

## استخلاص الفينولات من مياه عصير الزيتون بمُحلات مختلفة ودراسة فعالية المُستخلصات كمضادات أكسدة

رزان محمد الحلو<sup>(1)</sup> و إيمان مصطفى البكري<sup>(2)</sup>  
و محمد ماجد الصباغ<sup>(3)</sup>

قسم الكيمياء - كلية العلوم - جامعة دمشق - سورية

تاريخ الإبداع 2012/04/26

قبل للنشر في 2012/08/06

### الملخص

هدف هذا البحث إلى استخدام تقانة الاستخلاص سائل - سائل لفصل المركبات الفينولية المرافقة للمياه الناتجة مباشرة من فرازة عصر ثمرة الزيتون بطريقة الطرد المركزي ثلاثي الطور (OMWW). استخدمت أربعة أنواع مختلفة من المحلات العضوية وهي خلات الإيثيل (EtOAc) وميثيل إيزو بوتيل كيتون (MIBK) والأوكتانول-1 ( $C_8H_{18}O$ ) و-N-أوكتانويل بيروليدين (OPOD) والأخير اصطنع مخبرياً. درس تأثير تغير pH الوسط وعدد مرات الاستخلاص في الكمية الكلية للفينولات المُستخلصة من OMWW وذلك باستخدام طريقة فولين - سيوكالتيو. حُدثت كمية كل من حمض الكافيك CA وحمض الفيروليك FA الموجودة في المُستخلصات باستخدام تقانة الـ HPLC. درست فعالية الاستخلاص بالمحلات الأربعة على تخفيض الملوثات العضوية الناتجة عن مياه عصير الزيتون بطريقة تحديد الـ COD، درست فعالية المُستخلصات كمضادات أكسدة عن طريق تعيين قدرتها الإرجاعية وقدرتها على كبح الجذور الحرة، كما استخدمت طريقة الأكسجين الفعال للمقارنة بين فعالية مستخلصي MIBK و OPOD كمضادات أكسدة ومقارنتهما بحمضي الكافيك والفيروليك العياريين ومضاد الأكسدة الطبيعي إكليل الجبل (Rosemary) المسوق تجارياً.

أظهرت النتائج أن أعلى نسبة للاستخلاص وأعلى فعالية للمستخلصات كمضادات أكسدة كانت باستخدام MIBK، الذي مكن من الاستخلاص الكامل للفينولات من OMWW، يليه OPOD ثم  $C_8H_{18}O$  و EtOAc. بلغت نسبة انخفاض الملوثات العضوية في مياه عصير الزيتون 94.5% باستخدام MIBK و 83.7% باستخدام OPOD و 81% باستخدام  $C_8H_{18}O$ ، في حين أن الاستخلاص بـ EtOAc المستخدم مرجعياً لم يخفض التلوث أكثر من 72%. كما تبين أن الفينولات المستخلصة بـ MIBK يمكن إضافتها إلى الزيوت النباتية كمضادات أكسدة طبيعية، إذ فاقت فعاليتها فعالية إكليل الجبل الطبيعي بشكل واضح، في حين تقاربت فعاليتها مع فعالية حمض الكافيك العياري الذي أظهر كفاءة عالية كمضاد أكسدة.

**الكلمات المفتاحية:** مياه عصير الزيتون، حمض الكافيك، حمض الفيروليك، ميثيل إيزو بوتيل كيتون، مضادات أكسدة.

(1) طالبة، (2) الأستاذ المشرف، (3) الأستاذ المشرف المشارك.

## Phenols extraction from olive mill wastewater using different solvents and studying the antioxidant activity of the extractants

R. M. Al-helo<sup>(1)</sup>; I. M. Al-Bakri<sup>(2)</sup>

and M. M. Al-Sabbagh<sup>(3)</sup>

Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria

Received 26/04/2012

Accepted 06/08/2012

### ABSTRACT

The aim of this research, is to use Liquid-liquid extraction to separate phenolic compounds from olive mill wastewater resulted from three-phase centerfuge extraction (OMWW). Four solvents were used: Methyl iso butyl ketone (MIBK), Ethyl acetate (EtOAc), Octanol-1 (C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>O), and *N*-octanoylpyrrolidine (OPOD) which was synthesized in our lab. The effects of pH and Extraction stages on the efficiency of total phenolic compound extracted from OMWW were determined by Folin - Ciocalteu spectrophotometric method. Ferulic acid (FA) and Caffeic acid (CA) were determined in extractants by HPLC. The COD value in water phase of the four extracts was measured together with the reducing power and radical-scavenging effects for the extracts. We compared the antioxidant activity of MIBK, OPOD extracts, with ferulic acid (FA), caffeic acid (CA), ascorbic acid standards and rosemary.

The results showed that MIBK had the highest extraction efficiency and gave the maximum quantity of phenols from OMWW, than OPOD, C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>O, EtOAc. The COD value was decreased about %94.5 by MIBK, %83.7 by OPOD, %81 by C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>O, and %72 by EtOAc. The phenols extracted by MIBK could be added to eatable oils as natural antioxidants, because they were superiority on rosemary, and nearly to caffeic acid (CA) standard.

**Key words:** Olive mill wastewater, Caffeic acid, Ferulic acid, Methyl isobutyl ketone, Antioxidants.

---

<sup>(1)</sup>Student, <sup>(2)</sup> Supervisor, <sup>(3)</sup> Associated supervisor.

**1- المقدمة:**

تؤدي مضادات الأكسدة دوراً مهماً في منع التغيرات غير المرغوب فيها في نكهة الأطعمة ورائحتها وخواصها الطبيعية، كما تقلل خطورة الأمراض المزمنة كالسرطان وداء السكري والالتهابات [1]. تستعمل مضادات الأكسدة الصناعية بشكل واسع في الصناعات الغذائية، إلا أن هذا الاستخدام أصبح غير مقبول، وذلك بسبب المركبات السامة أو المركبات المسرطنة المتوقع تشكلها في أثناء التعرية [2]. ولهذا وبناءً على توجيهات منظمة الصحة العالمية وعلى التوجه العالمي الحديث نحو استخدام المواد الطبيعية ومستخلصاتها، فقد اتجهت البحوث نحو عزل أنواع جديدة من مضادات الأكسدة ذات المنشأ الطبيعي والفعالية العالية [3].

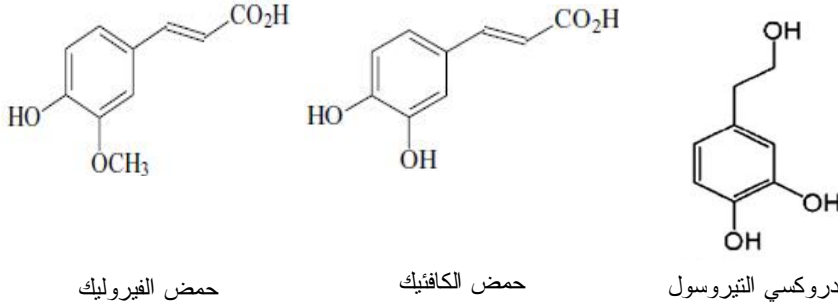
تمتلك مضادات الأكسدة الفينولية النباتية خواصاً متعددة، حيث تقوم بدور فعال في كبح الجذور الحرة من جهة، وتعزيز مناعة الجسم تجاه الأمراض كتصلب الشرايين وبعض أنواع السرطان من جهة أخرى [4,5].

تنتشر الحموض الفينولية وخاصة مشتقات حموض هيدروكسي سيناميك hydroxycinnamic acid (كحمض الكافنيك CA وحمض الفيروليك FA) انتشاراً كبيراً في النباتات، وتوجد بكميات كبيرة في الفواكه والخضار والحبوب الكاملة على شكل غليكوزيدات أو إسترات أو بأشكال صرفة [6]. وقد جذبت هذه المركبات انتباهاً كبيراً بسبب نشاطها الحيوي المضاد للأكسدة [7].

