

استعمال تقنية كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء HPLC للتشخيص النوعي والكمي لبعض المركبات الثانوية في قشرة وخشب أشجار النبق *Ziziphus spina-christi* L. النامية في الموصل

طلال قاسم التكاوي

قسم الغابات / كلية الزراعة والغابات / جامعة الموصل – العراق

E-mail: talaltakay@yahoo.com

الخلاصة

استخدمت طريقة الاستخلاص التعاقبي باستعمال جهاز الاستخلاص المستمر بوساطة مذيبين مختلفي القطبية (البنزين والايثانول 95%)، واستعمل جهاز المبخر الدورار للحصول على المستخلص الخام لكل مذيب، استعملت تقنية كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء (HPLC) لفصل وتشخيص بعض المركبات الثانوية في قشرة وخشب أشجار النبق وتقدير النسب المئوية لتواجدها في المستخلص الخام لكلا المذيبين، لقد تباين المذيبان في نوعية المركبات المفصولة وعددها ونسبها المئوية ومساحة كل منحنى والتي تمثل صورة لتركيز المركبات المفصولة، وقد شخصت الأحماض الأتية: حامض ألكاليك وحامض ألكليك وحامض السالسليك في القشرة، وحامض الستريك وحامض ألكاليك واسيتايل حامض السالسليك وحامض السالسليك في الخشب، و كانت نسب المركبات في مستخلص الايثانول الخام هي الأعلى.

الكلمات الدالة:

تاريخ تسلم البحث: 2013/10/1 ، وقبوله: 2013/12/30.

المقدمة

يعد النبق من الأشجار التي تمتد في مناطق واسعة، من الاستوائية إلى المعتدلة، ويفضل المناطق الحارة الرطبة والتربة العميقة ولا ينمو بشكل جيد في التربة الرملية أو الطينية وهو من الأشجار الحساسة للجفاف متساقط الأوراق (Abu-Taleb وآخرون، 2011)، حظي النبق باهتمام واسع في علوم كيمياء النبات والصيدلة والأحياء الدقيقة لقيمته الطبية ولأنه مصدر جيد للمركبات ذات الفعالية المضادة للميكروبات والفطريات والبكتريا والتي يمكن استعمالها لحماية المحاصيل الحقلية وفي الحقل الطبي (Sarfraz وآخرون، 2002 و Hadizadeh وآخرون، 2009 و Panduraju وآخرون، 2009 و Abalaka وآخرون، 2010 و Abu-Taleb وآخرون، 2011)، من المعروف أن المركبات الفينولية تؤدي دوراً مهماً في الفعالية الحيوية للنبات (Veldhuizen وآخرون، 2006) بضمنها فعاليتها كمضادات أكسدة (Maizura وآخرون، 2011)، وقد بين كل من Mahajan و Chopda (2009) وجود (64) مركبا قلويديا و (16) من الكلايكوسيدات والفلافونويدات و (14) من التربينات وغيرها في النبق ولكل من تلك المركبات العديد من الخواص المهمة، كما بين Abu-Taleb وآخرون (2011) وجود المركبات الفلافونويدية الأتية: Rutin و Quercetin و Myricetin و Apigenin و Quercetin-3-O-Galactoside و Luteolin و Kaempferol و Kaempferol-3-O-robinoside في النبق النامي في المملكة العربية السعودية، وشخص Ghafoor وآخرون (2012) المركبات الفينولية الأتية Rutin و P-Coumaric acid و Apigenin و Quercetin و Chlorogenic acid و Syringic acid في مستخلص الايثانول للسيقان الغضة للنبق النامي في مركز مدينة اربيل، كما شخصت المركبات Rutin و P-Hydroxybenzoic acid و Chlorogenic acid و Ferulic acid في مستخلص الثمار وكان تركيز الأحماض الفينولية في الساق هو الأعلى، وقد وجد حامض الكالكلي في قشرة وورق وثمار أشجار النبق النامية في الهند (Singh وآخرون، 2007)، يعمل حامض الكالكلي على كسح الجذور الحرة لاحتوائه على مجموعة الهيدروكسيل (Bhadriya وآخرون، 2012)، كما يعمل حامض الستريك على خلق أواصر عرضية لتحسين قوة المنتجات الورقية وتحسين الخواص الميكانيكية للورق (Trask-Morrell وآخرون، 1991 و Xu و Yang، 1998)، إذ يؤدي وجوده في الخشب إلى زيادة مجاميع الهيدروكسيل (McSweeny وآخرون، 2006)، مما يؤدي إلى زيادة قابلية الخشب على امتصاص ايونات المعادن الثقيلة وقد يعمل على تثبيط إنتاج حامض الاوكزاليك (الذي تنتجه الفطريات) أو يؤدي إلى ترسيبه على شكل بلورات، ويزيد من مناعة الخشب ضد فطريات العفن البني (Green وآخرون، 1991). يعد حامض السالسليك من المنظمات الداخلية ذات الطبيعة الفينولية إذ يشارك في تنظيم معظم العمليات الفسلجية في النباتات (Shakirova وآخرون، 2003) فهو يحسن نمو النبات (Metwally وآخرون، 2003 و Khodary وآخرون، 2004) ونسبة التنفس (Khan وآخرون، 2003) والتبادل الأيوني والنتح (Gunes وآخرون، 2005) ويحسن المناعة النظامية للنبات ضد مختلف مسببات الأمراض و يرسل الإشارة إلى الجينات (Sakhabutdinova وآخرون، 2003) وقد تبين أن إضافته تزيد من تحمل النبات للملوحة (Shakirova وآخرون، 2003) والجهد الازموزي الناتج عنه (Borsani وآخرون، 2001) وتحمل الجهود المتعددة (Senaratna وآخرون، 2000) ومقاومة الجفاف (Usha و Singh، 2003) فضلا عن زيادة مقاومة النبات للمعادن الثقيلة (Choudhuri و Mishra، 1999). تعد الأحماض الكاربوكسيلية مركبات قطبية تذوب بالماء وتنتشر في الطبيعة بشكل واسع وهي حوامض ضعيفة تعمل بعضها على تثبيط الفطريات مثل حامض ألكليك (Barbosa-Canovas وآخرون، 1998)، وقد حضرت تركيبة فعالة تستعمل مبيدا حيويا من حامض اللاكتيك

