

Extraction and Identification of Amygdalin in Seeds of some Syrian Rose's Almonds (sweet almond, bitter almond and apricot) Using Reverse Phase High-performance Liquid Chromatography (RP-HPLC)

Dr. Juhaina Deeb*
Hassan Mohamed Mahmoud**

(Received 23 / 8 / 2022. Accepted 1 / 2 / 2023)

□ ABSTRACT □

In this research, amygdalin was extracted from the seeds of some roses almonds fruits (sweet almond, bitter almond and apricot) and determined by using reverse phase liquid chromatography (RP-HPLC) with ultraviolet detector (DAD) on column C18 and mobile phase (water: methanol 60:40 v/v). The extraction was accomplished by reflux soaking with two types of solvents (water and ethanol) and by heating for different periods of time and temperatures. The measurements were carried out after achieving the ideal conditions for chromatographic separations, which showed linear correlation $r = 0.999$ and limits of detection of LOD and LOQ for amygdalin (5.72 mg/l) and (19.07 mg/l), respectively, with recovery ($100.17 \pm 1.68\%$), and relative deviation (1.45 - 0.12%).

The results clarified that soaking for 100 min at the temperature (100°C in distilled water and 78.5°C in ethanol) gave the highest yield either with aqueous or alcoholic extracts in comparison with lower temperatures.

The analysis results showed difference between amygdalin content of bitter almonds (3.044g/100g) and bitter apricot kernels (3.924g/100g), while the content of sweet almonds was (1.144g/100g) which is the least and this is expected because there is no clear bitter taste of amygdalin despite of its existence.

Keywords: amygdalin, bitter almond, apricot, reverse phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC).

* Associate Professor - Specialization in Analytical Chemistry- Department of Chemistry - Faculty of Science - Tishreen University - Lattakia – Syria. juhaina.deeb@tishreen.edu.sy

** Master Student – Specialization in Analytical Chemistry - Department of Chemistry - Faculty of Science - Tishreen University - Lattakia – Syria. hassan.mahmood@tishreen.edu.sy

استخلاص وتحديد الأميغدالين في بذور بعض اللوزيات الوردية السورية (اللوز الحلو، اللوز المر والمشمش) باستخدام الكروماتوغرافيا السائلة ذات الأداء العالي بالطور العكوس (RP-HPLC).

د. جهينة ديب*

حسن محمد محمود**

(تاريخ الإيداع 23 / 8 / 2022. قُبِلَ للنشر في 1 / 2 / 2023)

□ ملخص □

تم في هذا البحث استخلاص وتحديد مركب الأميغدالين في بذور بعض ثمار اللوزيات الوردية (اللوز الحلو، اللوز المر والمشمش)، باستخدام الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء بالطور العكوس (RP-HPLC) مع كاشف الأشعة فوق البنفسجية (DAD) على عمود C18، وطور متحرك (ماء: ميثانول 40:60 v/v). أنجز الاستخلاص بطريقة النقع بالتقطير المرتد واستخدم نوعين من المذيبات (الماء، الايثانول) مع التسخين لفترات زمنية ودرجات حرارة مختلفة. أجريت القياسات بعد تحقيق الشروط المثالية لعمليات التحليل الكروماتوغرافي التي أظهرت خطية بمعامل ارتباط $r=0.999$ وحدود كشف LOD و LOQ للأميغدالين (5.72 mg/l) و (19.07 mg/l) على التوالي واسترجاعية (100.17±1.68%) وانحراف النسبي المئوي (0.12% - 1.45%).

أوضحت النتائج ان التسخين لمدة 100 min عند درجة الحرارة (100°C في الماء المقطر و 78.5°C في الايثانول) أعطى اعلى مردود سواء مع المستخلصات المائية أو الكحولية بالمقارنة مع درجات الحرارة الأقل، كما سجلت المستخلصات الكحولية المردود الأكبر بالمقارنة مع المستخلصات المائية.

اظهرت نتائج التحليل فرق في محتوى الأميغدالين بين اللوز المر (3.044g/100g) ونوى بذور المشمش المرة (3.924g/100g) أما في اللوز الحلو فكان (1.144g/100g) وهو الأقل وهذا متوقع حيث لا طعم واضح للاميغدالين المر فيه رغم وجوده.