تختلف الفعالية المضادة للأكسدة للمستخلصات الطبيعية بحسب نوع المركبات الفينولية الموجودة فيها وتركيزها، وتعد ثمرات الزيتون غنية بمزائج من المركبات الفينولية المفيدة في معالجة بعض الأمراض والحد منها كانسداد القلب التاجي وسرطان البروستات والكولون [8].

ينتج عن عصر ثمرات الزيتون باستخدام تقانة الاستخلاص بالطرد المركزي ثلاثي الطور التقل (الكعكة) والزيت والماء (يرمز للطور المائي بـ Olive Mill Wastewater, OMWW)، وقد دلت الدراسات أن إنتاج 100 kg من زيت الزيتون بهذه التقانة يؤدي إلى تشكل 35 kg من كعكة الزيتون و440 ليتر من مياه عصير الزيتون [9,10]، إلا أن 2% فقط من المحتوى الفينولي الكلي يبقى في الطور الزيتي، في حين يتوزع الباقي بنسبة 53% من الفينولات في OMWW، و45% في كعكة الزيتون [11]، لذا تعد مياه عصير الزيتون OMWW مصدراً مهماً لعدد كبير من المركبات الفينولية الحيوية بما فيها مركبات أورثو الفينولات كهيدروكسي التيروسول الذي تصل كميته نحو 1 g في كل ليتر OMWW [12]، ومضادات أكسدة فينولية أخرى مهمة كحمض الكافنيك CA وحمض الفيروليك FA [13]، علماً أن هيدروكسي التيروسول درس بشكل واسع، ويعد أكثر

المركبات الفينولية في زيت الزيتون أهمية وأعضها نفعاً من حيث دوره في المحافظة على جودة الزيت في أثناء التخزين من جهة، وفائدته الكبيرة في معالجة بعض أكثر الأمراض خطورة كتصلب الشرايين وبعض السرطانات من جهة أخرى [12]. وفيما يأتي صيغ كل من هيدروكسي التيروسول وحمض الكافئيك وحمض الفيروليك [14].



حمض الفيروليك

حمض الكافئيك

هيدروكسي التيروسول

يستخدم الاستخلاص سائل - سائل لنزع المركبات الفينولية من مياه معاصر الزيتون OMWW، حيث استخدم [12] خلاص الإيتيل كُحل بعد تحضير عينة الـ OMWW وتحميضها، وقد أظهرت فينولات مُستخلص خلاص الإيتيل فعالية عالية كمضاد أكسدة طبيعي لكبح الجذور الحرة ومنع أكسدة دهن الخنزير [15]. إلا أن خلاص الإيتيل المعتمد مرجعياً لاستخلاص الفينولات من OMWW غير ملائم لاستخلاص الفينولات ذات الأوزان الجزيئية المرتفعة [16].

تصنف وكالة حماية البيئة الأمريكية الفينولات كمركبات عضوية سامة وملوثات بيئية خطيرة [17]، ولكن من جهة أخرى تعدُّ الفينولات مضادات أكسدة مهمة وخاصة الطبيعية منها، لذلك يُرغب في إضافتها إلى المنتجات الصناعية والغذائية بتركيز مدروسة [18].

تؤدي عملية نزع الفينولات من مياه OMWW إلى الحصول على مضادات أكسدة طبيعية من جهة، وإلى تخفيف سمية مياه معاصر الزيتون من جهة أخرى التي تعدُّ مشكلة أساسية لدول حوض البحر الأبيض المتوسط، ومنها القطر العربي السوري الذي يعدُّ من أوائل الدول العربية المنتجة لزيت الزيتون.

نتناول في هذا البحث استخلاص المركبات الفينولية الموجودة في مياه عصير الزيتون بتقانة الاستخلاص سائل - سائل باستخدام أربعة أنواع مختلفة من المُحلات: خلاص الإيتيل (EtOAc) وميتيل إيزو بوتيل كيتون (MIBK) وأوكتانول-1 (C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>O) و N - أوكتانويل بيروليدين (OPOD) الذي حُضر مخبرياً لعدم توافره تجارياً، حيث حُدِّد كامل كمية الفينولات المُستخلصة وتأثير pH الوسط وعدد مرات الاستخلاص في كمية الفينولات المُستخلصة. كما حُدِّدت كميتا حمضي الكافئيك CA والفيروليك FA في نواتج الاستخلاص. ثم درسنا القدرة الإرجاعية لهذه المُستخلصات وفعاليتها كمضادات أكسدة،

وقدرة مُستخلص MIBK ومُستخلص OPOD على كبح تشكل الجذور الحرة لدى إضافتها إلى زيت دوار الشمس وبالتسخين خمس ساعات بالدرجة 180 °C، وقورنت فعاليتها مع فعالية كل من إكليل الجبل التجاري وحمضي الكافنيك والفيروليك العياريين.

## 2- مواد البحث وطرقه

### 1-2- مواد البحث:

استُخدمت في هذا البحث المواد الآتية:

1- خلات الإيثيل (99%)، ميتيل إيزو بوتيل كيتون (99%)، بيروليدين (99%)، كاشف فولين – سيوكالتيو، مطبوخ النشاء، كاشف الفيروئين (1,10-phenanthroline monohydrate) من إنتاج شركة Merck.

2- 1-1- ثنائي فينيل -2- بيكريل – هيدرازيل (DPPH)، حمض الغاليك (97.5%)، حمض الفيروليك (FA)، حمض الكافنيك (CA)، حمض الأسكوربيك (99.7%)، حمض الأوكتانويك (98%) من شركة Sigma-Aldrich.

3- أوكتانول (98%) من شركة Prolabo، إكليل الجبل من شركة Guardian™ Rosemary Extract08, Danisco، كلوريد الثيونيل من شركة Alpha.

4- مياه عصير ثمرة الزيتون من منطقة حرستا في ريف دمشق التي تعمل بطريقة الطرد المركزي ثلاثي الطور، زيت دوار الشمس.

### 2-2- الأجهزة المستخدمة:

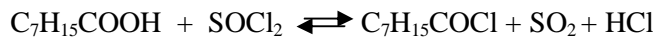
جهاز مطيافية ماتحت الأحمر (IR) نموذج (Jasco-300E)، جهاز مطيافية مافوق البنفسجي والمرئي (UV-Vis) نموذج (Spectronic 20D+ Milton Roy)، جهاز (HPLC-grade) من شركة (Knauer).

### 3-2- اصطناع N-أوكتانويل بيروليدين (OPOD):

حُضِرَ OPOD على مرحلتين:

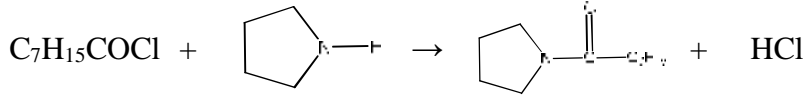
المرحلة الأولى: وتضمنت:

اصطناع أوكتانويل كلورايد [19] بدءاً من حمض الأوكتانويك وكلوريد الثيونيل:



المرحلة الثانية:

أضيف محلول أوكتانويل كلورايد ببطء خلال ساعة على شكل قطرات فوق البيروليدين ثم سخن المزيج مع التحريك والتقطير المرتد مدة 8 ساعات [20].



غسل الناتج N- أوكتانويل بيروليدين OPOD وفصلت المواد الأولية عنه بالتقطير تحت الفراغ.

