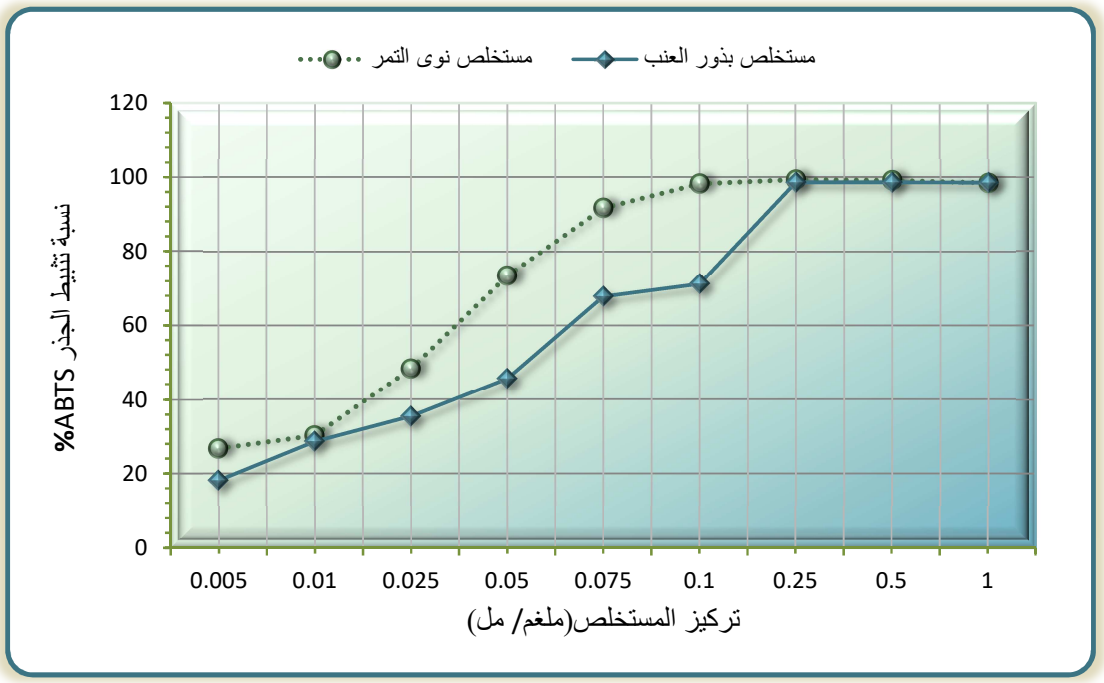
الشكل(25):الفعالية المضادة للاكسدة لبذورالعنب ونوى التمرالمستخلصين بأستخدا الاسيتون70%.

من الفينولات والتانينات والبروانثوسيانيدينات والفعالية المضادة للأكسدة مقارنة مع بقية المستخلصات .

تعزى فعالية التانينات الكابحة للجذور الحرة (ABTS) الى اوزنها الجزيئية العالية فضلا عن تقارب الحلقات الاروماتية والمجاميع الهيدروكسيلية والتي تعد اكثر اهمية من المجاميع الوظيفية الخاصة في كبح الجذور الحرة (Hagerman *et al.*,1998).

تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ماتوصل اليه Li *et al.*(2008), اذ تفوق مستخلص الاسيتون 70% لمسحوق بذور العنب بمحتواه الفينولي فضلا عن فعاليته المضادة للأكسدة المقدرة بعدة طرائق منها DPPH , ABTS وCUPRAC كما اظهرالمستخلص المائي محتوىً فينولياً وفعالية مضادة للأكسدة واطئة, وابدى مستخلص الاسيتون 70% لقلف ساق نبات *Bridelia retusa* فعالية مضادة للأكسدة تفوق المستخلصات الاخرى (Tatiya *et al.*,2011) وفي دراسة لتحديد الفعالية المضادة للأكسدة لمستخلص الاسيتون70% والايثانول لاوراق نبات

Hippobromus pauciflorus وجد ان مستخلص الاسيتون 70% اعلى من مستخلص الايثانول في فعاليته في كبح الجذور الحرة (ABTS) فضلا عن بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) وقابلية القوة الاختزالية (reducing power ability) واوكسيد النتريك (nitric oxide) وقابلية كبح اكسدة الدهن (lipid peroxidation scavenging ability) . (Olorunnisola *et al*.,2012)



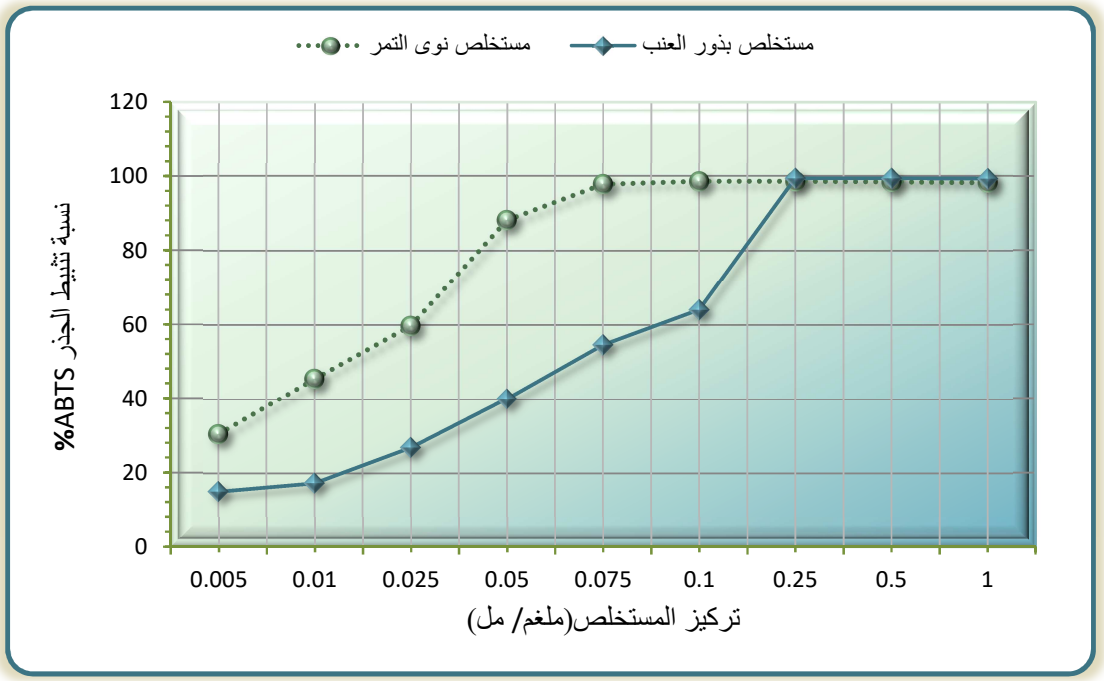
الشكل(26): الفعالية المضادة للاكسدة لبذورالعنب المستخلص بأستخدا الايثانول80% ونوى التمرالمستخلص بأستخدا الايثانول 50%.

لاتتفق نتائج دراستنا الحالية مع ماوجده Shabir *et al*. (2011) اذ ابدى مستخلص الميثانول 80% لاوراق وازهار وقلف نبات *Delonix regia* (Bojer ex Hook.) Raf فعالية مضادة للأكسدة تفوق الفعالية المضادة للأكسدة لمستخلصات المذيبات الاخرى (الماء المقطر , الايثانول المطلق ,الميثانول المطلق ,الاسيتون المطلق ,الايثانول80%,الاسيتون 80%) .وقد جُعل

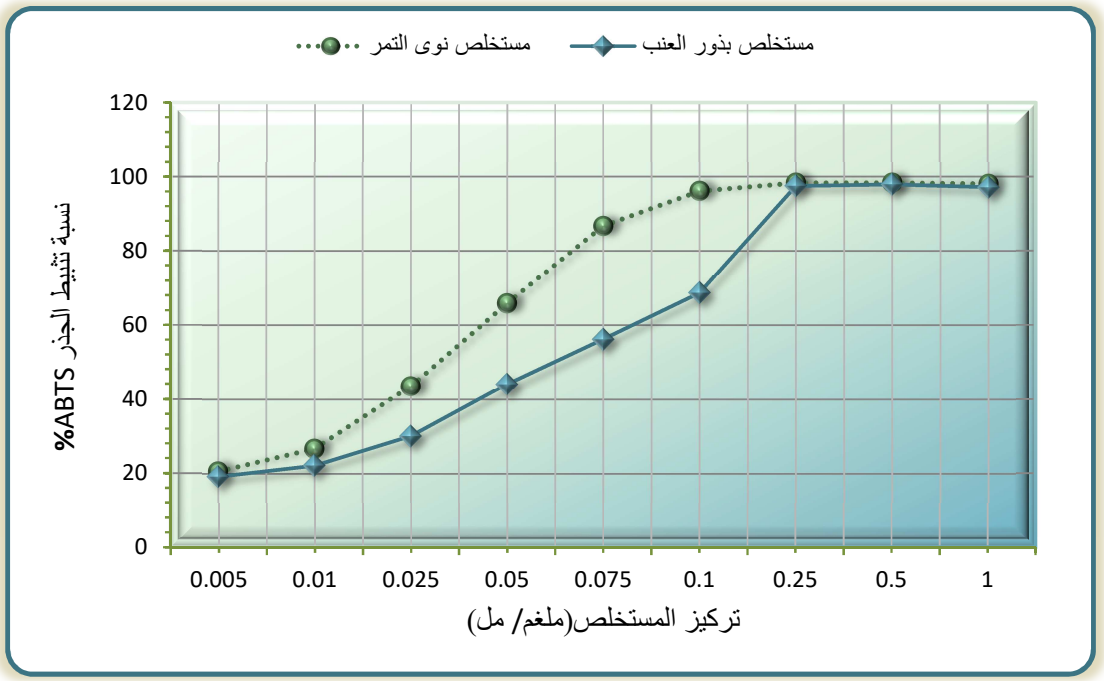
من المحتوى الفينولي والفلافونويدي سبباًلأنخفاض الفعالية المضادة للاكسدة لمستخلصات الايثانول والاسيتون والماء لستة انواع من النباتات الطبية الفيتنامية مقارنة مع المستخلص الميثانولي لهذه النباتات والغني بالمحتوى الفينولي والفلافونويدي فضلا عن نوع الفينولات والفلافونويدات الموجودة في هذه المستخلصات (Nguyen and Eun,2011),في حين كانت الفعالية المضادة للأكسدة لمستخلص الماء الحار لاوراق الجوافة guava اعلى من غيرها من المستخلصات (Nantitanon *et al*.,2010).

ان الفعالية المضادة للأكسدة للنماذج النباتية تعتمد وبقوة على طبيعة مذيب الاستخلا , وذلك بسبب وجود مركبات مضادة للأكسدة مختلفة ذات خصائص كيميائية وقطبية مختلفة والتي قد تكون ذائبة اوغيرذائبة في مذيب معين (Sultana *et al*,2009) , فضلا عن تأثر الفعالية المضادة للأكسدة بالخصائص الكيميائية للمركب بما في ذلك طاقات الاواصر الهيدروجينية ,resonance delocalization وتحسسه للاكسدة التلقائية (Wanasundara andShahidi,2005).

