Extrication and Identification of some flavonid compounds from grape seeds Shada Sodda, Bedha *Vitis vinifera* L. and waste of grape juice by chromatographic liquid high-performance (HPLC)

استخلاص وتشخيص بعض المركبات الفلافونويدية من بذور العنب شدة سوداء وبيضاء *Vitis vinifera L.* ومخلفات عصير العنب بكروماتوكرافي السائل عالي الأداء

اشراق منير محمد/ قسم علوم الأغذية / كلية الزراعة/ جامعة بغداد
التخصص الدقيق / تقانات احيائية.
ashraqmoner@yahoo.com

المستخلص:-

تم استخلاص 4 مركبات فلافونويدية من بذور صنفي العنب شدة سوداء وبيضاء. *Vitis vinifera L* و مخلفات عصير العنب, بعد تحطيم الاواصر الكلايكوسيدية باستعمال جهاز سوكسليت (Soxhelt) وبواسطة الايثر النفطي (Petroleum ether) على درجة حرارة 60 - 80 مْ ولمدة 6 ساعات يعقبها استخلاص المسحوق بالجهاز لمدة8 ساعات بواسطة خليط من المذيبات المتكون من الميثانول : الماء : حامض الخليك (0.5:9.5:90) , وشخصت المركبات في المستخلصات الثلاث بانها الكاتكين (Catechin) و-λ بروكاتكين (λ–procatechin) في بذور العنب شدة سوداء والأبي كاتكين (Epicatechin) في بذور العنب شدة بيضاء أما مخلفات عصير العنب فالمركب السائد فيها الكاتيكول (Catechol) , بواسطة تقنية كروماتوكرافي السائل عالي الأداء (HPLC) واستعمل عمود فصل من نوع O.D.S وحجم الدقائق 10مم (Mm) (250ملم *2ملم) والطور المتحرك هو البيتانول : حامض الخليك : ماء وبنسبة (374:1:11)ح/ح وبمعدل سرعة جريان 1.5 مل/دقيقة , ودرجة حرارة 30 مْ , أما الطول ألموجي (Wave length) المستعمل هو 280 نانو ميتر للكاشف .

Abstract:

Four Flavonid compound have been extracted from the seeds of two different species of grapes named(Shadaa Sodda and Bedha) and waste of grape juice, the leaves were hydrolyzed to break the glycosides linking of the Flavonid glycosides by Soxhelt (Petroleum ether) at temperatures from 60 to 80 m for a period of 6 hours, followed by extracting the powder to the device for 8 hours by a mixture of solvents consisting of methanol: water: acetic acid (0.5:9.5:90), and diagnosed in the extracts as Catechin and λ- procatechin in black grape seed, and Epicatechin in white grape seed,and Catechol in the waste of grape juice, using the technique chromatographic liquid high-performance, (HPLC) , used a column separate from the type of O.D.S and the volume of minutes 10 mm (Mm) (250 mm x 2 mm) , Mobile phase is bytanol: acetic acid: water (374:1:11) h / h , a Flow rote1.5 ml / min, Temperature 30 m, and the wave length) the user is 280 nano-meter of the detector.

المقدمة :-

توجه الاهتمام في السنوات الاخيرة نحوالمركبات الفينوليه التي تشمل مركبات عديدة منها الكورستين والروتين والكاتكين الموجودة بشكل واسع في الفواكه والخضر,اذ بينت دراسات عديدة ان الاستهلاك الكبير للفاكهه والخضر الغنية بالمركبات الفينولية التي منها فلافونويدية مثل الكاتكين والابي كاتكين يرتبط مع انخفاض خطر الاصابة بالعديد من الامراض منها أمراض السرطانات و الحساسية والأمراض التي سببها الأحياء المجهرية (1) . وثبت بأن النباتات التي تحوي على مركبات الفلافونويدات تمتلك خصائص مضادات أكسدة قوية (2 ; 3 ; 4;5). تعد بذور العنب واللب مصادر جيدة للكاتكين (Catechin) والأبي كاتكين (EC) و حامض الجاليك(Gallic acid) والبروانثوسيانيد (Proanthocyanid) و هي مواد أولية مناسبة لإنتاج مضادات أكسدة غذائية (6 ; 7) . تعد بذور العنب مصدر غني بالكاتكين والابي كاتكين والبروسيانيد(8). و يحوي جلد العنب (قشرة العنب) على كميات كبيرة من الفلافونويد فضلاً على مركبات أخرى متعددة الفينول (9) .وتعتمد