#### 4-2- تحضير عينة مياه عصير الزيتون OMWW:

وضع 100 mL من مياه الـ OMWW في بيشر زجاجي، ورسبت المركبات الميكروئية مثل البروتينات والأصبغة والأوساخ والصمغ بالغلجان باستخدام التقطير المرتد مدة 30 دقيقة، ونقل الناتج وأخذ السائل وغسل بـ 10 mL من نظامي الهكسان لإزالة المواد الليبيدية المتبقية، كرر الغسل مرتين. سنرمز لاحقاً لهذه المياه المحضرة بـ  $A_{OMWW}$ .

يتضمن الجدول (1) بعض الخصائص الفيزيائية والكيميائية لعينة الـ OMWW المدروسة، علماً أن التحاليل أجريت وفق الطرائق المرجعية المبينة في الجدول نفسه.

#### 5-2- طريقة تعيين الفينولات الكلية باستخدام كاشف الفولين - سيوكالتيو:

تحدد وبحسب المراجع تراكيز الفينولات على أساس حمض الغاليك، وعليه حُضرت سلسلة عبارية من حمض الغاليك بتراكيز مختلفة (50,100,150,200 ppm)، وأضيف إليها كاشف الفولين - سيوكالتيو والماء المقطر، مزجت المحاليل وحفظت في درجة حرارة الغرفة، وبعد عشر دقائق أضيف إليها محلول كربونات الصوديوم 20%، مزجت وحفظت العينات في درجة حرارة الغرفة مدة ساعة، ثم قيست الامتصاصية بجهاز مطياف UV-VIS عند طول الموجة 760 nm [21]. طبق ماسبق كله على العينات المدروسة كلها وكررت كل تجربة ثلاث مرات.

#### 6-2- تأثير pH الوسط في المحتوى الفينولي في المُستخلص:

استخلصت الفينولات من مياه الـ  $A_{OMWW}$  مرة واحدة عند قيم متغيرة من pH الوسط؛ وذلك بتعديل الوسط بـ (1M) HCl أو (1M) NaOH وباستخدام المُحلات الأربعة EtOAc و MIBK و  $C_8H_{18}O$  و OPOD كل على حدة، وبنسبة محل: ماء (5:1) وبزمن تحريك 30 دقيقة وزمن فصل 180 دقيقة. يظهر الشكل (1) تأثير قيم pH الوسط في كفاءة استخلاص الفينولات من  $A_{OMWW}$ .

أعيد العمل على  $A_{OMWW}$  مباشرة دون إضافات وبلاستخلاص المتكرر، وعُينت كمية الفينولات المُستخلصة في كل مرة. كررت كل تجربة 3 مرات، ويظهر الجدول (2) متوسط تركيز الفينولات الكلية في الطبقة العضوية الناتجة عن كل استخلاص، أما الطبقات المائية فقد أخذت لتعيين قيم الـ COD.

**7-2- تحضير المُستخلص:**

جُف مُستخلصاً كلٌّ من MIBK و EtOAc بكبريتات الصوديوم اللامائية، بخر المُحلّ باستخدام المبخر الدوار وحلت الطبقة العضوية المتبقية بالميتانول 80% وأكمل الحجم إلى 25mL. استخدمت طريقة الاستخلاص العكوس مع القلوي [23]، حيث غسل كل من مُستخلصي  $C_8H_{18}O$  و OPOD بـ NaOH (1M) بنسبة 1:1 وفصل الطور العضوي (يضم المُحلّ) عن المائي (يضم الفينولات بشكلها الملحي)، ثم حُض الطور المائي بـ HCl (1M) حتى (pH = 4) وأكمل الحجم إلى 25 mL بالميتانول 80%.

**8-2- تعيين قيم الـ COD في الطور المائي:**

عينت قيم الـ COD في الطور المائي للعينات بعد الاستخلاص، وذلك لدراسة الأثر البيئي لمجمل الخط التكنولوجي المقترح العمل به (الشكل 8). يظهر في الشكل (2) قيم الـ COD والنسب المئوية للمواد العضوية المزالة من مياه عصير الزيتون.

**9-2- تعيين محتوى المُستخلصات من حمضي الكافنيك CA والفيرونيك FA:**

استخدم جهاز HPLC المزود بمكشاف UV-VIS لتحديد محتوى المُستخلصات من حمضي CA و FA، وقد حُدّت شروط العمل تجريبياً بالاستعانة بالمرجع [12]، ويظهر الجدول (4) تراكيز كل من CA و FA في المُستخلصات الأربعة.

**10-2- دراسة الفعالية المضادة للأكسدة لمستخلص مياه عصير الزيتون:**

حضرت محاليل بتراكيز (10,20,30,40,50 ppm) في الميتانول 80% لكل من: حموض الأسكوربيك والكافنيك والفيرونيك العيارية، والمُستخلصات الأربعة لـ  $A_{0.01}$  واستخدمت في التجارب الآتية:

**1-10-2- تعيين القدرة الإرجاعية:**

حددت القدرة الإرجاعية للعينات المذكورة أعلاه بحسب [24]، حيث أُضيف إلى كل 1 mL من المحاليل 2.5 mL من محلول موقّي فوسفاتي (تركيزه 0.2M و pH=6.6)، ثم أُضيف 2.5 mL من محلول (1%) فري سيانيد البوتاسيوم  $[K_3Fe(CN)_6]$ ، وحضن المزيج في الدرجة  $50^\circ C$ ، مدة 20 دقيقة، ثم أُضيف 2.5 mL من محلول ثلاثي كلور حمض الخل (10%)، ورجت العينات مدة 10 دقائق لضمان الامتزاج. سحب 2.5 mL من الطبقة العليا للعيّنة وأُضيف إليها 2.5 mL من الماء المقطر و 0.5 mL من محلول كلوريد الحديد الثلاثي  $FeCl_3$  (0.1%)، ثم قيست الامتصاصية بجهاز مطيافية UV/Vis عند طول الموجة 700 nm [26,25]. تدل زيادة الامتصاصية للمزيج المتفاعل على زيادة كفاءة التفاعل.

يُعدُّ هذا الاختبار مؤشراً مهماً لفعالية مضادات الأكسدة إذ يسبب وجود المرجعات مثل الركائز المضادة للأكسدة في العينات إرجاع الحديد الثلاثي الموجود في معقد فري سيانيد

الحديد إلى الحديد الثنائي. لذلك يراقب إرجاع  $Fe^{+3}$  إلى  $Fe^{+2}$  بقياس شدة الامتصاص لأزرق بروسيا عند طول الموجة 700 nm. يظهر الشكل (3) القدرة الإرجاعية للعينات المدروسة بتزايد تركيزها ومقارنتها بحمض الأسكوربيك.

### 2-10-2- تعيين القدرة على كبح الجذور الحرة (اختبار الـ DPPH):

أخذ 500  $\mu$ L من كل عينة من العينات المحضرة وأضيف إليها 2800  $\mu$ L من محلول مركب DPPH (45  $\mu$ g/mL)، وحفظت العينات بدرجة حرارة الغرفة وبالظلام مدة 30 دقيقة، ثم قيس امتصاصية العينات عند طول الموجة 517 nm [27,25]. يعدُّ تناقص الامتصاصية لمزيج التفاعل مؤشراً لتزايد كفاءة العينة على كبح الجذور الحرة.

استخدم القانون الآتي لحساب قدرة المُستخلصات على كبح الجذور الحرة:

$$DPPH\% = [(A_B - A_A) / A_B] \times 100$$

إذ:  $A_A$  امتصاصية العينة و  $A_B$ : امتصاصية العينة الشاهدة.

يظهر الشكل (4) نتائج اختبار الـ DPPH على المُستخلصات ومقارنتها بحموض FA و CA والأسكوربيك العياريّة.