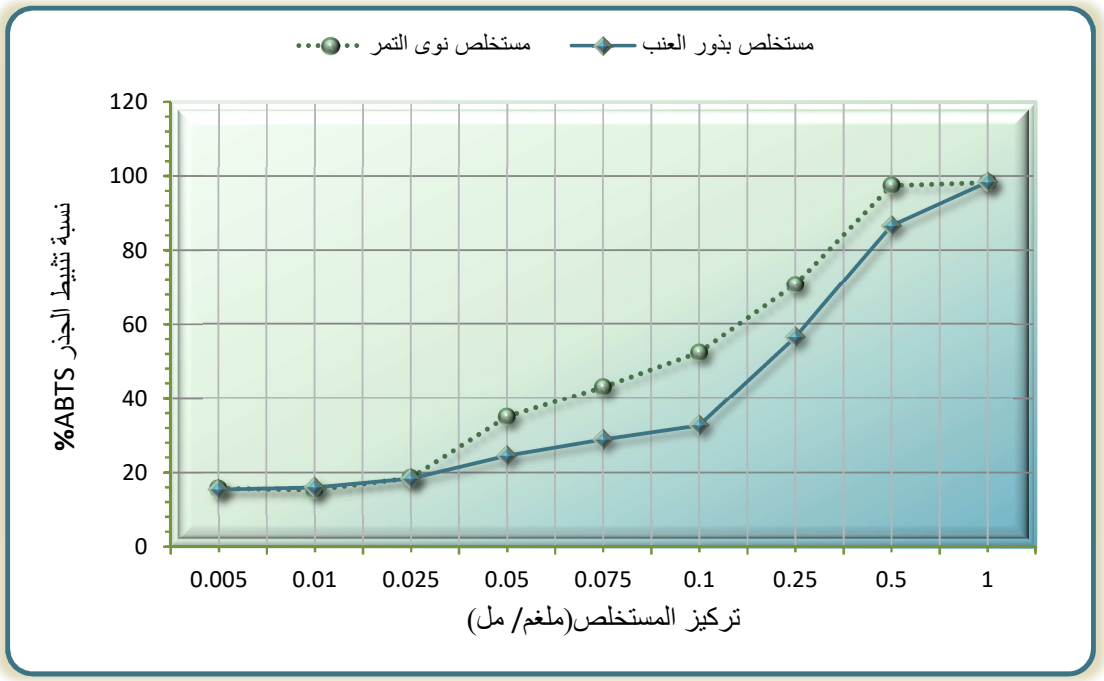
تعد طريقة تثبيط ABTS من الطرائق البسيطة والسريعة والموثوقة وغير المكلفة ومتكيفة بشكل كبير للأنظمة المضادة للأكسدة المحبة للدهون (Lipophilic) والمحبة للماء(hydrophilic) وقد استخدمت بنجاح في التقييم المنهجي للفعالية المضادة للأكسدة للنباتات الطبية على نطاق واسع (large scale) (Cai *et al*,2003).



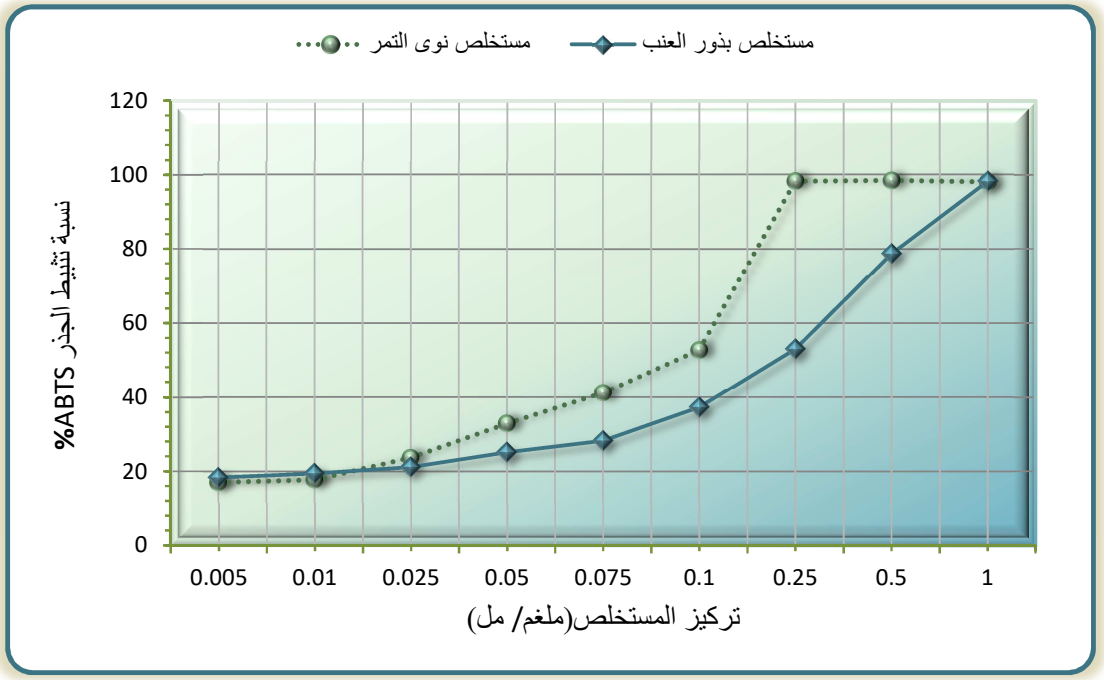
الشكل (27) : الفعالية المضادة للاكسدة لبذورالعنب المستخلص بأستخدا الميثانول50% ونوى التمرالمستخلص بأستخدا الميثانول 80%.



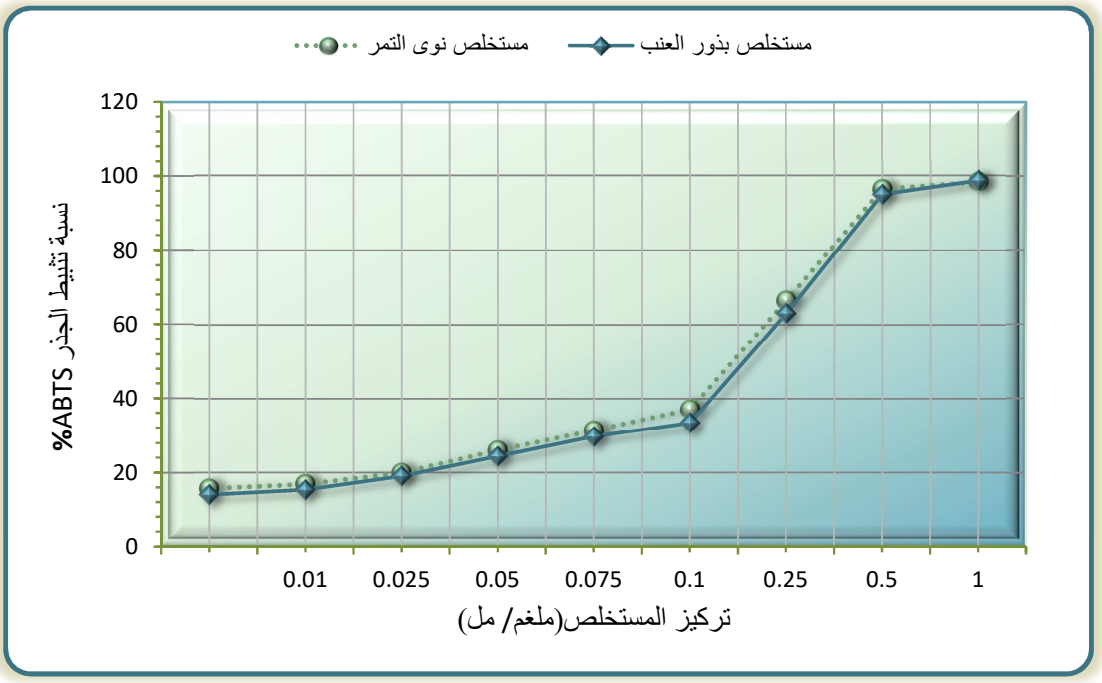
الشكل(28): الفعالية المضادة للاكسدة لبذورالعنب ونوى التمرالمستخلصين بأستخدا الايزوبروبانول 50%.



الشكل(29):الفعالية المضادة للاكسدة لبذورالعنب ونوى التمرالمستخلصين بأستخدا خلات الاثيل 50%.



الشكل(30): الفعالية المضادة للاكسدة لبذورالعنب ونوى التمرالمستخلصين بأستخدا الماء المقطر.



الشكل(31): الفعالية المضادة للاكسدة لبذورالعنب ونوى التمرالمستخلصين بأستخدا حامض الفورميك 50%.

4-3 الفعالية التثبيطية لمستخلصي بذور العنب ونوى التمر ضد البكتيريا:-

تم دراسة الفعالية التثبيطية لمستخلص الاسيتون 70% لبذور العنب ونوى التمرضد ستة انواع بكتيرية ومقارنة النتائج مع المضاد الحيوي القياسي الجنتامايسين (Gentamicin),ويتضح من النتائج المبينة في الجدول (4) ان اعلى فعالية تثبيطية لمستخلص بذور العنب بتركيز 25 ملغم/مل كانت ضد بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* واوطأ فعالية ضد بكتريا *Streptococcus fecalis* بقطري تثبيط مقدارهما (0.5±11.5و 5) ملم , على التوالي , في حين لم يبدي المستخلص المذكوراي فعالية تثبيطية ضد بكتريا *Escherichia coli* ولجميع التراكيز المستخدمة من المستخلص في هذه الدراسة.

عند التمعن في الجدول (4) يتضح ان التراكيز المثبطة الدنيا (MIC) قد بلغت 10 ملغم/ مل لكل من بكتريا *Proteus ssp* و *Staphylococcus aureus* و *Streptococcus pyogens*

في حين بلغت (5 و15) ملغم/مل لكل من بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* و *Streptococcus fecalis* ,على التوالي.

ان الفعالية التثبيطية لمستخلص بذور العنب المستحصل عليها من هذه الدراسة تعد ضعيفة مقارنة بما ورد في دراسات سابقة فقد اظهرت بذورالعنب الاحمر الشيرازي من الشمال الشرقي لتايلاند فعالية تثبيطية ضد عدد من البكتريا منها *Streptococcus fecalis* و *Staphylococcus aureus*و*Escherichia coli* بلغت (14 و12و7) ملم ,على التوالي, (Butkhup *et al*.,2010) في حين اشارت الدراسة ذاتها الى انعدا الفعالية التثبيطية للبذور ضد بكتريا *Proteus vulgaris* و*Streptococcus thermophilus* وعدد من الخمائر.