طريقة عزل الفلافونويدات على مصدر المادة ونوع الفلافونويد المراد عزله , أن تحليل المركبات الفينولية يكون عـــادة باستعمال تقنيات مختلفة منها كروماتوكرافي الورق (Paper Cromatography)و كروماتوكرافي الطبقة الرقيقة (Cromatography Thin layer) أو كروماتوكرافي العمود (Column -Cromatography) أو كروماتوكرافي السائل عالي الأداء (-High performance liquid chromatographic(10) .و بما ان الفينولات الموجودة في العنب لها تاثيرات بايولوجية كثيرة لذلك هدف هذا البحث الى معرفة المركبات الفينولية المنفصلة من بذور العنب شدة سوداء وبيضاء ومخلفات عصير العنب باستعمال تقنية كروماتوكرافي السائل عالي الأداء (HPLC) لما لها من اهمية كمضادات للأحياء المجهرية وللاكسدة ,ولغرض تجهيز هذه المركبات يتطلب الامر فصل وتجزئة لهذه المركبات اعتمادا على درجة بلمرتها, وبهدف الاستفادة من مخلفات التصنيع الزراعي المتمثلة بالمخلفات الزراعية بوساطة استخلاص وتشخيص مكوناتها الفعالة بالماء وبمذيبات مختلفة .

المواد وطرائق العمل :-

النماذج المستخدمة في الدراسة:-

تم اختيار صنفي من العنب.*Vitis vinfera L* وهما عنب شدة سوداء وبيضاء *Vitis vinifera L* المستحصل عليهما من بستان العنب الواقع في محافظة صلاح الدين / قضاء بلد / السراجي للحصول على نماذج التجربة للموسم 2009- 2010 , مع مخلفات عصير العنب المستحصل عليها من احد محلات أعداد شربت الزبيب / بغداد . اذ تم فصل البذور عن اللب والهيكل للنموذجين , و تم غسلها بماء الحنفية الجاري ثم جففت بالفرن الكهربائي بدرجة حرارة 40 مْ وحفظت في علب معتمة داخل الثلاجة بدرجة حرارة 8 مْ لحين الاستعمال . ما مخلفات عصير العنب فغسلت بالماء الجاري لعدة مرات ثم جففت بالفرن الكهربائي بدرجة (40) مْ وحفظت في علب معتمة داخل الثلاجة بدرجة حرارة (8) مْ.

المركبات القياسية:-

التسلسل	المركب القياسي	المصدر
.1	كاتكين (+)-Catechin	شركة Fluka(Switzerland)
.2	الأبي كاتكين (-)Epicatechin	شركة Fluka(Switzerland)
.3	كاتيكول Catechol	شركة Fluka(Switzerland)
.4	حامض الفروليك Frulic acid	شركة Fluka(Switzerland)
.5	بروكاتكين Procatecnin	شركة Fluka(Switzerland)
.6	الروتينRutian	شركة Fluka(Switzerland)
.7	بايروكالول Pyrogallol	شركة Fluka(Switzerland)

تحضير المحلول القياسي للكاتيكول(Catechol reagent):-

حضر وفق الطريقة التي ذكرها (11) وذلك بإذابة 0.1غم من الكاتيكول Catechol في 100 مل ماء مقطر.

تحضير المحلول القياسي للكاتكين (Catechin reagent):-

حضر كما ذكر (12) بإذابة 0.1غم من الكاتكين (Catechin)في 100 مل ميثانول تركيزه 50% في دورق حجمي سعه 100 مل ثم اخذ 10مل من المحلول و أكمل الحجم إلى 100مل بإضافة الميثانول (50%).

وحضرت المحاليل القياسية لكل من الأبي كاتكين (Epicatechin(-)) و حامض الفروليـــك (Frulic acid) و بروكاتكين (Procatecnin) و الروتين (Rutian) و بايروكالول (Pyrogallol) .

محلول الطور المتحرك المستعمل في تقنية الكروماتوكرافي السائل عالي الأداءHPLC:-

حضرت المحاليل الخاصة بتقدير الكاتكينات في البذور ومخلفات عصير العنب كما ورد في (12) وذلك بمزج البيوتانول مع حامض الخليك المركز و الماء المعاد تقطيره والخال من الايونات(De ionized) بنسبة374:1:11 ثم وضعت في دورق زجاجي ومزجت جيداً باستعمال المازج vortex للتخلص من الفقاعات الهوائية والغازات. ولتصبح جاهزة للحقن في جهاز HPLC.