### 2-10-3- طريقة الأكسجين الفعال:

أضيف حمض الكافئيك وحمض الفيروليك وإكليل الجبل (Rosemary) المسوق تجارياً والمحتوي على 4% وزناً من الفينولات الكلية ومُستخلصا MIBK و OPOD (المُحصَران سابقاً بالميتانول) كل على حدة وبوزن محسوب ودقيق بحيث تحتوي كل إضافة على (0.06%) من الفينولات {تقتَرَح شركة Danisco إضافة مضاد أكسدة بنسبة تراوح بين 0.02-0.1% من وزن الزيت أضيف وسطي هذه النسبة (0.06%)}، علماً أنه بُخِرَ الميتانول من العينات لإزالة أية تأثيرات محتملة للميتانول في الأكسدة الحرارية للزيت.

درست فعالية العينات كمضادات أكسدة عن طريق ضخ الهواء ضمن العينات المختبرة مع التحريك عند الدرجة 180 °C، ومتابعة قياس قرينة البيروكسيد خلال مدد زمنية محددة لمعرفة سير عملية الأكسدة خلال خمس ساعات. قورنت النتائج بنتائج عينة زيت دوار شمس، دون إضافات، وأخضعت للشروط نفسها. بيّن الشكل (7) متوسط النتائج لثلاثة قياسات.

## 3- النتائج والمناقشة:

### 3-1- الخواص الفيزيائية والكيميائية لعينة OMWW:

أظهرت نتائج التحاليل أن pH مياه عصير الزيتون تمتلك صفة حمضية وتحتوي نسبة عالية من المواد العضوية وكمية مرتفعة نسبياً من الفينولات، كما تحوي نسبة عالية من الأملاح وخاصة أملاح البوتاسيوم المنحلة.

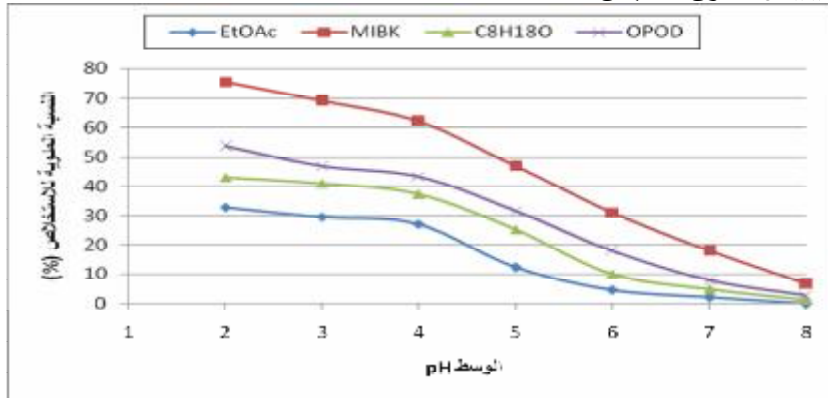


الجدول (1) الخصائص الفيزيائية والكيميائية لمياه عصير الزيتون "معصرة حريستا"

التحاليل	الواحدة	مياه عصير الزيتون	طرائق التحليل
pH	-	4.2-4.1	[28] AOAC 33-006
الكثافة	g/mL	1.02 - 1.01	[28] AOAC 33-001
الرماد عند 600 °C	%	0.55 - 0.53	[28] AOAC,33-0.43
المواد المعلقة عند التجفيف لـ 110 °C	%	1.76 - 1.7	[28] 2-56
النتروجين (كُدال)	g/L	1.4 - 1.35	[28] AOAC,33-051,056
الليبيدات	g/L	2.5 - 2.4	[28] 33-103,110 AOAC
الصوديوم (Na <sup>+</sup> )	g/L	0.45 - 0.4	[28] 33-103,110 AOAC
البوتاسيوم (K <sup>+</sup> )	g/L	3.11 - 3.09	[28] 33-103,110 AOAC
COD	g/L	63.85 - 63.45	[28] AOAC 3-034,040
الفينولات	g/L	3.17 - 3.11	[21]

## 2-3- تأثير pH الوسط في كفاءة عملية الاستخلاص:

تظهر النتائج المبينة بالشكل (1)، أنّ تزايد pH الوسط لمياه AOMWW يترافق بتناقص كمية الفينولات المُستخلصة، وأنّ المُحلّ الأفضل بالاستخلاص هو MIBK، ورغم ذلك فهو لم يتمكن عند pH=2 وباستخلاص لمرة واحدة من استخلاص أكثر من 75% من مجمل الفينولات الكلية. أمّا خلاص الإيتيل فقد استخلص أقل نسبة من الفينولات مقارنة بباقي المُحلات، ولم يتمكن بالشروط نفسها من استخلاص أكثر من 33% منها. تعتمد المراجع [15,12] على استخلاص الفينولات من AOMWW بالاستخلاص المتكرر وباستخدام EtOAc وعند pH=2 في حين توجه هذا البحث لدراسة استخلاص الفينولات من AOMWW دون تحميص.



الشكل (1) تأثير الـ pH في كفاءة استخلاص الفينولات من AOMWW

### 3-3- تأثير الاستخلاص المتكرر في كفاءة عملية الاستخلاص:

تظهر نتائج الاستخلاص المتكرر المبيّنة في الجدول (2) أن المُحل MIBK يمتلك أفضل كفاءة استخلاص للفينولات من  $A_{OMWW}$  مقارنةً بباقي المُستخلّصات الثلاثة المدروسة، إذ استطاع استخلاص ما يزيد على 95% من كامل الفينولات دون تحميض وبمرحلتين استخلاص، كما تمكّن من استخلاص كامل الفينولات في الاستخلاص الثالث، في حين أن كفاءة خلات الإيثيل بلغت 28% في الاستخلاص الأول، ولم تتجاوز 67% في الاستخلاص الخمسة.

الجدول (2) نتائج الاستخلاص المتكرر لمياه الـ  $A_{OMWW}$  باستخدام المُحلات الأربعة، %E: كفاءة الاستخلاص

تركيز الفينولات الكلية (ppm)								مراحل الاستخلاص
%E	OPOD	%E	$C_8H_{18}O$	%E	MIBK	%E	EtOAc	
%43	1350.2±25.8	%37	1162.8±35.9	%62.5	1963.6±30.2	%28	880.7±15.7	1
%28	886.5±18.7	%25	781.4±28.6	%33.3	1045.45±26.7	%18	556.7±9.8	2
%14	436.36±12.6	%13	418.9±24.7	%3.8	118.18±11.8	%12	380.9±7.9	3
%6	185.85±14.3	%8	251.7±15.2	-	0	%7	211.4±2.6	4
%2	60.3±10.3	%3	90.5±4.9	-	0	%5	130.5±3.7	5
%93	2919	%86	2706	%99.6	3127	%67	2158	كامل الفينولات المُستخلّصة
الفينولات الكلية في $OMWW$ : ppm 3140.5±31.4								

ويمكن تعليل كفاءة MIBK باستخلاص الفينولات مقارنةً بـ EtOAc بأن له ثابت عزل كهربائي يبلغ ضعفي ثابت العزل الكهربائي لخلات الإيثيل وانحلاية أقل في الماء كما بيّن الجدول (3)، علماً أن كلا المحلّين يشكل روابط قطبية بين الزمر  $C=O$  في المُحل وهيدروجين الزمر  $OH$  في الفينولات.