الكلمات المفتاحية: الأميغدالين، اللوز المر، المشمش، الكروماتوغرافيا السائلة ذات الأداء العالي بالطور العكوس (RP-HPLC).

*أستاذ مساعد - قسم الكيمياء - كلية العلوم - جامعة تشرين - اللاذقية - سورية. juhaina.deeb@tishreen.edu.sy

** طالب ماجستير - قسم الكيمياء - كلية العلوم - جامعة تشرين - اللاذقية - سورية. hassan.mahmood@tishreen.edu.sy

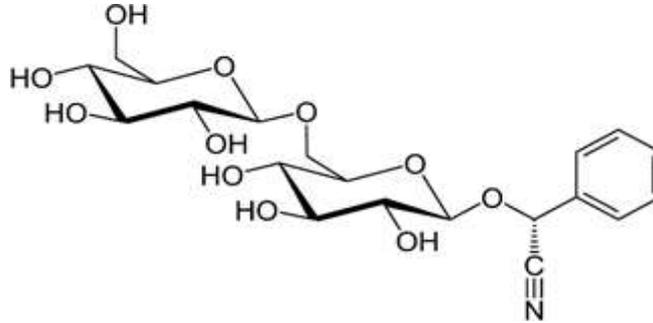
مقدمة:

تحتل سوريا مركزاً متقدماً عالمياً في إنتاج بعض أنواع اللوزيات الوردية منها اللوز الحلو والمر، والمشمش والدراق والخوخ، حيث تنتج من اللوز ما يقارب 89,000 طن وتأتي بالمركز الثالث عالمياً، وما يقارب 113,000 طن من المشمش وتأتي بالمركز التاسع عالمياً، ومن الدراق ما يقارب 55,000 طن سنوياً**.

تتميز تلك المنتجات اليوم بأنها لم تعد ذات أهمية فقط من الجانب الغذائي التقليدي كفاكهة بل تجاوزت ذلك إلى التركيز على الجزء الذي يتم التخلص منه عادة في سلة النفايات وهي البذور وذلك نظراً لاحتوائها على مواد ذات أهمية خاصة تدخل في صناعات مختلفة كمستحضرات التجميل والأدوية الطبية والمكملات الغذائية، بالإضافة إلى إنتاج المنكهات والاميغدالين [1,2].

تحتوي البذور بشكل عام على الغليكوزيدات السيانوجينية كالأميغدالين والبروناسين [3] ، ويختلف المحتوى بالطبع حسب نوع الثمر والبيئة والظروف المناخية [4]. عزل الأميغدالين لأول مرة عام 1830م من اللوز المر [5] وهو بالتعريف مركب كيميائي سيانوجيني طبيعي اشتق اسمه من اليونانية القديمة Amygdale وتعني اللوز ، يتواجد في أكثر من 2500 نوع من المنتجات النباتية [6] وتعد اللوزيات الوردية الأغنى به والمصدر الأهم له وبالأخص نوى بذور المشمش المرة ، اللوز المر، الخوخ والدراق إلى جانب بذور أخرى كالكتان والتفاح ، كما لا تخلو بعض النباتات الخضراء مثل الجرجير وبراعم العدس والفاصولياء منه لكن بنسب صغيرة للغاية [7,8] .

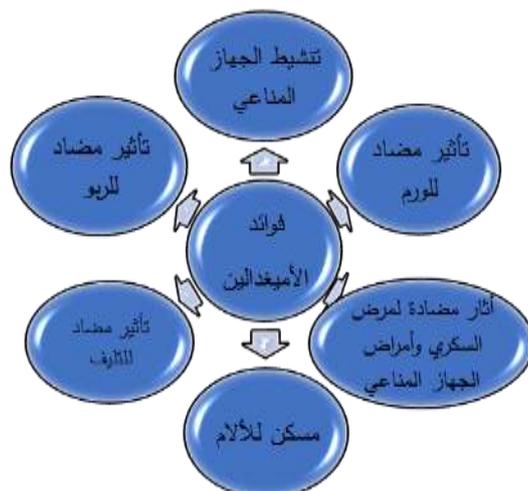
يعد جزيء الأميغدالين سكر ثنائي مكون من جزئتين غلوكوز ويسمى من الناحية الكيميائية [6-O-β-d-Glucopyranosyl-β-d- Glucopyranosyl] oxy [6] ويعرف بثلاثة أسماء الأميغدالين ، الليتريل ، فيتامين B₁₇ (وهو ليس بفيتامين بل كإسم تجاري) [9]. في الشكل (1) تظهر البنية الكيميائية للأميغدالين [10].