واوضحت نتائج الدراسة التي قا بها Jayaprakasha *et al*.(2003) ان الفعالية التثبيطية لمستخلص بذور العنب ضد بعض انواع البكتيريا الموجبة لصبغة غرا (*Bacillus subtilis* و *Bacillus cereus* و *Bacillus couagulans* و *Staphylococcus aureus*) انحصرت بين (850- 1000) ppm في حين انحصرت تلك الفعالية بين (1250-1500) ppm ضد بعض الانواع البكتيريا السالبة لصبغة غرا (*Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa*).

وتوصل Ting Kao *et al*.(2010) الى ان الفعالية التثبيطية لبذورالعنب الغنية بالمواد الفينولية ضد بكتريا *Staphylococcus aureus* تكمن في قابلية البذور على تثبيط انزيم Dihydrofolate reductase المعني بعملية التخليق الحيوي لعدد من الجزيئات الحيوية بما في ذلك النيوكلوتيدات والاحماض الامينية , فضلا عن انخفاض Dihydrofolate ,اهم انواع الفولات الرئيسة المحددة في بكتريا *Staphylococcus aureus* ,عند وجود مستخلص بذور العنب في الوسط.

جدول (4) :الفعالية التثبيطية لمستخلص بذور العنب ضد بعض الانواع البكتيرية.

تركيز المستخلص ملغم/مل	اقطار التثبيط (ملم)					
	Escherichia coli	*Proteus ssp*	*Pseudomonas aeruginosa*	*Staphylococcus aureus*	*Streptococcus fecalis*	*Streptococcus pyogens*
25	0.0	8.5± 0.5	11.5± 0.5	7.5± 0.5	5± 0	6.5± 0.5
15	0.0	7.25± 0.25	10.25± 0.25	5± 0	5± 0	5.5± 5
10	0.0	7.25± 0.25	9± 0	4± 0	0.0	5± 0
5	0.0	0.0	7.5± 0.5	0.0	0.0	0.0
1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
جنتامايسين 100 مايكروغرا/مل	0.0	0.0	18.5± 1.5	26± 2	0.0	0.0
جنتامايسين 10 مايكروغرا/مل	0.0	0.0	14± 0	17± 1	0.0	0.0

LSD 0.01 للتركيز = 0.69 ,لأقطار التثبيط =0.6 , للتداخل = 1.698

اقتصر الفعل التثبيطي لمستخلص نوى التمر على عزلة بكترية واحدة سالبة لصبغة غرا واخرى موجبة لهذه الصبغة وهما *Pseudomonas aeruginosa* و*Staphylococcus aureus* وبقطري تثبيط بلغا (10.75± 0.25و9.25± 0.25) ملم,على التوالي, عند التركيز 25 ملغم/مل ,ولم تظهراي فعالية تثبيطية ضد الاجناس البكتيرية الاخرى التي اشتملت عليها الدراسة ,وبلغت التراكيز المثبطة الدنيا (MIC) (5 و10) ملغم/مل كما هو موضح في الجدول (5).

في دراسة لمقارنة الفعالية التثبيطية لنوى التمر واوراق وثمار وقلف النخيل ضد بكتريا *Streptococcus pyogens* , *Escherichia coli* , *Pseudomonas aeruginosa* و *Staphylococcus aureus* اظهر نوى التمرفعالية تثبيطية اسوة ببقية النماذج النباتية المدروسة باقطار تثبيط تراوحت بين(8- 11.6) ملم (Al-Daihan and Bhat,2012) كما اظهر المستخلص الاسيتوني والميثانولي لنوى التمر فعالية تثبيطية جيدة ضد بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* و *Escherichia coli* و*Streptococcus pyogens* و *Shigella flexeneri* و *Bacillus subtilis* في حين اوضحت الدراسة ذاتها عد وجود فعالية تثبيطية لنوى التمر ضد بكتريا *Enterococcus faecalis* (Perveen *et al*.,2011).

ترجح الفعالية التثبيطية لبذورالعنب ونوى التمر الى محتواهما من الفينولات والتانينات فضلاعن البروانثوسيانيدينات الذي اشير في دراسة سابقة الى قابليته على الارتباط بـ Lipopolysaccharide(LPS) ,وهو المكون الرئيس للغشاء الخارجي للبكتريا السالبة لصبغة غر , وتثبيط عملية البلعمة الخلوية (Delehanty *et al*,2007).

بين (1991) Scalbert الخصائص المضادة للبكتريا والفطريات للتانينات ومن ضمنها البروانثوسيانيدينات واستنتج بأن التانينات لها القابلية على تثبيط نمو الاحياء المجهرية بثلاث آليات :-

الآلية الاولى :- تثبيط الانزيمات المايكروبية الخارجية من خلال الخاصية القابضة (astringency) القياسية للتانينات .

الآلية الثانية :- تبدي التانينات تداخل مباشر مع العمليات الايضية المايكروبية .

الآلية الثالثة :- التانينات قادرة على تكوين معقد مع الآيونات المعدنية والمطلوبة للنمو المايكروبي.

جدول (5) :الفعالية التثبيطية لمستخلص نوى التمر ضد بعض الانواع البكتيرية.

تركيز المستخلص ملغم/مل	اقطار التثبيط (ملم)					
	Escherichia coli	*Proteus ssp*	*Pseudomonas aeruginosa*	*Staphylococcus aureus*	*Streptococcus fecalis*	*Streptococcus pyogens*
25	0.0	0.0	10.75± 0.25	9.25± 0.25	0.0	0.0
15	0.0	0.0	9.25± 0.25	6.25± 0.25	0.0	0.0
10	0.0	0.0	7.25± 0.25	5.75± 0.25	0.0	0.0
5	0.0	0.0	5.75± 0.75	0.0	0.0	0.0
1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
جنتامايسين 100 مايكروغرام/مل	0.0	0.0	18.5± 1.5	26± 2	0.0	0.0
جنتامايسين 10 مايكروغرام/مل	0.0	0.0	14± 0.0	17± 1	0.0	0.0

LSD 0.01 للتركيز = 0.639 ,لأقطار التثبيط =0.553 , للتداخل = 1.565

5-3 التنقية الجزئية للبروانثوسيانيدينات من مستخلصي بذور العنب ونوى التمر :-

اختير مستخلصا بذور العنب ونوى التمر (اسيتون 70%) لغرض تنقية البروانثوسيانيدينات منهما نظرا لأعطائهما اعلى النتائج من حيث محتواهما من البروانثوسيانيدينات والفعالية المضادة للأكسدة . بلغت كمية الفينولات والتانينات والبروانثوسيانيدينات في بذور العنب المستخلصة بأستخدام الاسيتون 70% (45.02 و 32.22 و14.25) ملغم/غم,على التوالي,اما الفعالية المضادة للأكسدة فكانت عند التركيز 50 مايكروغرام/مل,بينما اعطى مستخلص الاسيتون 70% لنوى التمر

فعالية مضادة للأكسدة عند التركيز 25 ملغم/مل ,وقد بلغ تركيز الفينولات والتانينات والبروانثوسيانيدينات في هذا المستخلص (41.13 , 27.72 , 24.94) ,على التوالي, وقد خضع هذان المستخلصان المسميان بالمستخلص الخام (Crude extract) لخطوتي تنقية وكالآتي:

1-الاستخلاص بوساطة الكحول الاثيلي 95% :-

ان اذابة مستخلصي بذور العنب ونوى التمر في الكحول الاثيلي 95% وطرده مركزيا ساعد بالتخلص من بعض المركبات الفينولية الاخرى اذ استخدم الايثانول50% من قبل Feldman *et al.* (2012) في تحضيرمعلق من مستخلص التوت البري (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) للتخلص من الانثوسيانينات (Anthocyanins) ذات الاوزان الجزيئية الواطئة والكلايكوسيدات الفلافونولية (Flavonol glycosides) قبل اخضاعها لعملية التنقية بأستخدام الهلام Sephadex LH-20 . اذ تعد هذه الخطوة تهيئة لخطوة التنقية التالية,وقد بلغت نسبة البروانثوسيانيدينات المستحصلة من هذه الخطوة (29.7 و 17.48)% لكل من مستخلصي بذور العنب ونوى التمر,على التوالي وكما هو موضح في الجدول (6).

جدول(6):تنقية البروانثوسيانيدينات من مستخلصي بذور العنب ونوى التمر.

المستخلص / خطوة التنقية	بذور العنب		نوى التمر	
	البروانثوسيانيدينات (ملغم/غم)	الحصيلة %	البروانثوسيانيدينات (ملغم/غم)	الحصيلة %
المستخلص الخام	14.25	100	24.94	100
الاستخلاص بالكحول الاثيلي 95%	4.24	29.7	4.36	17.48
كروماتوغرافي الادمصاص بأستخدام الهلام Sephadex LH-20	3.5	24.5	2.8	11.22

2- كروماتوغرافيا الادمصاص بأستخدا الهلا Sephadex LH-20 :-

استخدا الهلا Sephadex LH-20 في تنقية البروانثوسيانيدينات من مستخلصي بذور العنب ونوى التمر المستحصلين من خطوة التنقية السابقة .

ان هلا Sephadex LH-20 يدمص التانينات في الكحول ويحررها في الاسيتون المائي (Hagerman,2002) ولهذا السبب تم استخدا هذا النوع من الهلا في هذه الدراسة ,وقد جرت عملية التنقية على مرحلتين :-