### الجدول (3) مقارنة بين خواص المحلات [30,29]

ثابت العزل الكهربائي Dielectric constant	درجة الغليان °C	الكثافة (20°C) g/mL	الانحلاية في الماء % وزناً	الكتلة المولية mol/L	المركب
(25°C) 6.11	77.1	0.901	(20°C) 8.6	88.105	خلات الإيثيل EtOAc
(20°C) 13.11	115.7	0.801	(25°C) 1.7	86	متيل إيزو بوتيل كيتون MIBK
(20°C) 10.3	195	0.825	0.05	130	نظامي الأوكتانول

نستنتج مما تقدم أنه لا يمكن عدّ خلات الإيثيل مُحلاً انتقائياً لاستخلاص كامل الفينولات، وهذا يتفق مع [31,16,12]، بأن مُحلّ خلات الإيثيل انتقائي تجاه المركبات

الفينولية ذات الأوزان الجزيئية المنخفضة والمتوسطة، وغير مثالي لاستخلاص الفينولات ذات الأوزان الجزيئية المرتفعة.

يأتي OPOD بالكفاءة بعد الـ MIBK في استخلاص الفينولات من الـ  $A_{OMWW}$  ويعزى سبب كفاءته إلى وزنه الجزيئي المرتفع وعدم انحلاله في الماء، كما أنه قادر على ربط الفينولات وسحبها من الوسط المائي من خلال مجموعات الـ  $C=O$  المحتواة في بنيته التي تشكل معقداً أساسه روابط قطبية تنشأ بين زمرة  $C=O$  وبين زمر  $OH$  في الفينولات ( $C=O \dots \dots HO$ )، وذلك ما أشار إليه [20] عندما درس استخلاص  $C_6H_5OH$  بـ OPOD. أما سبب عدم تفوق OPOD على MIBK فقد يكون بسبب وجود السلسلة الألكيلية الخطية ( $C_7H_{15}$ ) كبيرة الحجم التي تعيق عملية الاستخلاص، فقد بيّن [22] الذي اهتم باستخلاص حمضي الـ CA و FA باستخدام السوائل الأيونية أن زيادة طول السلسلة الألكيلية الجانبية في الحلقة الأميدية تضعف قوة الروابط الفيزيائية بين المُل والمُنحل.

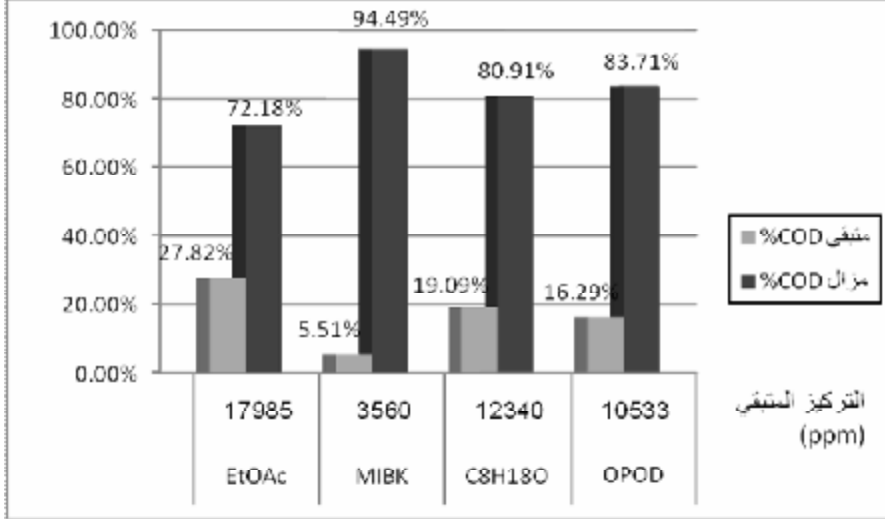
بيّنت الدراسة أيضاً أن الأوكتانول أفضل كفاءة باستخلاص الفينولات من الـ  $A_{OMWW}$  بشكل واضح مقارنة بـ EtOAc إذ تمكن الأوكتانول من استخلاص 75% من الفينولات الكلية خلال ثلاث مرات استخلاص، في حين لم تتجاوز كفاءة استخلاص EtOAc 54% بالشروط نفسها، ورغم ذلك فإن الأوكتانول أقل كفاءة من الـ OPOD الذي استخلص بعدد مرات الاستخلاص نفسها 85% و MIBK الذي استخلص  $\approx 100\%$  من الفينولات الكلية. يعزى سبب كفاءة الأوكتانول بالنسبة بالاستخلاص إلى انحلالته المنخفضة في الماء التي تبلغ  $0.54 \text{ g/L}$  ( $20^\circ\text{C}$ ) وقد بيّن [32] أن الأغوال قصيرة السلسلة كالأوكتانول يكون لها كفاءة استخلاص أعلى من تلك الأطول، وأن الأوكتانول هو أفضل غول بين الأغوال قصيرة السلسلة الذي يمكن استخدامه في استخلاص الفينول من الأوساط المائية.

#### 4-3- قيم الـ COD في الطبقة المائية:

أظهرت نتائج تحليل الـ COD كما يبيّن الشكل (2) تفوق مُحلّ MIBK بشكل واضح في خفض كمية المواد العضوية المنحلة في الـ OMWW مقارنةً بباقي المُحلّات المستخدمة في الدراسة، حيث تتأغم ترتيب خفض المُحلّات لقيم COD مع ترتيب كفاءتها باستخلاص الفينولات، وذلك وفق الترتيب الآتي: الأفضل MIBK ثم OPOD ثم  $C_8H_{18}O$  وأخيراً EtOAc.

إن الطريقة المستخدمة في البحث لاستخلاص الفينولات من مياه عصير الزيتون وباستخدام MIBK كمحلّ تؤدي إلى خفض كمية المركبات العضوية في الماء المتبقي بعد الاستخلاص، ومن ثمّ إلى خفض قيم الـ COD بنسبة 94.5%، حيث تبقى في الطور المائي بعد المعالجة واستخلاص الفينولات تقريباً 3560 ppm من مجمل قيم الـ COD

التي كانت في عينة OMWW الأم نحو 64658 ppm. ورغم ذلك فمزال الماء الناتج بعد الاستخلاص؛ وفق المواصفة القياسية السورية لمياه الصرف الصحي المعالجة لأغراض الريّ [33]؛ غير صالح حتى لري الأشجار الحراجية والمحاصيل الصناعية، إذ إنّ الحد الأقصى المسموح به من الـ COD لريّها يساوي 150 mg/L، ولكن هذه المياه أصبحت قابلة للمعالجة الحيوية.



الشكل (2) قيم الـ COD في الطبقات المائية بعد الاستخلاص

### 5-3- محتوى المُستخلصات من حمضي الكافنيك CA والفيرونيك FA:

تظهر النتائج المبيّنة في الجدول (4) كفاءة عالية للمُحل MIBK في استخلاص كل من حمضي الفيرونيك والكافنيك مقارنة بباقي المُحلات المستخدمة في البحث. حيث فاقت كفاءة استخلاص هذين الحمضين كفاءة OPOD بأكثر من ثلاثة أضعاف، وكفاءة  $C_8H_{18}O$  بنحو خمسة أضعاف وكفاءة EtOAc المستخدم مرجعياً في استخلاص الفينولات من مياه عصير الزيتون بأكثر من تسعة أضعاف. أي إنّ المُحل MIBK له قدرة على استخلاص مشتقات حموض هيدروكسي سيناميك بشكل مميّز مقارنة بباقي المُحلات المستخدمة بالبحث.