طريقة استخلاص الكاتكينات

تم استخلاص الكاتكينات من صنفي بذور العنب ومخلفات عصير العنب واستخدمت لفصل وتشخيص الكاتكينات في النماذج بجهاز HPLC وتضمنت استخلاص 25غم من المسحوق المطحون للنماذج بجهاز سوكسليت Soxhelt وبواسطة الايثر النفطي Petroleum ether على درجة حرارة 60 - 80 مْ ولمدة 6 ساعات للتخلص من المواد الدهنية , يعقبها استخلاص المسحوق المنزوع الدهن بالجهاز لمدة8 ساعات بواسطة خليط من المذيبات المتكون من الميثانول : الماء : حامض الخليك (0.5:9.5:90)

,المستخلص الناتج رشح وركز تحت التفريغ وبالتالي تم الحصول على المستخلص الخام والذي حفظ داخل إناء التجفيف Disicater إلى حين استخدامه بالتشخيص (13).

فصل وتشخيص الكاتكينات في بذور صنفي العنب ومخلفات عصير العنب باستخدام تقنية كروماتوكرافي عالي الأداء HPLC :-

استعملت هذه الطريقة للكشف عن الكاتكين Catechin-(+) والأبي كاتكين Epi Catechin-(-) والكاتيكول Catechol في البذور والمخلفات وفق ما ذكره (14) , وباستعمال عمود فصل من نوع O.D.S وحجم الدقائق 10مم (Mm) (250ملم *2ملم) والطور المتحرك (Mobile phase) هو البياتانول : حامض الخليك : ماء وبنسبة (374:1:11)ح/ح وبمعدل سرعة جريان (1.5Flow rote) مل/دقيقة , ودرجة حرارة (Temperature)30 مْ , أما الطول ألموجي (Wave length) المستعمل هو 280 نانو ميتر للكاشف , وحجم الإبرة LOOPهو 50 مايكرو ليتر.تم الفحص بأخذ 1 مل من المستخلص وأضيف له 1 مل من الطور المتحرك, وبعد إن مزجت جيداً باستعمال المازج Vortex حقن 5 مايكروليتر منه في الجهاز وقورن وقت ظهور المركب (Retention Time) مع وقت ظهور المركب القياسي

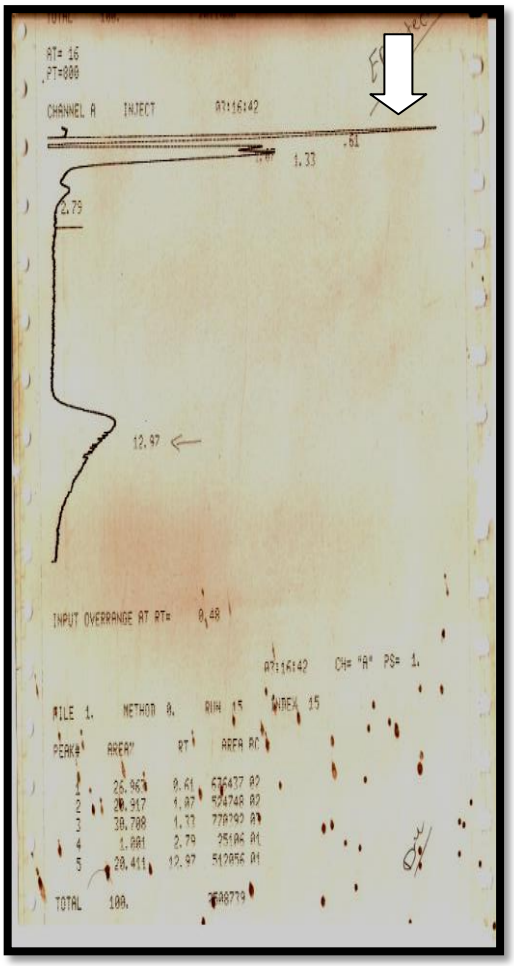
النتائج والمناقشة:

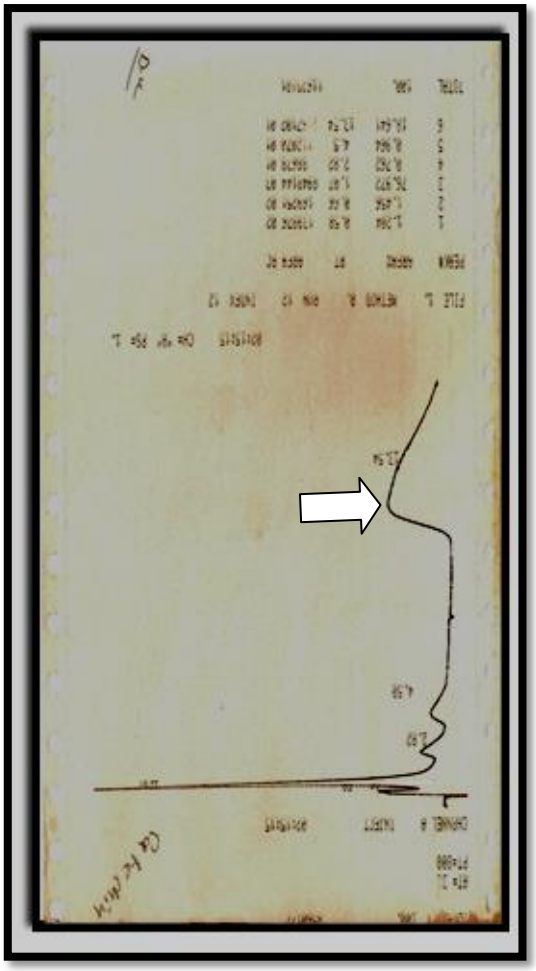
الفصل والتشخيص بوساطة تقنية كروماتوكرافي السائل عالي الأداء HPLC:-

عند إجراء الفصل والتشخيص باستعمال كروماتوكرافي السائل عالي الأداء HPLC في وجود المركبات القياسية ومن خلال إجراء التحليل لبذور صنفي العنب ومخلفات عصير العنب وجد إن الكاتكين (Catechin) و-λ بروكاتكين – (λprocatechin)هما المركبان السائدان في مستخلص بذور العنب شدة سوداء وبنسبة 881010. PPM على الترتيب إذ يلاحظ تشابه وقت الاحتجاز(Retention time) في كل من المركبين القياسيين مع مستخلص بذور العنب شدة سوداء .و أما مستخلص بذور العنب شدة بيضاء فقد وجد بان الأبي كاتكين (Epicatechin)هو المركب السائد فيه وكان تركيزه في الأنموذج 219131 ppm, أما مخلفات عصير العنب فالمركب السائد فيها الكاتيكول (Catechol) وبتركيز 270381 PPM اظهرت نتائج البحث تفاوت النماذج في محتواها من المركبات الفينولية وقد يعود هذا التفاوت الى العوامل الجينية التي تتحكم في هذه الاختلافات ,اذ يبين الجدول (1) تفوق الصنف شدة سوداء في محتواه من المركبات الفينولية واتفقت هذه النتائج مع ما توصلت إليه (2) لكل من الكاتكين (Catechin) و-λ بروكاتكين (λ - procatechin) والأبي كاتكين (Epicatechin) ومما تجدر ملاحظته غياب الروتين (Rutian) وحامض الفرليك (Frulic acid) والبايروكالول (Pyrogallol) في مستخلصات بذور صنفي العنب والمخلفات والمذكورة في الجدول (1) والأشكال (1), (2) , (3) و (4) حيث يلاحظ تطابق وقت الاحتجاز في كل من المركب القياسي والمركب الموجود في المستخلص . واتفقت هذه النتائج مع ما توصلت إليه المالكي (14) , و ما توصل إليه كل من (;15 16: ; 17) من حيث وقت الاحتجاز لكل من الكاتكين (Catechin) والأبي كاتكين (Epicatechin) في مستخلص بذور العنب .في حين اختلفت النتائج مع ماتوصلت الية (18) اذ لم يتم الكشف عن وجود احد من المركبات القياسية المختبرة في مخلفات العنب المعصور والمتمثل بوجود قمة بوقت أحتجاز والبالغ 0.87 . في حين كانت النتائج مقاربة مع ماتوصلت الية (19) التي اظهرت نتائج التحليل باستعمال الأشعة تحت الحمراء (IR) لبذور صنفي العنب ومخلفات عصير العنب موجودة في كل من المستخلصات الثلاث والمركبات القياسية المتمثلة بالكاتكين (Catechin) و الكاتيكول (Catechol) و البايروكالول (Pyrogallol) ,وان حزمة امتصاص 3400 سم$^{-1}$ تعزى إلى التردد الامتطاطي للآصرة –S=C–N الموجودة في مستخلص بذور العنب الأبيض والمخلفات وفي المركب القياسي الكاتكين , وان حزمة امتصاص 3500 سم$^{-1}$ تعزى إلى التردد الامتطاطي للآصرة CONH2 في مستخلص بذور العنب الأسود والمركبين القياسيين الكاتيكول و البايروكالول (20) .