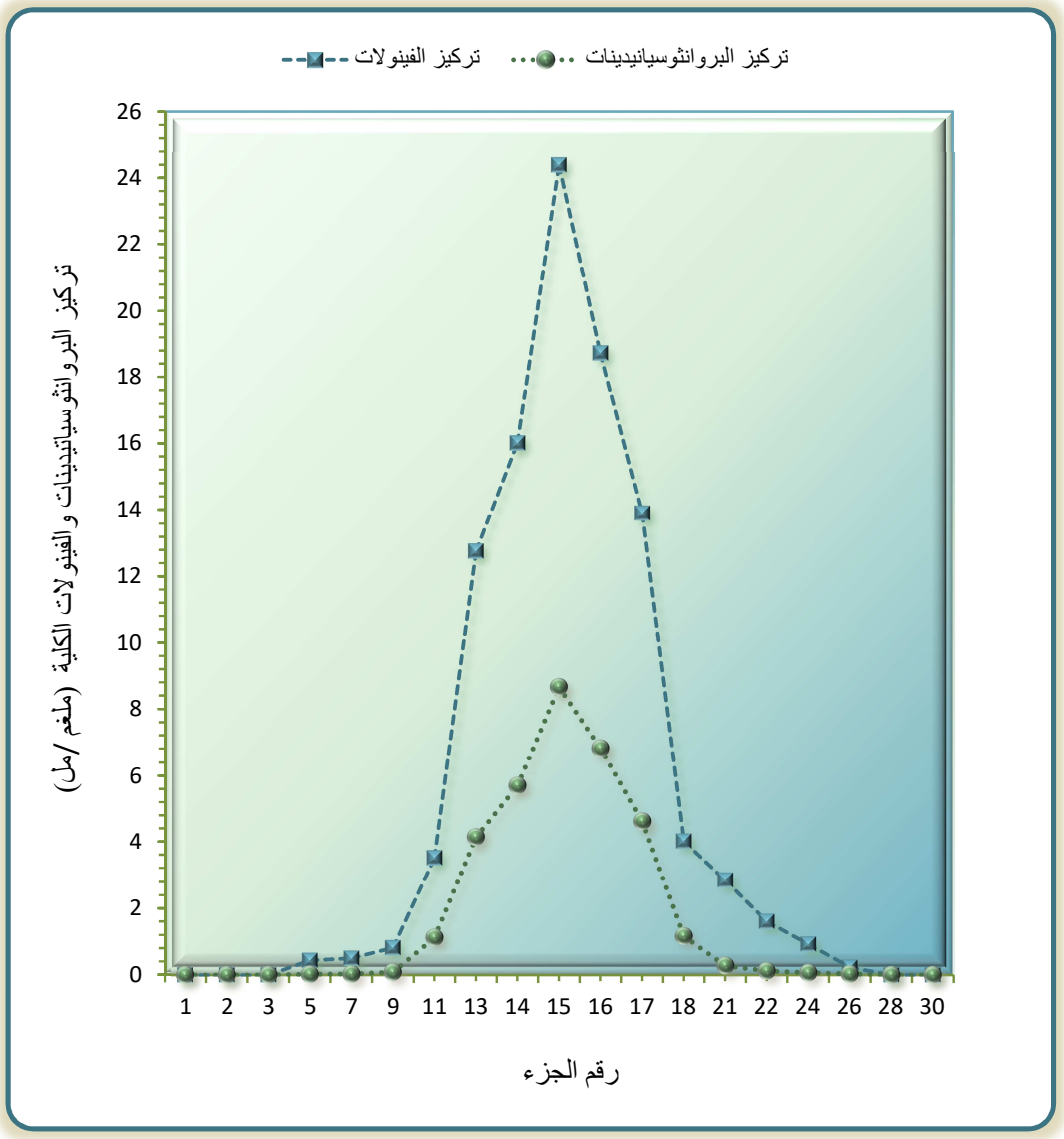
الاولى :- مرحلة الغسل (Wash) والتي جرت بأستخدا الكحول الاثيلي 95% وتم فيها التخلص من جميع المركبات غير المدمصة .

الثانية :- مرحلة الاسترداد (Elution) وتمت بتغيير المذيب من ايثانول 95% الى اسيتون 70% , وبعد جمع 30 جزء (Fraction) [حجم الجزء 3 مل] تم ايقاف عملية الاسترداد.

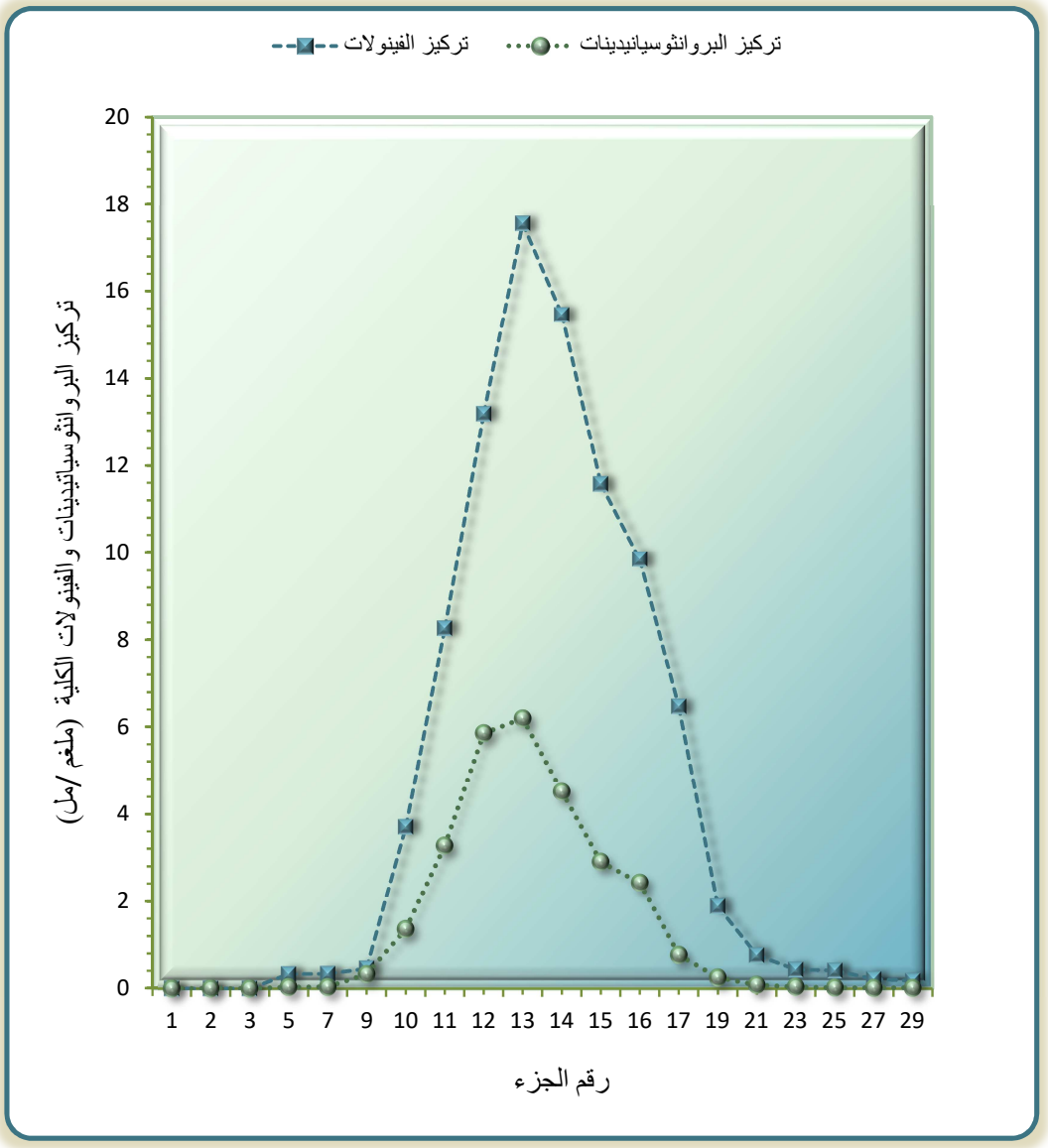
عند تنقية بذور العنب يلاحظ من الشكل (32) ظهور البروانثوسيانيدينات في الاجزاء (9- 22) بينما ظهرت الفينولات الكلية في الاجزاء (5- 26) ويلاحظ ان زيادة تركيز البروانثوسيانيدينات كانت موازية لزيادة تراكيز الفينولات الكلية وقد اعطى الجزء رقم 15 اعلى تركيز لكل من البروانثوسيانيدينات والفينولات الكلية والذي بلغ (8.67 و 24.37) ملغم/ مل ,على التوالي.

وعند تنقية مستخلص نوى التمرظهرت البروانثوسيانيدينات في الاجزاء(9-19) وكما هو الحال في مستخلص بذور العنب ومن خلال الشكل (33) يتضح ان زيادة تركيز البروانثوسيانيدينات في الاجزاء كان موازيا لزيادة تركيز الفينولات الكلية, وقد اعطى الجزء 13 اعلى تركيز لكل من البروانثوسيانيدينات والفينولات الكلية والذي بلغ (6.18 و 17.54) ملغم/مل ,على التوالي ,ويبين لنا الجدول (6) ان نسبة البروانثوسيانيدينات في المستخلص النقي لكل من بذور العنب ونوى التمر (24.5 و11.22)% ,على التوالي ,وقد اظهر المستخلصان النقيان فعالية مضادة للأكسدة عند التركيز الفينولي (0.15 و0.2) ملغم/مل لمستخلصي بذورالعنب ونوى التمر,على التوالي , [الشكلان (34 و35)].

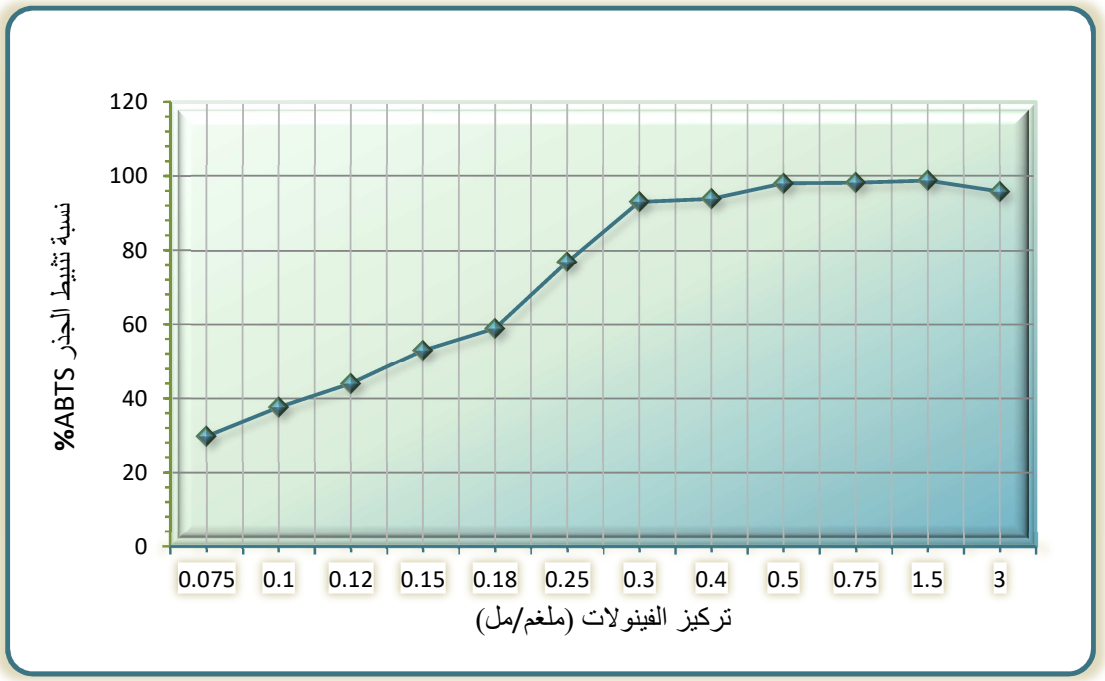
استخدم الهلام Sephadex LH-20 في تنقية البروانثوسيانيدينات قليلة الوحدات من اغلفة بذور (pericarps) نبات Mangosteen وقد بلغت الحصيلة 4.2غم من الوزن الجاف على شكل مسحوق بني فاتح مشتملة على بروانثوسيانيدينات قليلة الوحدات بنسبة 0.66% من الوزن الجاف (Fu *et al.*,2007), كما حصل Moosophin *et al.*(2010) على مسحوق بني فاتح بأستخدام الهلام Sephadex LH-20 في تنقيةالتانينات من مستخلص قشرة نبات Mangosteen.