الجدول (4) نتائج الـ HPLC لتحديد كمية حمضي الكافنيك والفيرونيك في مياه OMWW

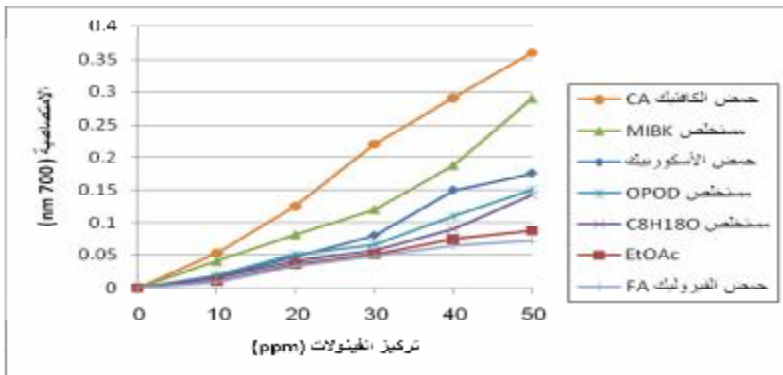
عدد مرات تفوق MIBK على باقي المُحلّات		التركيز (ppm)		المُستخلصات
CA	FA	CA	FA	
9.2	11.5	8	10.3	مُستخلص EtOAc
		73.4	118.3	مُستخلص MIBK
4.7	5.8	15.7	20.4	مُستخلص C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> OH
3.1	3.3	23.4	35.5	مُستخلص OPOD

## 6-3- الفعالية المضادة للأكسدة:

## 3-6-1- دراسة تأثير القدرة الإرجاعية:

تشير النتائج المبينة في الشكل (3) أن زيادة تركيز المواد المتفاعلة يؤدي إلى زيادة الامتصاصية أي زيادة القدرة على الإرجاع، إذ يتغير لون محاليل الاختبار من اللون الأصفر إلى ألوان متدرجة بين الأخضر والأزرق بحسب قوة إرجاع العينة المضادة للأكسدة. كما تظهر أن حمض الكافنيك يملك قدرة الإرجاع العليا مقارنة ببقية العينات المدروسة وقد أشار [25] إلى أن حمض الكافنيك له قدرة إرجاعية عالية مقارنة بمضادات الأكسدة الصناعية مثل BHA و BHT و tocopherol. كما يلاحظ أن مُستخلص MIBK يأتي بعد CA مباشرة في القدرة على الإرجاع، ويمكن ترتيب قوة إرجاع المُستخلصات كما يأتي:

CA < مُستخلص MIBK < حمض الأسكوربيك < مُستخلص OPOD < مُستخلص C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>O < مُستخلص FA < EtOAc

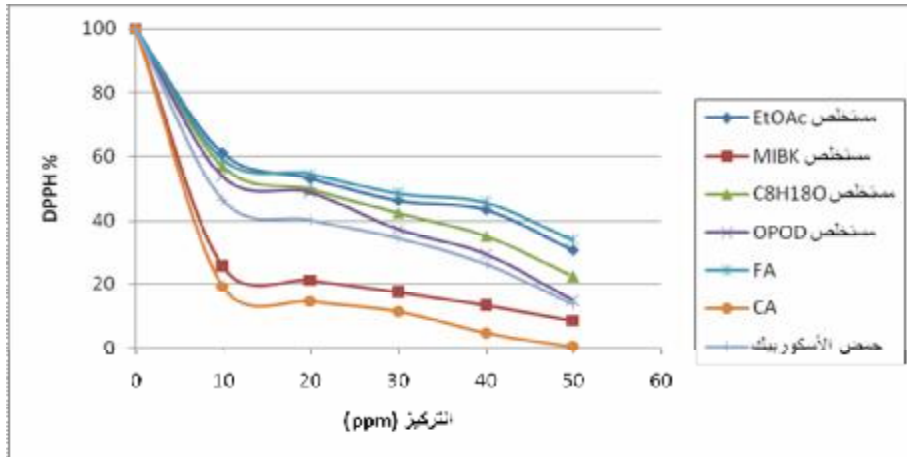


الشكل (3) تزايد القدرة الإرجاعية للعينات المدروسة بتزايد تركيزها ومقارنتها بحمض الأسكوربيك

### 3-6-2- تعيين القدرة على كبح الجذور الحرة (اختبار الـ DPPH):

نلاحظ من الشكل (4) ازدياد قدرة العينات المدروسة على كبح الجذور الحرة بازدياد تركيزها، وهذا يعود لارتفاع نسبة المركبات المضادة للأكسدة، ويمكن ترتيب قدرة العينات المدروسة على كبح الجذور الحرة كما يأتي:

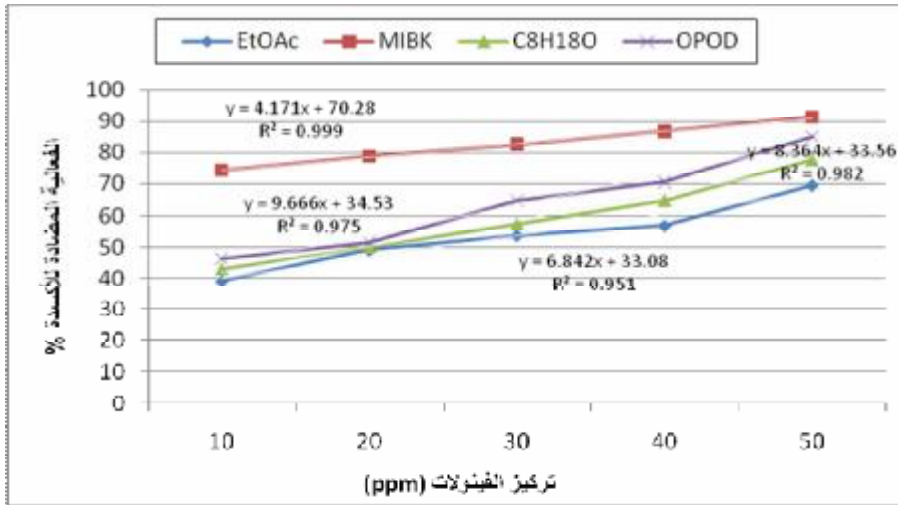
CA < مُستخلص MIBK < حمض الأسكوربيك < مُستخلص OPOD < مُستخلص  $C_8H_{18}O$  < مُستخلص EtOAc < FA



الشكل (4) اختبار الـ DPPH على المُستخلصات ومقارنتها بحموض FA و CA والأسكوربيك العيارية.

نلاحظ مما سبق أن هذا الترتيب يتفق والترتيب الذي توصلنا إليه لدى دراسة تأثير القدرة الإرجاعية إذ أظهر حمض الكافنيك قدرته العالية على كبح الجذور الحرة مقارنة بباقي العينات المدروسة، كما نلاحظ أن مُستخلص MIBK يقترب من CA في قدرته على كبح جذور DPPH ويفوق بشكل واضح المُستخلصات الأخرى المدروسة جميعها وحتى حمض الأسكوربيك. في حين أن مُستخلص EtOAc يتقارب في كفاءته مع كفاءة حمض الفيروليك العياري، وهذا يتفق مع نتائج [13] الذي استخلص الفينولات من مياه الـ OMWW بخلات الإيثيل ودرس فعاليتها كمضادات أكسدة وقارنها ببعض المكونات العيارية بما فيها حمض الكافنيك والفيروليك. وضح [34] سبب القدرة العالية التي تمتلكها حموض هيدروكسي سيناميك والتي تحوي أورتو ثنائي هيدروكسيل في كبح الجذور الحرة، إذ وضح آلية عمل CA كمضاد أكسدة للبروتين الدهني منخفض الكثافة low density lipoprotein (LDL) المبيّنة بالشكل (5):