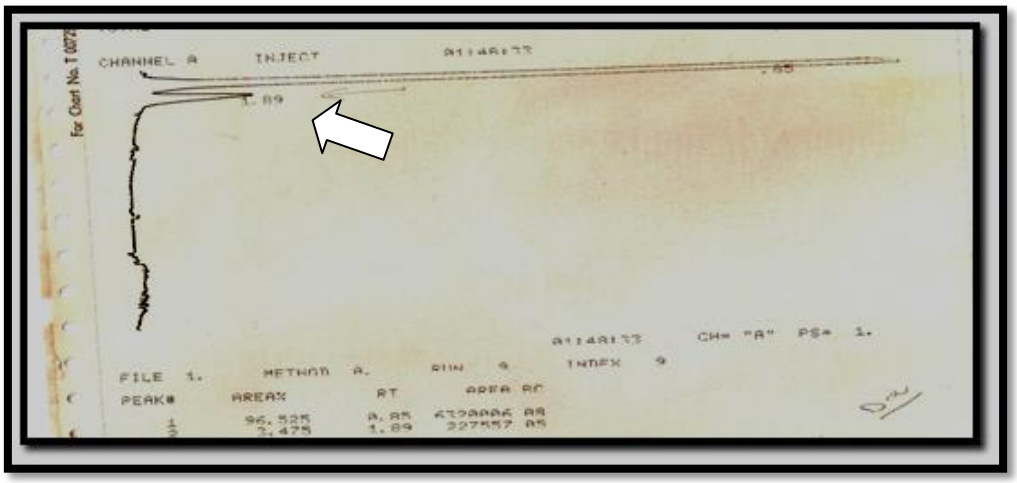
جدول(1) وقت احتجازRT المركبات القياسية ومركبات مستخلصات بذور العنب شدة سوداء وبيضاء ومخلفات عصير العنب ونسب تواجدها.

ت	المركبات	وقت الاحتجاز RT	نسبة المركب في المستخلص(ppm)	النسبه المئويه% للمركب في المستخلص
.1	Epicatechin	12.97	-	-
.2	Catechin	13.54	-	-
.3	Frulic acid	2.98	-	-
.4	λ–procatechin	13.8	-	-
.5	Rutian	8.55	-	-
.6	Catechol	1.89	-	-
.7	Pyrogallol	1.28	-	-
.8	مستخلص بذور العنب شدة سوداء	13.62	881010	%8.81010
.9	مستخلص بذور العنب شدة بيضاء	12.81	219131	%2.19131
.10	مخلفات عصير العنب	1.97	270381	%2.70381