وحامض ألكليك (Adams، 2003)، وقد وجد أن أنواعا مختلفة من الفينولات الذائبة في الماء مثل حامض الكالكيك إما أن تعمل على تحفيز أو تثبيط إنبات السبورات ونمو الهياقات للفطريات (Vincenzo وآخرون، 2006).

مواد البحث وطرقه

أسقطت ثلاثة أشجار بعمر سبع سنوات وأخذت العينات على شكل أقراص بسمك عشرة سنتيمترات عند مستوى الصدر (1.3م) لكل شجرة، قشرت الأقراص وجففت هوائيا ثم طحنت وغرلت وجمعت الدقائق التي مرت من خلال المنخل (30 مش) واستقرت فوق المنخل (50مش)، اتبعت طريقة الاستخلاص ألتتابعي بوساطة جهاز الاستخلاص المستمر Soxhlet (Vargas و Romero، 2005) باستعمال (20غرام) لكل من مسحوق القشرة والخشب و(300مل) من مذيبين مختلفي القطبية، البنزين والايثانول (95%) كل على حده، واستعمل المبخر الدوار للحصول على المستخلص الخام لكل مذيب (لكل من القشرة والخشب)، ثم أجريت عملية التحلل أحامضي لكليهما (Harborne، 1973)، استخدمت تقنية كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء للتشخيص بعد إعداد المحاليل القياسية، إذ حقن (3 مايكروليتر) من كل محلول قياسي في جهاز HPLC باستعمال عمود الفصل C18 (Majors، 2001) واستخدم الطور الناقل اسيتونيتريل : ماء (20:80) بسرعة جريان (1.3مل/دقيقة) وكشف عن الاستجابات الكروماتوغرافية عند طول موجي (280 نانوميتر)، نتج عن عملية الفصل رسم منحني لكل مركب من المركبات القياسية مقرونا بزمن الاحتباس الخاص به، اعتمدت تلك القيم لمطابقتها مع قيم الاحتباس للمركبات التي فصلت من المستخلص الخام بعد أن حقنت في جهاز HPLC وفصلت عند نفس ظروف الفصل المذكورة سابقا لمعرفة محتواه من المركبات، تم العمل في مختبرات كلية الزراعة والغابات.