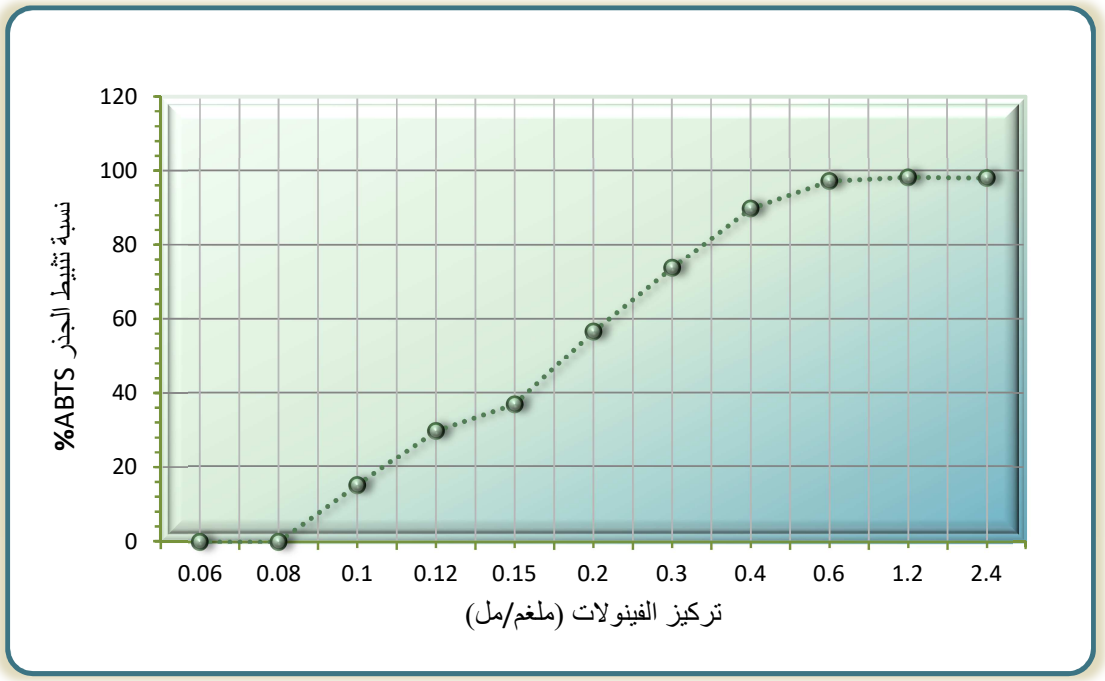
الشكل(32): كروماتوغرافيا الادمصاص للفينولات الكلية والبروانثوسيانيدينات المستخلصة من بذورالعنب بأستخدام الهلام Sephadex LH-20 .



الشكل (33): كروماتوغرافيا الادمصاص للفينولات الكلية والبروانثوسيانيدينات المستخلصة من نوى التمر بأستخدام الهلام Sephadex LH-20 .



الشكل (34): الفعالية المضادة للأكسدة لمستخلص بذورالعنب المنقى بالهلا Sephadex LH-20 .



الشكل (35): الفعالية المضادة للأكسدة لمستخلص نوى التمر المنقى بالهلا Sephadex LH-20.

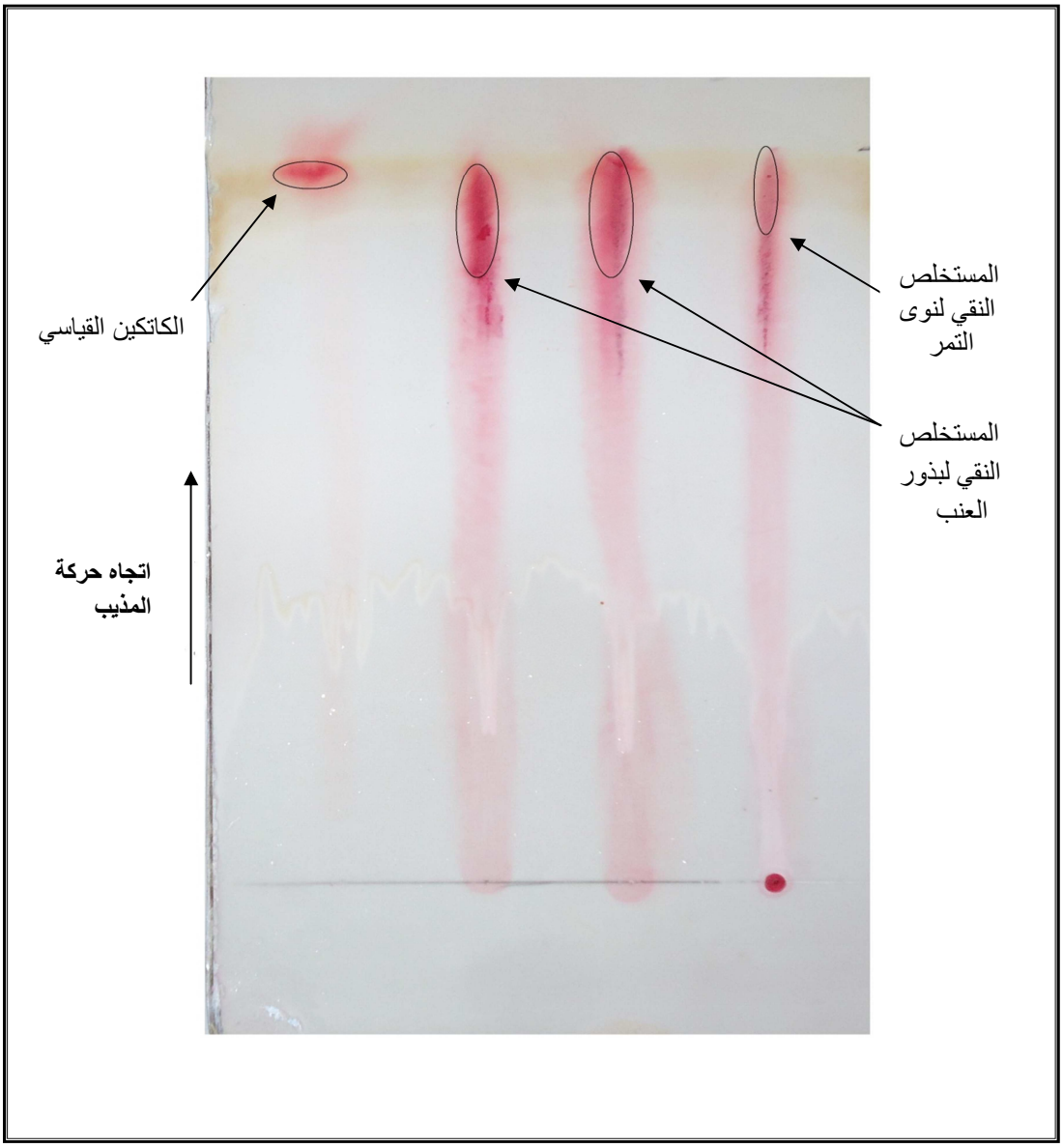
6-3 فصل البروانثوسيانيدينات بكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC):-

تم استخدام هذا النوع من الكروماتوغرافيا لمعرفة نوع البروانثوسيانيدينات الموجود في المستخلص وفحص نقاوة البروانثوسيانيدينات وقياس قيمة R_f بأستخدام مزيج المذيبات المتكون من (ماء مقطر: ميثانول مطلق : كلوروفورم) بنسبة (65:35:10) في عملية الفصل.

تمخض عن عملية الفصل ظهور بقع وردية اللون على صفيحة السيليكا وذلك بعد رشها بمحلول الفانيلين-HCl ,اذ ظهرت بقعة واحدة لكل مستخلص بقيمة R_f مقدارها 0.9025 و0.937 لمستخلصي بذور العنب ونوى التمر, على التوالي.

من المحتمل ان تكون البروانثوسيانيدينات المنقاة من مستخلصي بذور العنب ونوى التمر نقية نظرا لظهور بقعة واحدة لكل مستخلص ,كما تشير قيمة R_f الى ان البروانثوسيانيدينات المنقاة لم تكن كاتكين (Catechine) الذي بلغت قيمة R_f له تحت ظروف الفصل المستخدمة نفسها 0.976.

تعد كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) من التقنيات البسيطة والسريعة فضلا عن كونها متعددة الاستعمال عند متابعة الفينولات المتعددة في المستخلصات النباتية وعند التنقية (Andersen andMarkham,2006).



الشكل (36):كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) للبروانثوسيانيدينات المنقاة جزئيا من بذور العنب ونوى التمر.

الاستنتاجات و التوصيات

Conclusions and Recommendations

الاستنتاجات :

1- الحصول على مصدرين محليين ذا محتويين جيد من البروانثوسيانيدينات يتمثل ببذور العنب ونوى التمر .

2- كفاءة الاسيتون 70% في استخلاص الفينولات الكلية والتانينات والبروانثوسيانيدينات من بذور العنب ونوى التمر فضلا عن المواد المضادة للأكسدة .

3- امكانية تنقية البروانثوسيانيدينات بطرائق بسيطة وقصيرة .

التوصيات :-

1- التحري عن مصادر جديدة للتانينات والبروانثوسيانيدينات من انواع بذور ومخلفات نباتية اخرى .

2- دراسة طرائق استخلاص اخرى للبروانثوسيانيدينات .

3- توصيف البروانثوسيانيدينات المستخلصة من بذور العنب ونوى التمر .

4- استخدام البروانثوسيانيدينات المستخلصة في هذه الدراسة في عمليات تطبيقية .

المصادر

References

المصادر العربية :

غالب ,حسام حسن علي (2012). تقسيم نباتي Botanical Classification شجرة نخيل تمر .*Phoenix dactylifera* L والانواع الاخرى في جنس فينكس (*Phoenix*) . كتاب أطلس اصناف نخيل تمر في دولة الامارات www.iraqi-datepalms.net عربية متحدة /أ.م حسام حسن علي غالب/مركز ايد لتراث وتاريخ /دولة الامارات عربية متحدة.

الخفاجي, محمد عبد الله جبر والغانمي, علي عبد الكاظم جاسم والدعمي,علاء عبد الحسين كريم (2009). استخلاص و تنقية المركبات التانينية لبعض النباتات الطبية و اختبار فعاليتها ضد الاحياء المجهرية. مجلة كربلاء العلمية– المجلدالسابع العدد الثاني/علمي .

المصادر الانكليزية :

Aas, E.(2003). A Practitioners Perspectives:Traditional Tannin-Treatment Against Intestinal Parasites in Sheep and Cattle. Ethnobotany Research & Applications 1:31-37 .

Abe,Y.; Shoji,T.;Kawahara, N.;Kamakura,H.; Kanda,T.;Goda,Y.and Ozeki,Y. (2008).Structural characterization of a procyanidin tetramer and Pentamer from the apple by low-temperature NMR analysis.Tetrahedron Letters 49 ,pp 6413–6418.