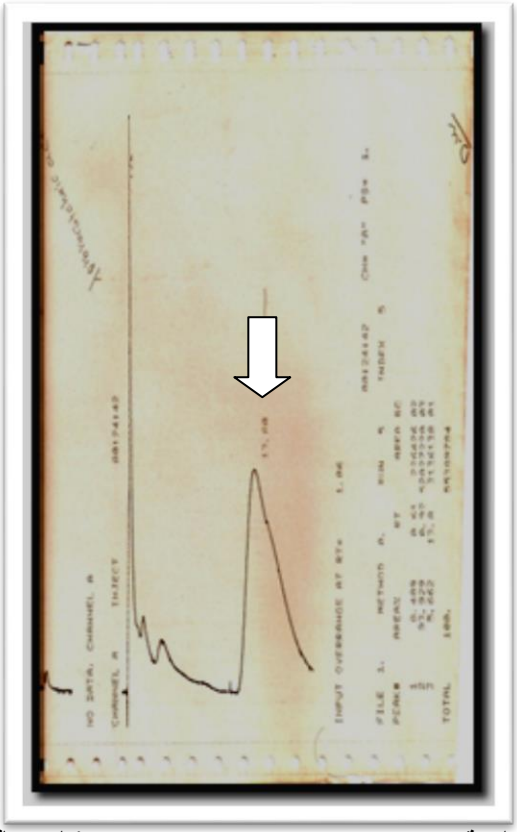


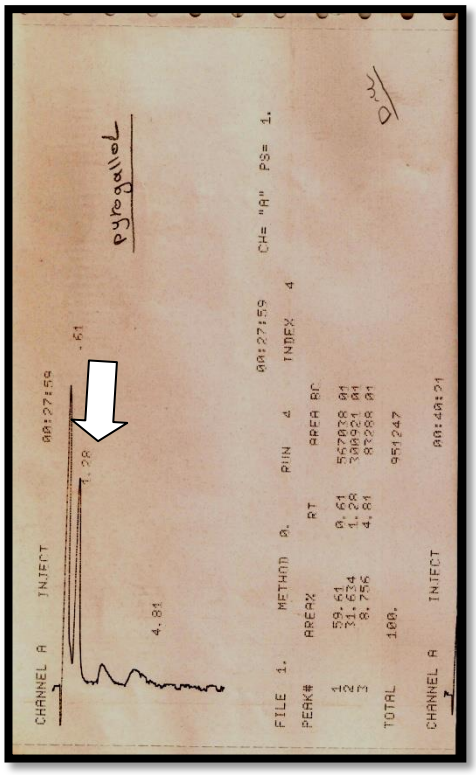
epicatechin **catechin**



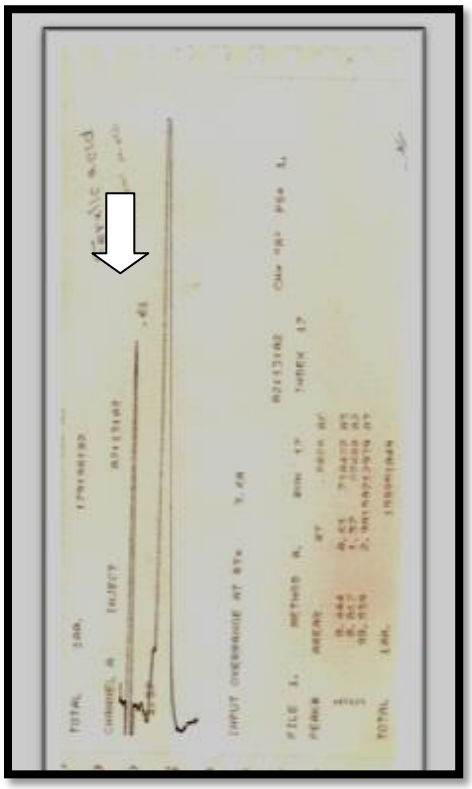
Catechol

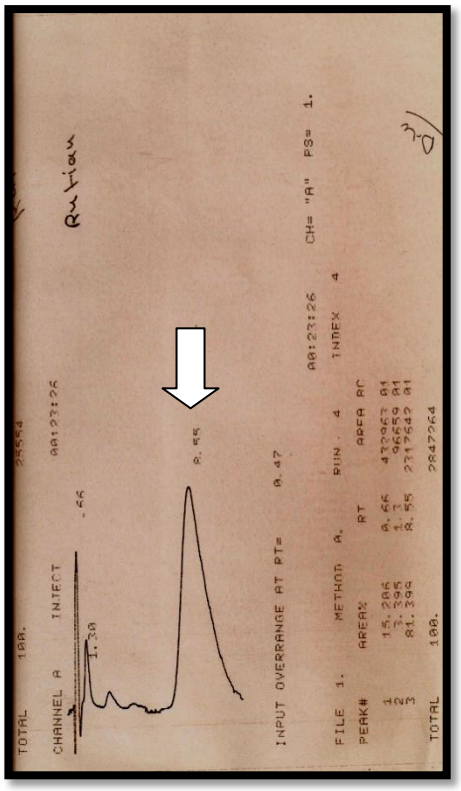
شكل(1) تحليل كروماتوكرافي السائل عالي الأداء HPLC للمركبات القياسية catechin و epicatechin وCatechol باستعمال خليط البياتانول:حامض الخليك:ماء طوراً متحركاً بنسبة (374:1:11) على التوالي.