النتائج والمناقشة

تباينت القشرة والخشب كما تباين المذبان في نوعية المركبات المفصولة وعددها ونسبها المئوية كما موضح في الجدولان (1و2) والأشكال (1إلى4). أما الأشكال (5إلى8) فتمثل المحنات القياسية للمركبات المشخصة، وبقيت العديد من المركبات مجهولة الهوية لعدم توفر المركبات القياسية.

وقد شخصت المركبات:

أ- في القشرة: 1- حامض ألكالك 2- حامض ألكليك 3- حامض السالسليك، ومن الجدول رقم (1) نلاحظ:

1- ظهر حامض ألكالك في مستخلص البنزين الخام فقط بنسبة (9.17%).

2- ظهر حامض ألكليك في مستخلص الايثانول الخام فقط بنسبة (48.46%).

3- ظهر حامض السالسليك في مستخلص البنزين الخام بنسبة (2.78%)، كما ظهر في مستخلص الايثانول الخام أيضا بنسبة (17.06%).

وبشكل عام فإن نسب المركبات في مستخلص الايثانول الخام هي الأعلى.

ب- في الخشب: 1- حامض الستريك 2- حامض ألكالك 3- اسيتايل حامض السالسليك 4- حامض السالسليك، ومن الجدول رقم (2) نلاحظ:

1- ظهر حامض الستريك في مستخلص الايثانول الخام فقط بنسبة (21.49%).

2- ظهر حامض الكالك في مستخلص البنزين الخام فقط بنسبة (9.86%).

3- ظهر اسيتايل حامض السالسليك في مستخلص الايثانول الخام فقط بنسبة (23.22%).

4- ظهر حامض السالسليك في مستخلص البنزين الخام فقط بنسبة (4.10%).

يلاحظ أن حامض الستريك واسيتايل حامض السالسليك ظهرا في مستخلص الايثانول الخام فقط، وان حامضي الكالك والسالسليك ظهرا في مستخلص البنزين الخام فقط، وان النسب المئوية في مستخلص الايثانول الخام هي الأعلى، يعود ذلك إلى تباين المذبان في قطبيتهما فضلا عن تباين قطبية المركبات، وكانت نسبة حامض السالسليك في القشرة هي الأعلى، في حين تساوت تقريبا نسبة حامض الكالك، وظهر حامض ألكليك في القشرة فقط، لأغراض دفاعية إذ تعمل القشرة كدرع لحماية الأنسجة التي تليها، في حين ظهر حامض الستريك واسيتايل حامض السالسليك في الخشب فقط، إن امتلاك أشجار النبق لهذا الطيف من المركبات ذات الفعالية المضادة للفطريات والحشرات واكلات النباتات والمركبات التي لها القدرة على إعادة تعديل الخواص الكيميائية والنشيرية لمقاومة التأثيرات المختلفة حيوية وغير حيوية مكنته من الانتشار الواسع في مختلف البيئات والبقاء والتأقلم معها، وجعلته يحظى باهتمام واسع في مختلف العلوم التطبيقية.

الجدول (1): المركبات المشخصة في مستخلص البنزين الخام ومستخلص الايثانول الخام للقسرة مع نسبها المئوية وزمن الاحتباس لكل منها فضلا عن زمن الاحتباس القياسي.

Table (1): Identified compounds in Benzene crude and Ethanolic crude of the bark with its percentages, retention time and their standards retention time.