الشكل (6) العلاقة بين المحتوى الفينولي والنشاط المضاد للأكسدة في مُستخلصات AOMWW

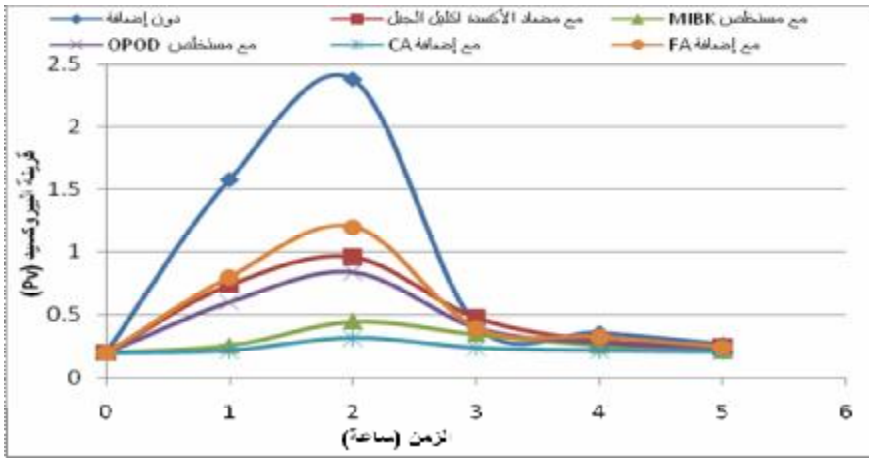
### 3-6-3- طريقة الأكسجين الفعال:

يبين الشكل (7) أن معدل قرينة البيروكسيد ( $P_v$ ) تتغير تغيراً كبيراً لزيوت دوار الشمس عند تعرضه للهواء والحرارة  $180^\circ\text{C}$ ، في حين أن إضافة حمض الكافتيك العياري أدى إلى المحافظة تقريباً على قرينة البيروكسيد فيه باستثناء تغير طفيف لوحظ بعد ساعتين، ليعود ثانية إلى قيمة قرينة البيروكسيد الأصلية وحتى نهاية زمن الاختبار الذي بلغ خمس ساعات. كما تبين النتائج تقارب مقدرة الفينولات المُستخلصة من AOMWW باستخدام MIBK من كفاءة حمض الكافتيك (CA) في كبح الجذور الحرة والتخفيف من تفاعلات الأكسدة بين الهواء والزيت في أثناء عملية التسخين.

بعدُ تفوق الفعالية المضادة للأكسدة لمُستخلص MIBK على مُستخلص OPOD مؤشراً على قدرة المُحل MIBK على استخلاص فينولات أورتو ثنائي هيدروكسي فينيل العطرية بشكل أفضل من باقي المُحلات المستخدمة بالدراسة، وهذا ما تؤكدُه نتائج الـ HPLC لتحديد كمية كل من حمضي FA و CA في مُستخلصات المُحلات الأربعة المبيّنة في الجدول (4).

لم يتفوق إكليل الجبل المسوق تجارياً على حمض الكافتيك ومُستخلصي MIBK و OPOD في منع تشكل البيروكسيدات ولكنه تفوق على حمض الفيروليك، وهذا يدل على أن تنوع الفينولات المُستخلصة من مياه عصير الزيتون يساعد وبشكل كبير على الحد من عملية الأكسدة أو تشكل الجذور أو كليهما.





الشكل (7) نتائج قياس قرينة البيروكسيد في العينات

#### 4- الاستنتاجات

اهتم البحث بدراسة استخلاص الفينولات من مياه عصير ثمرة الزيتون باستخدام محلات مختلفة وهي: خلات الإيثيل EtOAc (المعتمد مرجعياً) ومثيل إيزو بوتيل كيتون MIBK وأوكتانول-1  $C_8H_{18}O$  و-N-أوكتانويل بيروليدين OPOD المصنع مخبرياً.

1- بينت الدراسة إمكانية استخلاص كامل الفينولات من مياه عصير الزيتون مباشرة دون تحميص إضافي باستخدام المحل مثيل إيزو بوتيل كيتون MIBK.

2- أظهرت نتائج الـ HPLC تبايناً واضحاً في كمية حمضي الفيروليك والكافتيك المستخلصة من OMWW باختلاف المحلات المستخدمة. تمكن MIBK من استخلاص الحمضين المدروسين بكفاءة فاقت باقي المحلات بعدة أضعاف.

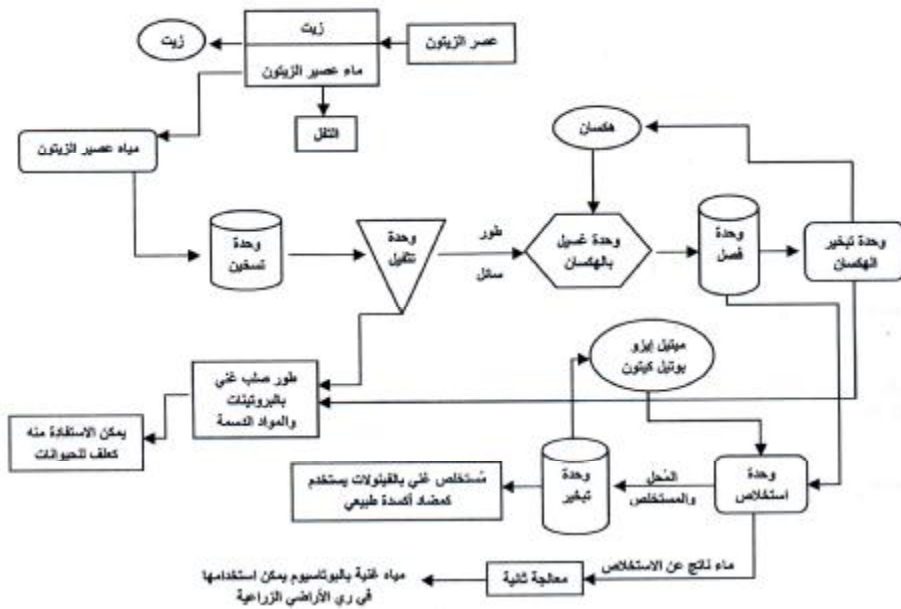
3- تؤدي الطريقة المستخدمة في البحث لاستخلاص الفينولات من مياه عصير الزيتون وباستخدام MIBK كمحل إلى خفض قيم الـ COD في مياه عصير الزيتون بنسبة 94.5%.

4- أظهر مستخلص MIBK أعلى قدرة إرجاعية وأعلى فعالية كمضاد للأكسدة بحسب اختبار الـ DPPH مقارنة بباقي المستخلصات، كما أظهر ارتباطاً خطياً بين المحتوى الفينولي والنشاط المضاد للأكسدة وبدقة وصلت إلى  $(R^2=0.99)$ .

5- أظهر MIBK كفاءة عالية باستخلاص مركبات ثنائي هيدروكسي الفينول من مياه عصير الزيتون، وهذا ما أكدته تميزه في كبح الجذور الحرة وقدرته الإرجاعية العالية.

6- نستنتج مما سبق أن للمحل MIBK قدرة عالية على استخلاص المركبات الفينولية بمختلف أنواعها من مياه عصير الزيتون، وأن هذه الفينولات تتزامن فيما بينها على كبح الجذور الحرة ومنع أكسدة الزيوت.

7- يمكن التوصية باستخلاص الفينولات من مياه عصير الزيتون باستخدام محل MIBK وفق المخطط التكنولوجي المقترح والمبين بالشكل (8)، بحيث تُدَوَّرُ المُحَلَّات المستخدمة بالتبخير مما سيقلل من تكلفة الاستخلاص من جهة ويخفف من الخطر البيئي الذي تسببه مياه معاصر الزيتون من جهة أخرى.