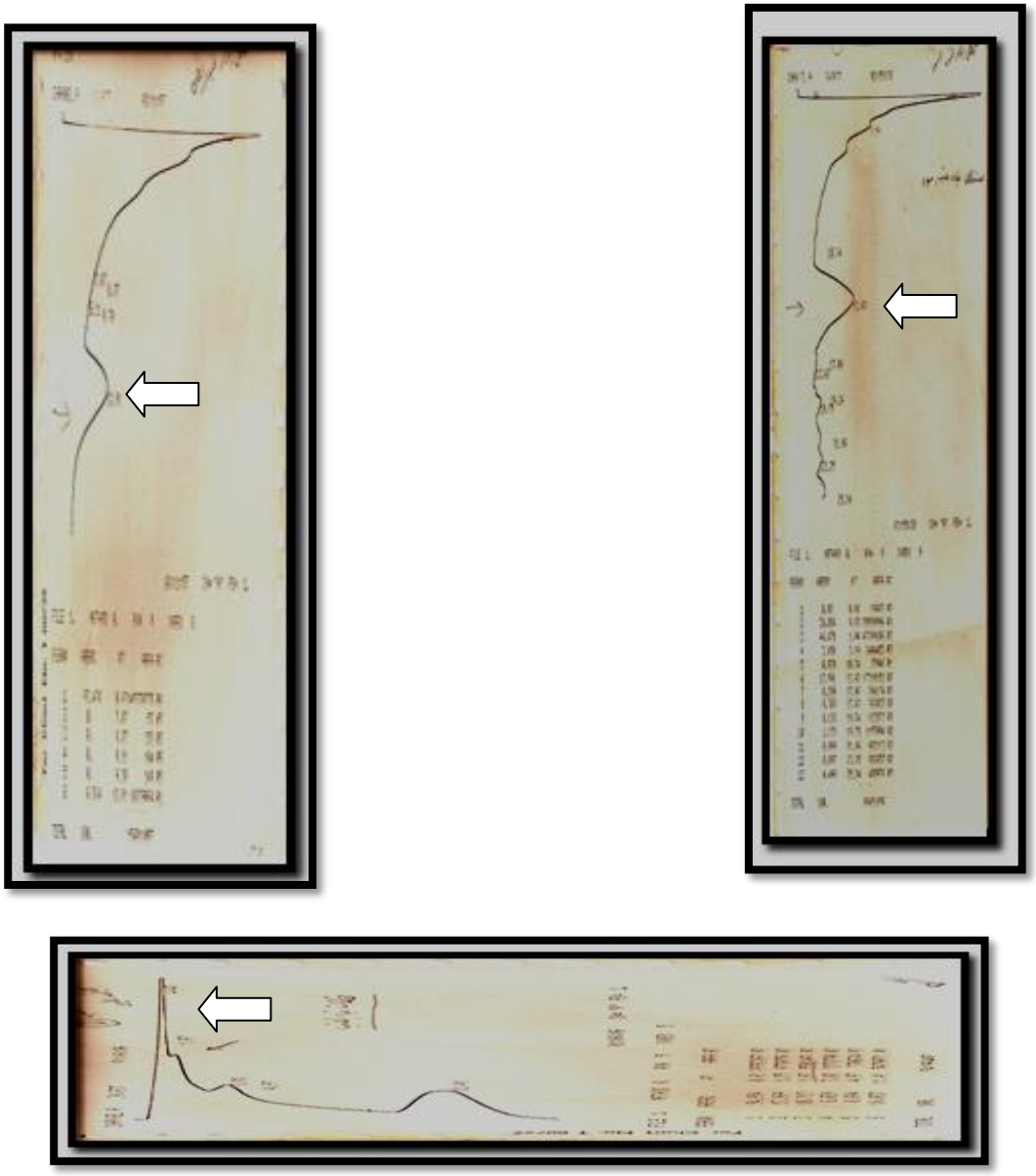


شكل(2) تحليل كروماتوكرافي السائل عالي الأداء HPLC للمركبات القياسية pyrocallol وprotocatic acid-λباستعمال خليط البياتانول:حامض الخليك:ماء طوراً متحركاً بنسبة (374:1:11) على التوالي





شكل(3) تحليل كروماتوكرافي السائل عالي الأداء HPLC للمركبات القياسية Rutin وFerulic acid باستعمال خليط البياتانول:حامض الخليك:ماء طوراً متحركاً بنسبة (374:1:11) على التوالي.



شكل(4) تحليل كروماتوكرافي السائل عالي الأداءHPLC لمستخلص مخلفات عصير العنب باستعمال خليط البياتانول:حامض الخليك:ماء طوراً متحركاً بنسبة(374:1:11) على التوالي.