Adedapo,A.A.;Jimoh,F.O.;Afolayan,A.J. and Masika,P.J.(2009). Antioxidant Properties of the Methanol Extracts of the Leaves and Stems of *Celtis Africana*.Rec.Nat.Prod. 3:1 pp 23-31.

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

Akoh,C. C.;and Min, D. B.(2002). Food Lipids Chemistry, Nutrition, and Biotechnology. Marcel Dekker, Inc. New York • Basel.

Al-Daihan,S. and Bhat,R.S. (2012). Antibacterial activities of extracts of leaf, fruit, seed and bark of *Phoenix dactylifera*. African Journal of Biotechnology Vol. 11(42), pp. 10021-10025.

Al-Farsi,M.; Alasalvar,C.; Morris,A.; Bark,B. and Shahidi,F.(2005) Comparison of Antioxidant Activity, Anthocyanins, Carotenoids, and Phenolics of Three Native Fresh and Sun-Dried Date (*Phoenix dactylifera* L.) Varieties Grown in Oman. J. Agric. Food Chem. 2005, 53, 7592-7599.

Al-Farsi,M.;Alasalvar,C.;Al-Abid,M.;Al-Shoaily,K.;Al-Amry,M. and Al-Rawahy.(2006) compositional and functional characteristics of date ,Syrups, and their by-products.Food Chemistry-FOOD CHEM ,vol.104, no. 3, pp.943-947.

Al–Ghanimi, A.A.; Al–Ethari, A.Y. and Abdulhusain, H.K. (2007). Partial purification of tannins from *Quercus infectoria* galls and the study of its effect on some isolated skin pathogenic micro-organisms. Journal of Kerbala University, Vol.5 No.4 Scientific. pp: 227-234.

Al-seeni, M. N.(2012). Minerals Content and Antimicrobial Efficacy of date Extracts against Some Pathogenic Bacteria. Life Science Journal;9(2).

Al-Qarawi, A.A.; Mousa, H.M;Ali, B.E.H.; Abdel-Rahman, H. and El-Mougy, A.A.(2004) "Protective effect of extracts from dates (*Phoenixdactylifera* L.) on carbon tetrachloride–induced hepatotoxicity in rats". Int J Appl Res Vet Med 2:176–80.

Andersen,Q.M. and Markham,K.R.(2006). Flavonoids Chemistery, Biochemistery,and Applications.CRC Press,Taylor &France Groupe.

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.

Asl,M.N. and Hosseinzadeh,H.(2009).Review of the Pharmacological Effects of *Vitis vinifera* (Grape) and its Bioactive Compounds (Review). Phytother. Res. 23, 1197–1204 .

Atale,N.;Jaiswal,A.;Chhabra,A.;Malhotra,U.;Kohli,S.;Mohanty,S. and Rani,V. (2011).Phytochemical and antioxidant screening of *Syzygium cumini* seed Extracts: Acomparative study.Journal Pharmacy Research ,4(12),4530-4532.

Augstburger,F.; Berger, J.; Censkowsky,U.;Heid,P.;Milz,J. and Streit,C. (2002). Organic Farming in theTropics and Subtropics. Naturland e.V.-1st edition .

Banner Bio Nutraceuticals Inc. Grape Seed Extract. Ver:2.0 ,April 30, 2008.http: // www.bannerbio.com/ .

Beecher, G. R.(2004). Proanthocyanidins: Biological Activities Associated with Human Health. Pharmaceutical Biology ,2004, Vol. 42, Supplement, pp. 2–20.

Bele, A. A.; Jadhav, M. V. and Kadam,V. J. (2010). Potential of Tannins (Review).Asian Journal of Plant Sciences 9 (4):209-214.

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.

Bucić-Kojić,A.; Planinić,M.;Tomas,S.; Jokić,S.;Mujić,I.;Bilić,M. and Velić,V.(2011). Effect of Extraction Conditions 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.

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.

Busse-Valverde,N.;Gómez-Plaza,E.;López-Roca,J.M.;Gil-Muńoz,R. ;Fernández- Fernández,J.I. and Bautista-Ortín(2010) . Effect of Different Enological Practices on Skin and Seed Proanthocyanidins in Three Varietal Wines. J. Agric. Food Chem. 58, 11333–11339; DOI:10.1021/jf102265c.

Butkhup, L. ; Chowtivannakul, S.; Gaensakoo, R.; Prathepha, P. and Samappito, S.(2010). Study of the Phenolic Composition of Shiraz Red Grape Cultivar (*Vitis vinifera* L.) Cultivated in North-eastern Thailand and its Antioxidant and Antimicrobial Activity.

S. Afr. J. Enol. Vitic., Vol. 31, No. 2.

Buyukcapar,H.M. and Kamalak, A. (2007). Condensed Tannin Content of some Legume seed used in fish nutrition .Journal of Biological Sciences 7 (1): 74-76 .

Cai,Y.; Luo,Q.;Sun.M. and Corke,H. (2003). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. Life Sciences 74 , 2157–2184.

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* .

Cartea,M.E.;Francisco,M.;Soengas,P. and Velasco,P.(2011). Phenolic Compounds in Brassica Vegetables (Review). *Molecules* , 16, 251-280; doi:10.3390/molecules1601025.

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 .

China Papers, Extraction ,Separation and in Vitro Antioxidative Effects of Proanthocyanidins in *Radix Sanguisorbae*.http://mt.china-papers.com/2/?p=48823 .

Chun-hui,L.;Ya-ping,Z.; Jun,Z.and Hong-yi,D.(2008).Ultrasound-assisted extraction of proanthocyanidin from apple flesh.journal of science and biotechnology.

Choe, E. and Min, D. B.(2006). Mechanisms and Factors for Edible Oil Oxidation. Comprehensive reviews in food science and food safety , Vol. 5.

Choe, E. and Min, D. B.(2007). Chemistry of Deep-Fat Frying Oils. Journal of food science, Vol. 72, Nr. 5.

Choe,E.;and Min,D.B.(2009).Mechanisms of Antioxidant in the Oxidation of Foods. Comprehensive reviews in food science and food safety ,Vol 8.

Cobzac,S.; Moldovan, M.; Olah,N.K.; Bobo,L. and Surducan,E. (2005) Tannin Extraction Efficiency, from *Rubus Idaeus, Cydonia Oblonga* and *Rumex Acetosa*, Using Different Extraction Techniques and Spectrophotometric Quantification. Acta Universitatis Cibiniensis Seria F Chemia 8:55-59.

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.

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.

Dauqan, E.M.A.; Abdullah.A.; and Sani,H.A.(2011). Natural Antioxidants, Lipid Profile, Lipid Peroxidation, Antioxidant Enzymes of Different Vegetable Oils. Advance Journal of Food Science and Technology 3(4): 308-316.

Dixon,R.A.; Xie,D.Y, and Sharma S.B.(2004). Proanthocyanidins: A Final Frontier in Flavonoid Research?(Review).New Phytologist,Vol. 165, No. 1 , pp. 9-28.

Delehanty,J.B.;Johnson,B.J.;Hickey,T.E.;Pons,T. and Ligler,F.S.(2007). Binding and Neutralization of Lipopolysaccharides by Plant Proanthocyanidins.J.Nat.Prod. ,70 (11) ,pp 1718-172 ,DOI : 10.1021/np0703601.

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.

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 .

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.

Downey.M.(2010). Tannin Management in the Vineyard. Fact Sheet.

Duke, J. A.(1998). *Vitis vinifera* L. http://www.hort.purdue. edu/newcrop/ duke_energy/Vitis_vinifera.html.

Egorove , N.S. (1985). Antibiotics a scientific approach. Mir Publishers. Moscow.

El-Hajj, Y. ; Louka,N.; Nguyen, C.;and Maroun,R.G.(2012). Low Cost Process for Phenolic Compounds Extraction from Cabernet Sauvignon Grapes (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon). Optimization by Response Surface Methodology. Food and Nutrition Sciences, 3, 89-103.

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 .

El-Gharras,H.(2009). Polyphenols: food sources, properties and applications – a review. International Journal of Food Science and Technology , 44, 2512–2518.

Feldman,M.; Tanabe,S.; Howell,A. and Grenier,D. (2012). Cranberry proanthocyanidins inhibit the adherence properties of *Candida albicans* and cytokine secretion by oral epithelial cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine , 12:6.*

Fine, A.M.(2000). Oligomeric Proanthocyanidin Complexes:History, Structure, and Phytopharmaceutical Applications. (Altern Med Rev ;5(2):144-151).

Frankel,E.N.(1991). Recent Advances in Lipid Oxidation (Review) J Sci Food A.gric . S4, 495-511.

Fu,C.; Loo,A.E.K.; Chia.F.P.P. and Huang,D. (2007). Oligomeric Proanthocyanidins from Mangosteen Pericarps. J. Agric. Food Chem. 55, 7689–7694.

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.

Gonçalves,C.; Dinis,T.;and Batista M.T.(2005). Antioxidant properties of proanthocyanidins of Uncaria tomentosa bark decoction: amechanism for anti-inflammatory activity. Phytochemistry 66 : 89–98.

Gnamm, H. (I 949) : Gerbstoffe und gerbmiltel.-Wissenschaftliche verlagesellschaft, Stuttgart, p.235-259.Cited from (Luthar,1992)

Guang,L.W.; Xiao-Yu,Z.; Yong-Jie,W. and Xuan,T.(2001).Anti-inflammatory effect and mechanism of proanthocyanidins from grape seeds.22 (12):1117-1120.

Hagerman, A. E. (2002). Tannin Handbook . Miami University U.S.A.

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.

Hagerman,A.N.; Riedl,K.M.;Jones,G.A.. Sovik,K.N.; Ritchard,N.T.; Hartzfeld,P.W. and Riechel,T.L.(1998). High Molecular Weight Plant Polyphenolics (Tannins) as Biological Antioxidants. J. Agric. Food Chem. 46, 1887-1892.

Hamada,J.S.;Hashim,I.B. and Sharif A.B.(2002). Preliminary analysis and potential uses of date pits in foods. Food Chemistry 76 135–137.

Hamid,A.A.; Aiyelaagbe,O.O.;Usman, L. A.; Ameen,O. M.and Lawal, A. (2010). Antioxidants: Its medicinal and pharmacological Applications(Review). African Journal of Pure and Applied Chemistry Vol. 4(8), pp. 142-151.

Han,X.; Shen,T. and Lou,H.(2007). Dietary Polyphenols and Their Biological Significance(Review). Int.J. Mol.Sci.8,950-988.

Hassanpour,S.;Maheri-Sis,N.;Eshratkhah,B.and Mehmandar,F.B.(2011). Plants and secondary metabolites (Tannins) . (Review) . International Journal of forest, Soil and Erosion,1(1);47-53.

Hasnaoui,A.; Elhoumaizi,M.A.; Asehraou,A.; Sindic,M.; Deroanne,C. and Hakkou,A.(2010). Chemical Composition and Microbial Quality of Dates Grown in Figuig Oasis of Morocco. Int. J. Agric. Biol., 12: 311–314.