المقياسية R _t Standard (min.)	مستخلص الايثانول الخام Ethanolic crude extract		مستخلص البنزين الخام Benzene crude extract		المذيبات المستعملة The solvents
	(%)	R _t (min.)	(%)	R _t (min.)	المركبات المشخصة Identified compounds
1.082	*	*	9.170	1.090	حامض ألكاليك Gallic acid
1.136	48.466	1.116	*	*	حامض ألكاليك Acetic acid
1.380	17.060	1.381	2.785	1.374	حامض السالسليك Salicylic acid

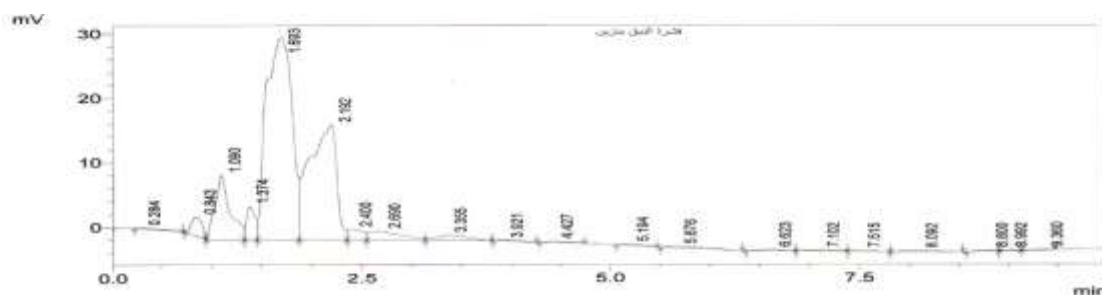
* لم يظهر المركب.

الجدول (2): المركبات المشخصة في مستخلص البنزين الخام ومستخلص الايثانول الخام للخشب مع نسبها المئوية وزمن الاحتباس لكل منها فضلا عن زمن الاحتباس القياسي.

Table (2): Identified compounds in Benzene crude and Ethanolic crude of the wood with its percentages, retention time and their standards retention time.

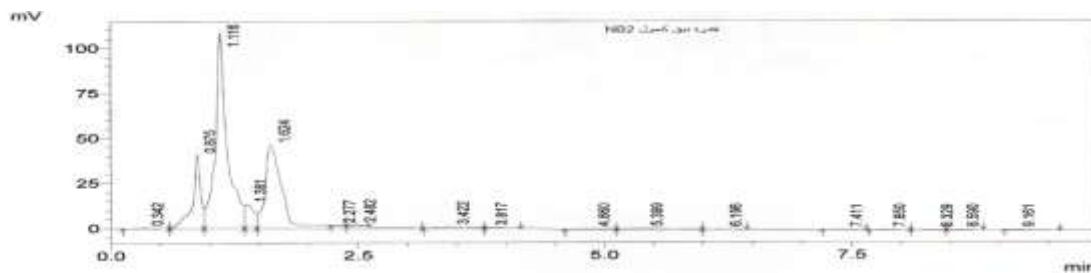
المقياسية R _t Standard (min.)	مستخلص الايثانول الخام Ethanolic crude extract		مستخلص البنزين الخام Benzene crude extract		المذيبات المستعملة The solvents
	(%)	R _t (min.)	(%)	R _t (min.)	المركبات المشخصة Identified compounds
1.025	21.493	1.023	*	*	حامض الستريك Citric acid
1.082	*	*	9.866	1.074	حامض ألكاليك Gallic acid
1.240	23.229	1.248	*	*	اسيتايل حامض السالسليك Acetylsalicylic acid
1.380	*	*	4.105	1.396	حامض السالسليك Salicylic acid

* لم يظهر المركب.