المصادر:

1. **Kuppusamy, K.; K.Panneerselvam and P. Viswanathan. (2008).** Antioxidant efficacy of flavonoid-rich fraction from Spermacoce hispida in hyperlipidemic- rats . J. Appl. Biomed. ,6(1214- 0287): 165–176
2. **Aviram, M.(2004).** Flavonoids-rich nutrients with potent antioxidant activity prevent atherosclerosis development: the licorice example. Int. Congr. Ser. 1262:320–327.
3. **N.M.Salih AL-Janabi, A.M.Mahmed AL-Samraee and[1]W. S.Ulaiwi(2013).** The Effects of Squeezed Grapes Residue on the Preservation of Stored Fried Potato Chips. Pak. J. Chem. 3(1):1-4, ISSN (Print): 2220-2625
4. **Sudheesh , S. and Vijayalakshmi ,N.R.(2005).** Flavonoids from punica granatum-potenial antiperoxidative agents. Fitoterapia 76:181-186.
5. **Sweedy ,M.E.;Hamid,N.A. and Moselhy,M.E. (2007).**The role of a mixture of green tea, turmeric and chitosan in the treatment of obesity –related testicular disorders.Apple. Biomed. ,5:131-138.
6. **Bayadar , N.G.; G.Ozkan and O.Sagdic .(2004**).Total phenolic contents and antibacterial activities of grapes (Vitis vinifera L.) extracts. Food Control, 15(5): 335-339.
7. **Bagchi,D.;Bagchi,M.;Stohs,S.;Ray,S.D.;Sen,C.K.and Preuss,H.G. (2002).** Cellular protection with proanthocyanidins derived from grape seeds. Ann N .Y .Acad .Sci .,957: 260–270.
8. **Faria, A.; Calhau, C. ; Freitas, V. and Mateus, N. (2006).** Procyanidins as antioxidants and tumor cell growth modulators. J Agric Food Chem. ,54: 2392–2397.
9. **Bayadar , N.G.; G.Ozkan and O.Sagdic .(2004**).Total phenolic contents and antibacterial activities of grapes (Vitis vinifera L.) extracts. Food Control, 15(5): 335-339.
10. **Kennedy ,J.A.; Matthews, M.A . and Waterhouse, A.L. (2002).** "Effect of Maturity and Vine Water Status on Grape Skin and Wine Flavonoids". Enol. Vitic., 53 (4): 268–74.
11. **Baladi, A. ;Romino,A.;Mwinaci,N.;Vincieri, F.F and Casetta, B.(1995).**HPLC/Ms Application to anthocyanins of *Vitis vinifera L.* Agric. And food chem.,43:2104-2109.
12. **بلاسم, زياد طارق.(2000)**. دراسات في الجهد الاليلوباثي لاصناف مختلفة من زهرة الشمس *Helianthus annuus L.* . رسالة ماجستير - كلية الزراعة / جامعة بغداد.
13. **Jayaprakasha , G.K. ; Selvi, T. and Sakaria ,K.K . (2002).** Antibacterial and antioxidant activities of grape *(Vitis vinifera*) seed extracts. Food Research International, 36(2):117-122.
14. **المالكي, زينب صباح لازم .(2004).** دراسة محتوى بعض أصناف العنب المحلي *Vitis vinifera L* من المركبات الفينولية. أطروحة دكتوراه - كلية الزراعة / جامعة بغداد.
15. **Katalinic, V.(1999).** Grape Catechins- Natural antioxidant. Win Research,10(1):15-23.
16. **Miguel ,P. and Larry, T. T. (1999).**Fractional Extraction of Compounds from Grape Seeds by **Supercritical** Fluid Extraction and Analysis for Antimicrobial and Agrochemical Activities . Agric. Food Chem., 47 (12): 5044–5048
17. **Tibor ,F.: and Jorge ,M. R. (1997).**Catechin and Procyanidin Composition of Seeds from Grape Cultivars Grown in Ontario. *Agric. Food Chem.*, 45 (4):1156–1160.
18. **Yusuf, Y. and Romeo ,T. T . (2004) .**Health aspects of functional grape seed constituents. Food Science & Technology,15(9) : 422-433.
19. **Nidhal M. and Wissam S. U.(2012)**. HPLC Identification Of Catechins Compounds n Green Tea And T heWaste Of Squeezed Grapes, J. Biol. Chem., Vol. 7(2): 635-643
20. **Al-Samraee, A.M.M. (2011).** Extraction of some phenolic compounds from grape seeds Shadda sodda, bedha and waste of grape juice and studying antimicrobial and antioxidants activities. M. Sc. Thesis, Agriculture College, Baghdad University, Baghdad, Iraq.