He, Z.; Fu,M. and Mao,L.(2011). Total phenolic, condensed tannin and antioxidant activity of four *Carya* species from China. African Journal of Biotechnology Vol. 10(51), pp. 10472-10477, 7 .

Hilton, J. W. (1989).Antioxidants: function,type and necessity of inclusion in pet foods.Can Vet J Volume 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 .

Hosseinian,F.S.;Li,W.;Hydamaka,A.W.;Tsopmo,A.;Lowry,L. and Beta,T. (2007). Proanthocyanidin Profile and ORAC Values of Manitoba Berries, Chokecherries, and Seabuckthorn. J. Agric. Food Chem. , 55, 6970-6976.

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 .

Huang,Y.; Doligez,A.; Fournier-Level, A.; Le Cunff,L. Bertrand,Y.; Canaguier,A.; Morel,C.; Miralles,V.; Veran, F.; Souquet,J.; Cheynier,V.; Terrier,N.; and This,P. (2012). Dissecting Genetic Architecture of Grape Proanthocyanidin Composition through quantitative trait locus mapping . BMC Plant Biology , 12:30.

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.

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.

Jayaprakasha,G.K. ;Selvi,T.and Sakariah,K.K.(2003). Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. Food Research International 36 , 117–122.

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.

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 .

Kalantaripour, T.P.; Asadi-Shekaari, M. ; Basiri, M. and Gholaamhosseinian, N. A.(2012). Cerebroprotective Effect of Date Seed Extract (*Phoenix dactylifera*) on Focal Cerebral Ischemia in Male Rats. Journal of Biological Sciences, 12: 180-185.

Karamać,M.; Kosińska,A.and Chavan,U.D.(2005).Rapid chromatographic method for separation of green tea proanthocyanidin. Pol. J. Food Nutr. Sci. Vol. 14/55, No 3, pp. 243–247.

Karonen,M.;Ossipov,V.; Sinkkonen,J.; Loponen,J.; Haukioja,E. and Pihlaja,K.(2006). Quantitative analysis of polymeric proanthocyanidins in Birch leaves with normal-phase HPLC. Phytochem. Anal. 17: 149–156.

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.

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.

Khanbabaee,K. and Ree,T.(2001). Tannins: Classification and Definition. Nat.Prod. Rep., 18, 641–649.

Khan,R.; Khan,M.;Sahreen,S. and Ahmed,M.(2012). Evaluation of phenolic contents and antioxidant activity of various solvent extracts of *Sonchus asper* (L.) Hill. Chemistry Central Journal

, 6:12.

Khattab,R.;Goldberg,E.;Lin,L.and Thiyam U.(2010). Quantitative analysis and free-radical-scavenging activity of chlorophyll,phytic acid, and condensed tannins in canola. Food Chemistry 122,1266–1272.

Koleckar, V.; Kubikova, K.; Rehakova, Z.; Kuca, K.; Jun, D.; Jahodar, L.; Opletal, L. (2008) Condensed and hydrolysable tannins as Antioxidants influencing the health. Mini Rev. Med. Chem. 8,436-447.Cited from (Dai, J.; and Mumper,R.J.2010).

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.

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

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

Kumar,S.(2011).Free radicals antioxidants:Human and food system. Advances in applied science research.2 (1):129-135.

Lattanzio,v.; Lattanzio, V.M.T.; and Cardinali,A.(2006). Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. Research Signpost, 37/661 (2), Fort P.O., Trivandrum-695 023, Kerala, India.

Leigh and Jacena,M.(2003). Health Benefits of Grape Seed Proanthocyanidin Extract (GSPE). Nutrition Noteworthy, 6(1), Article 5 .

Li,H.;Wang,X.;Li,P.;Li,Y. and Wang,H.(2008).Comparative study of

antioxidant activity of grape (*Vitis Vinifera*) seed powde assessed by different methods.Journal of Food and Drug Analysis, Vol. 16. No .6 , Pages .

Li, Z.H.; Wang,Q.; Ruan, X.; Pan,C.D. and Jiang, De-An.(2010). Phenolics and Plant Allelopathy(Review).*Molecules* ,15,8933-8952; doi: 10.3390 /molecules15128933.

Liu,M.; Li ,X.Q.; Weber,C.; Lee,Z.;Brown,J. and Liu,R.H. (2002). Antioxidant and Antiproliferative Activities of Raspberries. J. Agric. Food Chem. 50, 2926-2930.

Liu, S. X. and White, E.(2012). Extraction and Characterization of Proanthocyanidins from Grape Seeds .The Open Food Science Journal, 6, 5-11.

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

Luthar, Z. (1992). Polyphenol classification and tannin content of buckwheat seed (*Fagopyrum esculentum* Moench). Fagopyrum 12 : 36 – 42.

Martín,M.L.M.; Fuguet,E.; Quero,C.; Pérez-Jiménez,J.and Torres,J.L. (2012)New identification of proanthocyanidins in cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* L.) using MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. Anal Bioanal Chem .402:1327–1336.

Mahajan,A. and Tandon,V.R.(2004). Antioxidant and rheumatoid arthritis (Review article). J Indian Rheumatol Assoc .12:139–142.

Mazandarani, M.; Zarghami Moghaddam, P.; Zolfaghari, M. R.; Ghaemi, E. A. and Bayat, H.(2012). Effects of solvent type on phenolics

and flavonoids content and antioxidant activities in Onosma dichroanthum Boiss. Journal of Medicinal Plants Research Vol. 6 (28), pp. 4481-4488.

Mencarelli,F. and DiRenzo,G.(2005). GRAPE: Post-harvest Operations.

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.

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).

Muchuweti,M.;Ndhlala,A.R. and Kasiyamhuru,A.(2005). Estimation of The degree of polymerization of condensed tannins of some wild fruits of Zimbabwe (*Uapaca kirkiana* and *Ziziphus mauritiana*) using the modified vanillin-HCl method. J Sci Food Agric 85:1647– 1650 ; DOI: 10. 1002/jsfa.2163.

Murray M, Pizzorno J. Procyanidolic oligomers.In: Murray M, Pizzorno J, eds.TheTextbook of Natural Medicine(1999). 2nd ed.London: Churchill, Livingston; 899-902.Cited from (Fine, A.M.2000).

Naczk,M.;and Shahidi, F.(2004). Extraction and analysis of phenolics in food (Review).Journal of Chromatography A,1054,95-111.

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

Nantitanon,W.; Yotsawimonwat,S. and Okonogi,s. (2010). Factors influencing antioxidant activities and total phenolic content of guava leaf extract. LWT - Food Science and Technology 43

1095e1103.

Nguyen,Q.V. and Eun,J.B. (2011). Antioxidant activity of solvent extracts from Vietnamese medicinal plants. Journal of Medicinal Plants Research Vol. 5(13), pp. 2798-2811, 4 July, 2011.

Nonaka, G.(1989). Isolation and structure elucidation of tannins. Pure and Appl. Chem., Vol. 61, No. 3, pp. 357-360.

Okuda, T. and Ito, H.(2011). Tannins of Constant Structure in Medicinal and Food Plants—Hydrolyzable Tannins and Polyphenols Related toTannins(Review). *Molecules* , 16, 2191-2217; doi:10.3390 /molecules16032191.

Olorunnisola, O. S.; Bradley,G. and Afolayan, A. J. (2012). Antioxidant activity of acetone and ethanolic leaves extracts of *Hippobromus pauciflorus* (L.f.) Radlk. African Journal of Biotechnology Vol. 11(5), pp. 1206-1213, 16 .

Perret,C.;Tabacchi,R. and Pezet,R.(2001).Analysis of oligomeric and polymeric tannins of grape berries by liquid chromatography/ electrospray ionization multiple-stage tandem mass spectrometry.Eur. J.Mass Spectrom. 7,419-426 .

Perveen,K.; Bokhari,N.A. and Soliman,D.A.W.(2011). Antibacterial activity of *Phoenix dactylifera* L. leaf and pit extracts against selected Gram negative and Gram positive pathogenic bacteria. Journal of Medicinal Plants Research Vol. 6(2), pp. 296-300, 16.

Pinelo,M.;Rubilar,M.;Jerez,M.;Sineiro,J. and Núňez,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.

Pinelo,M.; Arnous,A.and Meyer,A.S.(2006).Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. TrendsFood Science & Technology. Volume 17, Pages 579‑590.Cited from Fiori,L.;De Faveri,D.;Casazza,A.A. and Perego,P.Grape by product: extraction of polyphenolic compounds using supercritical CO_2 and liquid organic solvent –apreiminary investigation .

Prior, R.L. and Gu, L.(2005). Occurrence and biological significance of proanthocyanidins in the American diet. Phytochemistry 66, 2264 –2280.

Qian ,H. and Nihorimbere,V.(2004) Antioxidant power of phytochemicals from *Psidium guajava* leaf. J Zhejiang Univ Sci 5:676–683.Cited from (Sub ku *et al*.,2007).

Rangari,V.D. (2007).Tannin Containing Drugs.J.L.Chaturvedi College of Pharmacy 846, New Nandanvan Nagpur-440009.

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

Rao, L.J. M.; Yada, H.;Ono,H.;Ohnishi-Kameyama,M. and Yoshida, M. (2004). Occurrence of antioxidant and radical scavenging proanthocyanidins from the Indian minor spice nagkesar (*Mammea longifolia* planch and triana syn). Bioorganic & Medicinal Chemistry 12 ,31–36.

Rathore,G.S.; Suther,M.; Pareek,A. and Gupta,R.N.(2011).Nutritional antioxidant :Abattle for health.Journal of Natural Pharmaceuticals, Volume 2, Issue 1.

Reed,C. (2009). Import Risk Analysis: Table grapes from China. MAF Biosecurity New Zealand, Final version.

Reed ,J.D.(1995). Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. J ANIM SCI , 73:1516-1528.

Rispail, N.; Morris, P.; and Webb K.J. (2005). Phenolic compounds : Extraction and analysis.A.J. Márquez (Editorial Director). *Lotus japonicas* Handbook. pp.349-355.

Salganik, R. I.(2001). The Benefits and Hazards of Antioxidants: Controlling Apoptosis and Other Protective Mechanisms in Cancer Patients and the Human Population(Review).Journal of The American College of Nutrition, Vol. 20, No. 5, 464S–472S.

Scalbert,A. (1991).Phytochemistry,1991,30,3875.Cited from Cos,et al. (2003).

Senthilkumar,N.; Murugesan,S.; Vijayalakshmi,K.B.; Monisha,M.; Babu,D.S.;Lakshmidevi,R. and Manivachakam,P.(2012). Insecticidal Properties of Certain Flora based on Ethnobotanical Records Against Teak defoliator, H. puera Cramer *(Lepidoptera: Hybaeidae*). European Journal of Experimental Biology, (3):513-519.