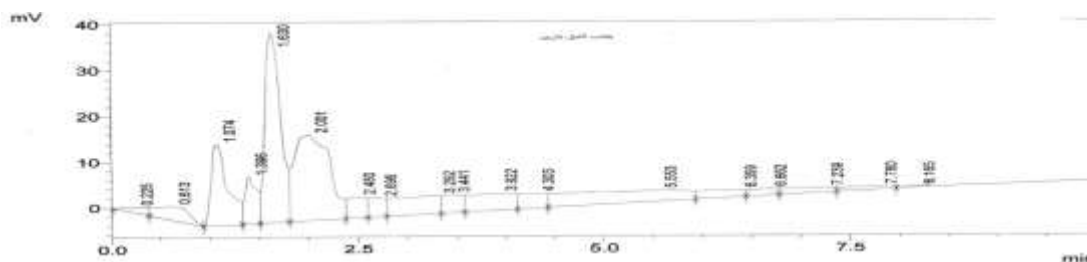
الشكل (1): المركبات المشخصة في مستخلص البنزين الخام للقسرة.

Figure (1): Identified compounds on benzene crude of bark using HPLC.



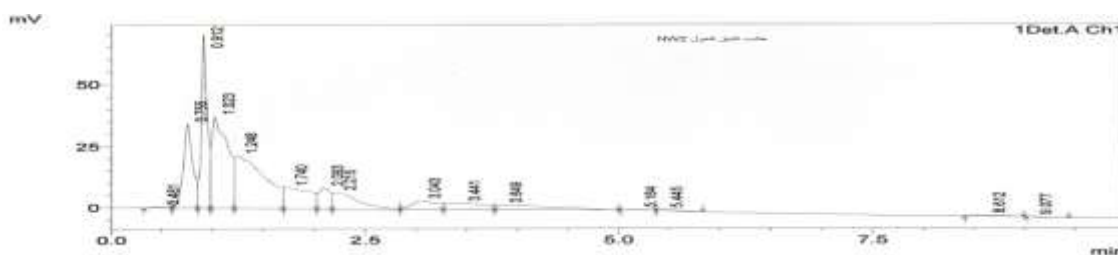
الشكل (2): المركبات المشخصة في مستخلص الايثانول الخام للقشرة.

Figure (2): Identified compounds on ethanolic crude of bark using HPLC.



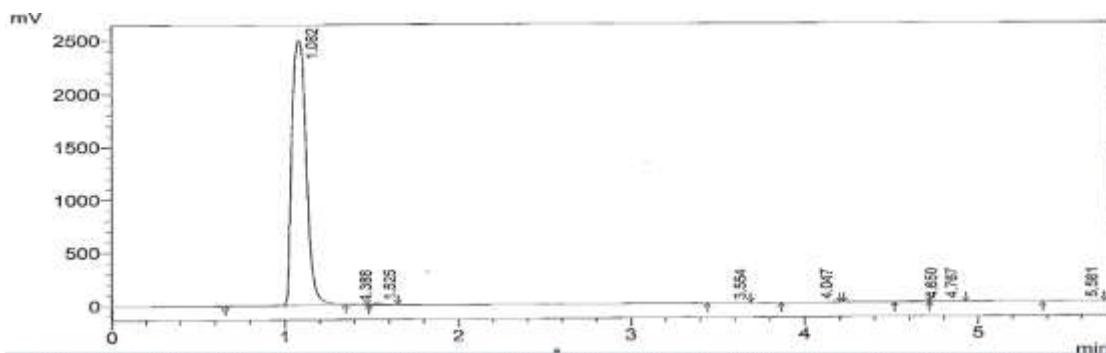
الشكل (3): المركبات المشخصة في مستخلص البنزين الخام للخشب.

Figure (3): Identified compounds on benzene crude of wood using HPLC.