الشكل (8) المخطط التكنولوجي المقترح لاستخلاص الفينولات من OMWW باستخدام محل MIBK

## المراجع REFERENCES

- 1- Vasundhara, S., Vijay, K. H. & Jagan. M. R. J. 2008. Influence of milk and sugar on antioxidant potential of black tea. *Food Research International*. 41(2) 124-129.
- 2- Barlow, S. M. 1990. Toxicological aspects of antioxidants used as food additives. In Hudson. *Food antioxidants*. 253-307.
- 3- Yang, L., Han, H., Nakamura, N., Hattori, M. Wang, Z. Bio-guided. 2007. Isolation of antioxidants from the stems of *Dendrobium aurantiacum* var. *Phytotherapy Research*. 21(7).696-698.
- 4- Dharmendra Kumar Maurya, Thomas Paul Asir Devasagayam. 2010. Antioxidant and prooxidant nature of hydroxycinnamic acid derivatives ferulic and caffeic acids. *Food and Chemical Toxicology*. 48.3369-3373.
- 5- Katarzyna Tyszczyk, Agnieszka Skalska-Kamin´ska, Anna Woz´niak. 2011. Voltammetric method using a lead film electrode for the determination of caffeic acid in a plant material. *Food Chemistry*. 125.1498-1503.
- 6- Shahidi, F., Chandrasekara, A. 2010. Hydroxycinnamates and their in vitro and in vivo antioxidant activities. *Phytochem. Rev.* 9.147 – 170.
- 7- Garrido, J., Gaspar, A., Manuela Garrido, E., Miri, R., Tavakkoli, M., Pourali, S., Saso, L., Borges, F., Firuzi. O. 2012. Alkyl esters of hydroxycinnamic acids with improved antioxidant activity and lipophilicity protect PC12 cells against oxidative stress. *Biochimie*. 94 .961-967.
- 8- Kellie L. Tuck, Peter J. Hayball. 2002. Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *REVIEWS, Journal of Nutritional Biochemistry*. 13.636–644.
- 9- Aziz, N. H., Farag, S. E., Mousa, L. A. A., & Abo-Zaid, M. A. 1998. Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. *Microbios*. 93, 43–54.
- 10- Muhammad H. Alu’datt, Intezaz Alli, Khalil Ereifej, Mohammad Alhamad, Abdel Rahman Al-Tawaha, Taha Rababah. 2010. Optimisation, characterisation and quantification of phenolic compounds in olive cake. *Food Chemistry* . 123, 117–122.
- 11- Rodis, P. S., Karathanos, V. T., & Mantzavinou, A. 2002. Partitioning of olive oil antioxidants between oil and water phases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, 596–601.
- 12- Elena De Marco, Maria Savarese, Antonello Paduano, Raffaele Sacchi. 2007. Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters. *Food Chemistry*. 104, 858–867.
- 13- Ines Fki, Nouredine Allouche, Sami Sayadi. 2005. The use of polyphenolic extract, purified hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid from olive mill wastewater for the stabilization of refined oils: a potential alternative to synthetic antioxidants. *Food Chemistry*. 93, 197–204.

- 14-Adel Noubigh, Manef Abderrabba, Elise Provost. 2007. Temperature and salt addition effects on the solubility behavior of some phenolic compounds in water. *J. Chem. Thermodynamics* . 39, 297–303.
- 15-Antonella De Leonardis, Vincenzo Macciola, Giuseppe Lembo, Alessandra Aretini, hindra Nag c. 2007. Studies on oxidative tabilization of lard by natural antioxidants recovered from olive-oil mill wastewater. *Food Chemistry*. 100, 998–1004.
- 16 - شيخ إسماعيل زادة، محمد نوري. 2005. رسالة دكتوراه. دراسة ملوثات مياه صرف معاصر الزيتون في سورية.
- 17-Authority. 1979. United States Environmental Protection. Toxic Substances Control Act (TSCA), USEPA. Washington, DC.
- 18- Hill, G., Robinson. C. W. 1975. Substrate inhibition kinetics: phenol degradation by pseudomonas putida. *Biotechnol. Bioeng.* 17, 1615–1899.
- 19- furniss, B. S., hannaford, A. J., Smith, P. W. G., tatchell. Vogel's A. R. 1989. Textbook of practical organic chemistry. Longman scientific&Technical. London. fifth edition.
- 20- Zhen Li, Minghong Wu, Zheng Jiao, Borong Bao, Senlin Lu B. 2004. Extraction of phenol from wastewater by N-octanoylpyrrolidine. *Journal of Hazardous Materials*. B114,111–114.
- 21- Lee, C,Y, Lee, K, W; Kim, Y, J; Lee, H, J. 2003. Cocoa Has More Phenolic Phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine. *Journal of Agricultural and Food chemistry*. 51, p7292-7295.,.
- 22-Yu Yan-Ying, Zhang Wei, CaoShu-Wen. 2007. Extraction of Ferulic Acid and Caffeic Acid with Ionic Liquids. *Chinese journal of analytical chemistry*. 35(12), 1726–1730.
- 23-Chufen Yang, Yu Qian, Lijuan Zhang, Jianzhong Feng. 2006. Solvent extraction process development and on-site trial-plant for phenol removal from industrial coal - gasification wastewater. *Chemical Engineering Journal*. 117, 179–185.
- 24-Oyaizu, M. 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Jpn. J. Nutr.* 44, 307–315.
- 25-İlhami Gülçin., 2006. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Turkey.Toxicology*. 217, 213–220.
- 26- Hassan K. Obied, Paul D. Prenzler, Kevin Robards., 2008. Potent antioxidant biophenols from olive mill waste. *Food Chemistry* . 111,171–178.
- 27- Vankar, P, S, Tiwari, V; Singh, L, W; Swapana, N. 2006. Antioxidant Properties of Some Exclusive Species of Zingiberaceae Family of Manipur. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*. 5(2), p 1318-1322.
- 28-AOAC. 1984. Official Method of Analysis of Association of official analytical chemists. Sidney, Williams by AOAC, U.S. 33. 034-0.34, p621, Vol. 14th edition.
- 29-Handbook Dean's Analytical Chemistry Handbook. 2004. Second Edition. The Mc Graw-Hill Companies. ISBN 0-07-141060-0.
- 30-Sangster, J., 1997. Octanol-water partition coefficients: fundamentals and physical chemistry. *Fundamentals and Physical Chemistry*. England: Wiley Series in Solution Chemistry. ISBN 0-471-97397.

- 31-Visioli, F., Romani, A., Mulinacci, N., Zarini, S., Conte, D., Vincieri, F., 1999. Antioxidant and other biological activities of olive mill waste waters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47, 3397–3401.
- 32- Hong Jiang, Ying Fang, Yao Fu, Qing-Xiang Guo., 2003. Studies on the extraction of phenol in wastewater. *Journal of Hazardous Materials*. B101,179-190.
- 33 – المواصفة القياسية السورية لمياه الصرف الصحي المعالجة لأغراض الري م.ق.س. 2752.2008.
- 34-Jin-Chun Cheng, Fang Dai, Bo Zhou, Li Yang, Zhong-Li Liu. 2007. Antioxidant activity of hydroxycinnamic acid derivatives in human low density lipoprotein: Mechanism and structure–activity relationship. *Food Chemistry*. 104 ,132–139.
- 35-Yu, L., Haley, S., Perret, J., Harris, M., Wilson, J., &Qian, M. 2002. Free radical scavenging properties of wheat extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, 1619–1624.
- 36-Archie Mpofu, Harry D. Sapirstein, Trust Beta. 2006. Geno type and Environmental Variation in Phenolic Content, Phenolic Acid Composition, and Antioxidant Activity of Hard Spring Wheat. *J. Agric. Food Chem*. 54, 1265-1270.
- 37-Amarowicz, R., Troszyńska, A., Barylko-Pikielna, N., &Shahidi, F. 2004. Polyphenolic extracts from legume seeds: Correlations between total antioxidant activity, total phenolics content, tannins content and astringency. *Journal of Food Lipids*. 11, 278–286.