Shabir,G.;Anwar,F.;Sultana,B.; Khalid,Z.M.;Afzal,M.;Khan,Q.M. and Ashrafuzzaman,M. (2011). Antioxidant and Antimicrobial Attributes and Phenolics of Different Solvent Extracts from Leaves, Flowers and Bark of Gold Mohar [*Delonix regia* (Bojer ex Hook.) Raf.]. *Molecules* , 16, 7302-7319; doi:10.3390 molecules16097302.

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.

Shahidi,F. and Zhong,Y.(2005). Lipid Oxidation:Measurement Methods. Section (8) Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Sixth Edition , SixVolume Set.

Shi,j.;Yu,J.;Pohorly,J.E. and Kakuda,Y.(2003).Polyphenolics in Grape Seed-Biochemistry and Functionality.Journal of medicinal food 6(4) ,291-299.

Silanikove,N.;Perevolotsky,A. and Provenza,F.D.(2001).Use of tannin-binding chemicals to assay effects in ruminants.Animal Feed Science and Technology,91 , 69-81.

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).

Simkó,M.; Gazsó,A.;Fiedeler,U. and Nentwich,M.(2011). Nanoparticles, free radicals and oxidative stress. NanoTrust-Dossier No. 012en.

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).

Sochor, J.; Ryvolova ,M.;Krystofova,O.;Salas,P.; Hubalek,J.; Adam ,V. ; Trnkova ,L.; Havel ,L.; Beklova , M.; Zehnalek,J Provaznik , I. and Kizek,R.(2010). Fully Automated Spectrometric Protocols for Determination of Antioxidant Activity: Advantages and Disadvantages. Molecules , 15, 8618-8640; doi:10 . 3390 molecules15128618.

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.

Sub Ku,C.; Jang,J.P. and Mun,S.P. (2007). Exploitation of polyphenol-rich

pine barks for potent antioxidant activity. J Wood Sci , 53:524–528, DOI 10.1007/s10086-007-0896-6.

Sultana,B.; Anwar,F. and Ashraf,M. (2009). Effect of Extraction Solvent/Technique on the Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plant Extracts. Molecules , 14, 2167-2180; doi:10.3390/molecules14062167.

Sun, B.;and Spranger M.I.(2005).Quantitative extraction and analysis of grape and wine proanthocyanidins and stilbenes (Review). Ciência Têc Vitiv. 20 (2), 59-89.

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.

Sun,Y.; Wang,W.; Chen,H.and Li,C.(2011). Autoxidation of Unsaturated Lipids in Food Emulsion. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 51:453–466.

Tao,Z.; Chao.L.and Xue-bing,S.(2011).Cellulase-assisted extraction of Proanthocyanidins from grape seeds.China food additives.DOI: CNKI:SUN:ZSTJ.0.05-012.

Tatiya,A.U.; Tapadiya,G.G.;Kotecha,S. and Surana,S.J.(2011). Effect of solvents on total phenolics, antioxidant and antimicrobial properties of *Bridelia retusa* Spreng. stem bark. Indian Journal of Natural Products and Resources Vol. 2(4), pp.442-447.

Terral,J.;, Tabard,H.;Bouby,L.;Ivorra,S.;Pastor,T.;Figueiral,I.;Picq,S.; Chevance,J.; Jung,C.; Fabre,L.; Tardy,C.; Compan,M.;Bacilieri, R.;Lacombe,T. and This,P.(2010). Evolution and history of grapevine(*Vitis vinifera*) under domestication:new morphometric perspectives to understand seed domestication syndrome and reveal origins of ancient European cultivars. Annals of Botany 105: 443–455.

Thaipong,K.; Boonprakob,U. Crosby,K.;Zevallos,and Byrne, D.H.(2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. Journal of Food Composition and Analysis 19 , 669–675.

Thoo ,Y.Y,;Kheng Ho,S.;Yun Liang,J.; Wai Ho,C. and Ping Tan,C.(2010). Effects of binary solvent extraction system, extraction time and extraction temperature on phenolic antioxidants and antioxidant capacity from mengkudu (*Morinda citrifolia*). Food Chemistry 120, 290–295.

Ting Kao,T.;Tu ,H.C.; Chang,W.N.; Chen ,B.H.;Shi ,Y.Y.; Chang,T.C.and Fu,T.F.(2010). Grape seed extract inhibits the growth and pathogenicity of Staphylococcus aureus by interfering with dihydrofolate reductase activity and folate-mediated one-carbon metabolism. International Journal of Food Microbiology 141,17–27.

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) : 119– 128.

Valls,j.;Silvia,M.;Martí,M.P.;Borrà,E.and Arola,L.(2009).Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols(Review). Journal of Chromatography A,1216,7143-7172.

Venter,P.B.;Senekal,N.D.;Amra-Jordaan,M.;Bonnet,S.L.and Westhuizen, J.H.(2012). Analysis of commercial proanthocyanidins. Part2:An electrospray mass spectrometry investigation into the chemical composition of sulfited quebracho (*Schinopsis lorentzii* and *Schinopsis balansae*) heartwood extract. Phytochemistry 78 156– 169.

Vivas,N.;Nonier,M.F.; de Gaulejac,N.V.; Absalon,C.; Bertrand,A. and

Mirabel,M.(2004). Differentiation of proanthocyanidin tannins from seeds, skins and stems of grapes (*Vitis vinifera*) and heartwood of Quebracho(*Schinopsis balansae*) by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and thioacidolysis/liquid chromatography /electrospray ionization mass spectrometry. AnalyticaChimica Acta 513 , 247–256.

Vyawahare,N.;Rujari,R.;Khsirsagar,A.;Ingawale,D.;Patil,M. and Kagathara ,V.(2009).Phoenix dactylifera:An update of its Indigenous uses, phytochemistry and pharmacology.The Journal of pharmacology, Volume 7 Number 1.

Wanasundara , P. K. J. P. D.and Shahidi,F.(2005). Antioxidants: Science, Technology, and .Applications. Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Sixth Edition, Six Volume Set.

Wang,L. and Weller, C. L.(2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants(Review). Trends in Food Science & Technology 17 ,300–312.

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.

Wei,S.D.; Lin, Y.M.; Liao,M.M.; Chai, W.M.and Zhou,H.C.(2012). Structural Composition and Free Radical Scavenging Activity of Proanthocyanidins Extracted from *Grevillea robusta.* Rec. Nat. Prod. 6 :3 ,218-229.

Wei, S.D.; Zhou, H.C.; Lin, Y.M.; Liao, M.M. and Chai, W.M.(2010). MALDI-TOF MS Analysis of Condensed Tannins with Potent Antioxidant Activity from the Leaf, Stem Bark and Root Bark of *Acacia confuse*. *Molecules* , 15, 4369-4381; doi:10.3390 /molecules15064369.

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.

Wu,C. D.(2009). Grape Products and Oral Health.The Journal of Nutrition, Supplement: Grapes and Health .

Würdig,G.and Woller,R. (1989).Chemie des Weines,Eugen Ulmer GmbH, Stuttgart.Cited from (Khanbabaee and Ree ,2001)

Xia, E.Q.; Deng, G.F. ; Guo,Y.J. and Li, H.B.(2010). Biological Activities of Polyphenols from Grapes(Review). Int. J. Mol. Sci. 11, 622-646; doi:10.3390/ijms11020622.

Yadav,M.;Jain,S.; Bhardwaj,A.;Nagpal,R.; Puniya,M.;Tomar,R.; Singh,V.; Parkash,O.; Prasad, G.B.K.S. ; Marotta,F. and Yadav,H.(2009). Biological and Medicinal Properties of Grapes and Their BioactiveConstituents: An Update(Review).J Med Food 12 (3) , 473–484.

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.

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).

Zhou ,H.C.;Lin,Y.M.;Li,Y.Y.;Li,M.;Wei,S.D.;Chai,W.M. and Tam,N.F.Y. (2011). Antioxidant properties of polymeric proanthocyanidins from fruit stones and pericarps of *Litchi chinensis* Sonn. Food Research International 44 (2011) 613–620.

Summary

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 , and evaluation the antioxidant activity of the two extracts,as well as proanthocyanidins purification from the extracts foregoing. The resulst revealed the following:-

1- After screening of twelve plant extracts including *Citrus reticulata , Musa acuminata, Punica granatum L.* and *Citrus sinensis* peels , *Myrtus communis* leaves, *Citrus sinensis* and *Vitis vinifera* seeds as well as *Phoenix dactylifera* seeds befor cooking and after , *Vitis vinifera* fruit skin , *Triticum aestivum* bran and *Camellia sinensis* leaves after cooking.the results showed that grape seeds and date seeds extracts contain the highest amounts of proanthocyanidins and therefore chosed for furthure studies.

2- 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 time 12 hours and shaking speed (50) rpm were the best in extraction of proanthocyanidins from both extracts.

3- 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.

4- The ABTS assay was used for determining antioxidant activity of grape and date seeds extracts. Results indicated that the highest antioxidant of grape seeds was shown by acetone 70% extract .The acetone 70% and methanol

80% date seeds extracts possessed hieghest antioxidant activity than other extracts.

5- Several concentrations [(1,5,10,15,25) mg/ml] of grape seeds and date seeds extracts were tested for antibacterial activity(by agar well diffusion method) against *Escherichia coli , Proteus ssp , Pseudomonas aeruginosa , Staphylococcus aureus , Streptococcus fecalis and Streptococcus pyogens* bacteria,the results revealed the following:-

a-The highest antibacterial activity of grape seeds extract was against *Pseudomonas aeruginosa* ,and the minimum inhibitory concentration (MIC) was 10 mg/ml against *Proteus ssp, Staphylococcus aureus and Streptococcus pyogens*, and (5 and 10) mg/ml against *Pseudomonas aeruginosa and Streptococcus fecalis* ,respectively. While there was no effect towards Escherichia coli in all extract concentration used in this study.

b- date seeds extract showed antibacterial activity against *Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus* only, with minimum inhibitory concentration (MIC) of (5 and 10) mg/ml , respectively .

6- The proanthocyanidins were purified from grape and date seeds extracts .The purification procedure included extraction with ethanol 95% for both extracts and then using adsorption chromatography with sephadex LH – 20 gel , where the ratio of proanthocyanidins reached (29.7 and 24.5) and (17.48 and11.22)% for the two purification steps of grape seeds and date seeds extracts , respectively .

7- The purified proanthocyanidins from grape seeds and date seeds extracts showed a single spot when separated with thin layer chromatography with R_f values of (0.9025 and 0.937) in comparison with R_f value for standard catechine which reached to (0.976).

Ministry of Higher Education & Scientific Research

University of Karbala

College of Sciences- Department of Biology

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

A thesis

Submitted to the council of the

College of Science – University of Karbala

In partial of fulfillment of requirements for degree of Master of Science in Biology

By

Maryam Hadi Jabbar

B.SC. Kerbala University 2006

Supervied by

Asst. Prof.

Dr. Ali Abdul Kadhim Al-Ghanimi

Asst. Prof.

Dr.Najeh Hashem Kadhim

2013 **1434**