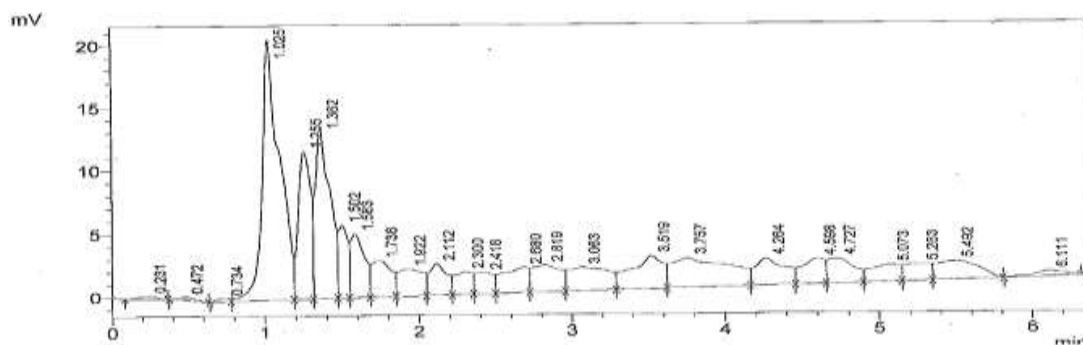
الشكل (4): المركبات المشخصة في مستخلص الايثانول الخام للخشب.

Figure (4): Identified compounds on ethanolic crude of wood using HPLC.



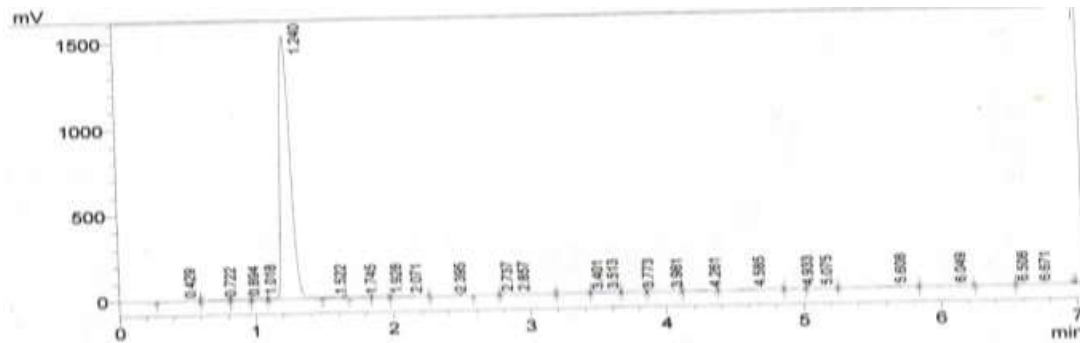
الشكل (5): المنحنى القياسي لحمض الكاليك.

Figure (5): Standard curve of gallic acid



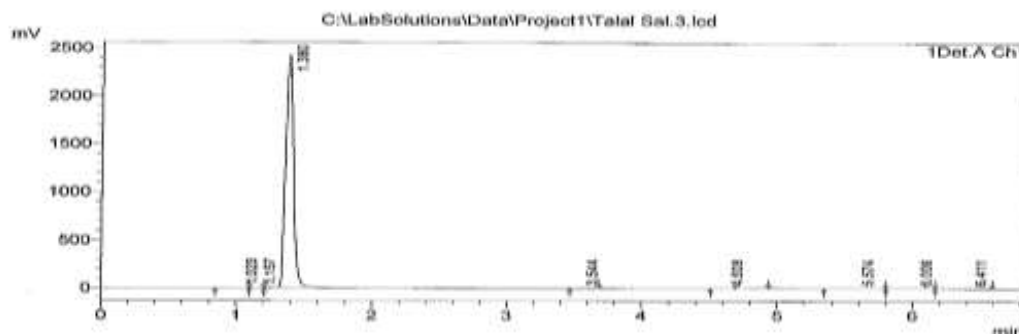
الشكل (6): المنحنى القياسي لحمض الستريك.

Figure (6): Standard curve of citric acid



الشكل (7): المنحنى القياسي لاسيتايل حامض الساليسليك.

Figure (7): Standard curve of acetylsalicylic acid.



الشكل (8): المنحنى القياسي لحامض الساليسليك.

Figure (8): Standard curve of salicylic acid.

UTILIZING OF HPLC TECHNIQUE FOR QUALITATIVE AND QUANTITATIVE IDENTIFICATION OF SOME SECONDARY COMPOUNDS IN THE BARK AND WOOD OF *Ziziphus spina-christi* L. GROWING IN MOSUL

Talal Kasim Al-Takay
Forestry Dept., College of Agriculture and Forestry, Mosul University. Iraq
E-mail: talaltakay@yahoo.com

ABSTRACT

Sequence of solvents system extraction using two different polar solvents (Benzene and Ethanol 95%) was done by using the Soxhlet apparatus then Rotary Vacuum Evaporator in order to prepare crude extract, HPLC technique was used to separate, identify and also determine some secondary compounds and its percentages from the bark and wood of *Ziziphus spina-christi* L. trees. The results showed a remarkable variation in the kind, number, percentage and the peak area (represented the concentration) of each separated compound. Gallic acid, Acetic acid and Salicylic acid were identified in the bark, Citric acid, Gallic acid, Acetylsalicylic acid and Salicylic acid were identified in the wood. The percentages of the compounds at Ethanol crude is the highest.

Keywords: *Ziziphus spina-christi*, HPLC, Bark, Wood.

Received: 1/10/2013, Accepted: 30/12/2013.

المصادر

Abalaka, ME., SY. Daniyan and A. Mann (2010). Evaluation of the antimicrobial activities of two *Ziziphus* species (*Ziziphus mauritiana* L. and *Ziziphus spina christi* L.) on some microbial pathogens. *African Journal of Pharmacology*. 4: 135- 139.

- Abu-Taleb, A.M., K. El-Deeb and F. Al-Otibi (2011). Assessment of antifungal activity of *Rumex vesicarius* L. and *Ziziphus spina-christi* (L.) Willd. extracts against two phytopathogenic fungi. *African Journal of Microbiology Research*. 5(9) pp. 1001-1011.
- Adams, M. (2003). Nisin in Multifactorial Food Preservation. Chapter 2, In: Natural Antimicrobials for the Minimal Processing of Foods, ed. S. Roller. pp. 11-33. CRC Press, NY, and Wood head Publishing Limited, Cambridge, England.
- Barbosa-Canovas, G., U. Pothakamury, E. Palou and B. Swanson (1998). Chemicals and Biochemical's Used in Food Preservation. Chapter 8, In: Non-thermal Preservation of Foods. pp. 215-233. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Bhadoriya, U., S. Praveen and S.S. Solanki (2012). In vitro free radical scavenging activity of gallic acid isolated from *Caesalpinia Decapetala* wood. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 1:1-3.
- Borsani, O., V. Valpuesta and M.A. Botella (2001). Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiology*. 126: 1024-1030.
- Ghafoor, A. O., H.K. Qadir and N. A. Fakhri (2012). Analysis of phenolic compounds in extracts of *Ziziphus spina-christi* using RPHPLC method. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 4(6):3158-3163.
- Green, F., M.J. Larsen, J.E. Winandy and T.L. Highley (1991). Role of oxalic acid in incipient brown-rot decay. *Material und Organismen*. 26 (3), 191-213.
- Gunes, A., A. Inal, M. Alpaslan, N. Cicek, E. Guneri, F. Eraslan and T. Guzelordu (2005). Effects of exogenously applied salicylic acid on the induction of multiple stress tolerance and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.). *Archives of Agronomy and Soil*. 51: 687-695.
- Hadizadeh, I, B. Peivastegan and M. Kolahi (2009). Antifungal activity of nettle (*Urtica dioica* L.), colocynth (*Citrullus colocynthis* L. schrad), oleander (*Nerium oleander* L.) and konar (*Ziziphus spina-christi* L.) extracts on plants pathogenic fungi. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 12: 58-63.
- Harborne, J. B. (1973). Phytochemical Methods: A guide to Modern Technique of Plant Analysis. 1st ed., Cox and Wyman, London, p 52-73.
- Khan, W., B. Prithiviraj and D.L. Smith (2003). Photosynthetic responses of corn and soybean to foliar application of salicylates. *Journal of Plant Physiology*. 160: 485-492.
- Khodary, S.E.A. (2004). Effect of salicylic acid on the growth, photosynthesis and carbohydrate metabolism in salt-stressed maize plants. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 6:5-8.
- Mahajan, RT. and MZ. Chopda (2009). Phyto-pharmacology of *Ziziphus jujuba* mill- a plant review. *Phyto-Pharmacology* .3(6):320-329.
- Maizura, M., A. Aminah and W.M. Wan Aida (2011). Total phenolic content and antioxidant activity of kesum (*Polygonum minus*), ginger (*Zingiber officinale*) and turmeric (*Curcuma longa*) extract. *International Food Research Journal*. 18: 529-534.
- Majors, R.E. (2001). New Chromatography Columns And Accessories At The 2001. Pittsburgh conference, Part 1.14 (5): 284.301.
- McSweeney, Rowell and Min (2006). Effect of citric acid modification of aspen wood on sorption of copper ion. *Journal of Natural Fibers*. 3(1) 43-58.
- Metwally, A., I. Finkemeier, M. George and K. Dietz (2003). Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedlings. *Plant Physiology*. 132: 272-281.
- Mishra, A. and M.A. Choudhuri (1999). Effects of salicylic acid on heavy metal-induced membrane degradation mediated by lipoxygenase in rice. *Journal of Plant Biology*. 42: 409-415.

- Panduraju, T., P. Raja Sridhar Rao and V. Sateesh Kumar (2009). A study on antimicrobial activity of *Rumex vesicarius* Linn. *International Journal Of Pharm Technology Research. 1: 21-25.*
- Romero, C. y and M. Vargas (2005). Extraccion de la ceite de la semilla del neem (*Azadirachta indica*). *Ciencia. 13 :464-474.*
- Sakhabutdinova, A.R., D.R. Fatkutdinova, M.V. Bezrukova and F. M. Shakirova (2003). Salicylic acid prevents the damaging action of stress factors on wheat plants. *Bulgaria Journal of Plant Physiology. Special Issue. 21: 314-319.*
- Sarfaraz, A., S.H. Ansari and E. Porchezian (2002). Antifungal activity of alcoholic extracts of *Ziziphus vulgaris* and *Acacia concinna*. *Hamdard Medicus. Bait al-Hikmah, Karachi, Pakistan. 14/15: 42-45.*
- Senaratna, T., D. Touchell, E. Bunn and K. Dixon (2000). Acetyl salicylic acid (aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plant. *Journal of Plant Growth Regulation. 30: 157-161.*
- Shakirova, F.M., A.R. Sakhabutdinova, M.V. Bezrukova, R.A. Fatkhutdinova and D.R. Fatkhutdinova (2003). Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity. *Journal of Plant Science. 164: 317-322.*
- Singh, B. and K. Usha (2003). Salicylic acid induced physiological and biochemical changes in wheat seedlings under water stress. *Journal of Plant Growth Regulation. 39: 137-141.*
- Singh, DP., S. Maurya, SP. Singh, M. Singh and UP. Singh (2007). Chemotaxonomic variability in *Zizyphus mauritiana* varieties and its pharmacological properties in relation to human health. *Journal of Herb Pharmacotherapy. 7(3-4):229-37.*
- Trask-Morrell, B. J., B. A. Kottes-Andrews and E. E. Graves. (1991). Catalyst effects found in thermal and mass spectrometric analyses of polycarboxylic acids used as durable press reactants for cotton. *Journal of Applied Polymer Science. 43: 1717-1726.*
- Veldhuizen, EJ., JL. Tjeerdsma-van Bokhoven, C. Zweijtzer. Burt SA. and HP. Haagsman (2006). Structural requirements for the Antimicrobialactivity of carvacrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry. 54: 1874-1879.*
- Vincenzo, L., M. Veronica, T. Lattanzio and C. Angela (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.*
- Yang, C. Q. and Y. Xu (1998). Paper wet performance and ester cross linking of wood pulp cellulose by poly (carboxylic acids). *Journal of Applied Polymer Science. 67: 649-658.*