الشكل (1) البنية الكيميائية للأميغدالين.

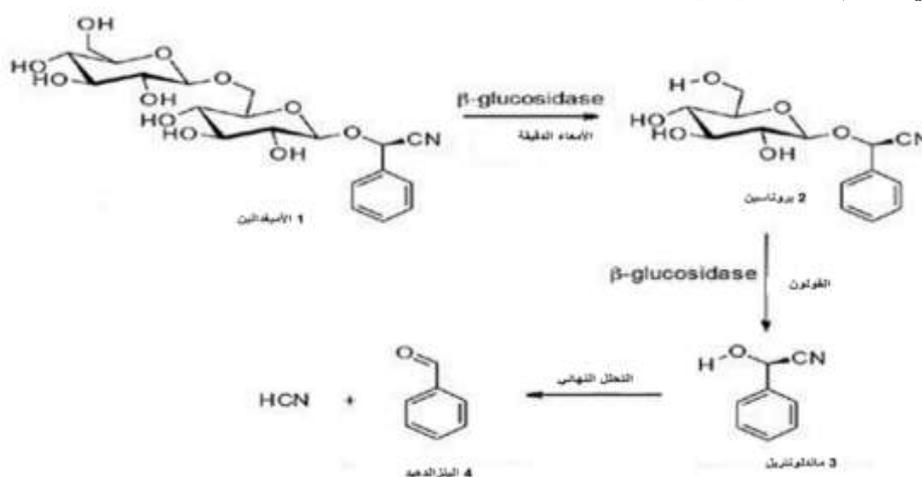
يعتبر الأميغدالين مركب مثير للاهتمام من ناحيتين الأولى طبية كونه يتميز بفوائد علاجية متعددة كمضاد للالتهاب والربو وللتهاب القصبات الهوائية وانتفاخ الرئة والسكري والجذام، ومثير للجدل من ناحية ثانية لأنه يملك فعالية مضادة للسرطان، ويمكن ان يسبب التسمم لاحتوائه على السيانيد إن تم تناوله بإفراط ودون استشارة طبية [11]. والشكل (2) يبين الفوائد العلاجية للأميغدالين.

* من بيانات وزارة الزراعة السورية على موقع الانترنت



الشكل (2) : يبين فوائد الأميغدالين العلاجية

يتحلل الأميغدالين انزيمياً إلى جزيئين من الغلوكوز والبنزالدهيد وسيانيد الهيدروجين [12] والشكل (3) يبين كيفية تحلل الاميغدالين في الجسم الانسان [11].



الشكل(3): يبين تحلل الاميغدالين في جسم الانسان.

عندما يدخل الاميغدالين إلى الجسم السليم يقوم انزيم يسمى الرودانيز بتفكيكه وتحويل جزيئات السيانيد والبنزالدهيد الى منتجات ثانوية آمنة من الثيوسيانات وحمض البنزويك [13]، أما في الجسم المصاب بالسرطان فعندما يدخل الاميغدالين الى الخلايا السرطانية التي تحتوي على كمية فائضة من انزيم بيتا غلوكوسيداز [14]، يحدث تفاعل كيميائي بين بيتاغلوكوسيداز والأميغدالين فيتحد سيانيد الهيدروجين والبنز الدهيد تآزرياً لإنتاج السم الذي يدمر ويقضي على الخلايا السرطانية [15].

بالتالي يشكل الأميغدالين جدار وقاية وحماية ويعزز من قوة جهاز المناعة في الجسم لهذا من المهم البحث عن أفضل طرق استخلاصه وطرق تحديده من أهم مصادره وهي المنتجات الطبيعية خاصة البذور.

تتوفر في الواقع العديد من الطرق التحليلية لتحديد الاميغدالين بشكله النقي او في المنتجات الطبيعية، مثل الطرق الطيفية بالأشعة فوق البنفسجية [16]، والكهربائية [17]، والطرق الأنزيمية [18] والكروماتوغرافية الغازية منها

والسائلة بتقنيات مختلفة ، تتميز هذه الطرق عن بعضها إما بزمن فصل ومدة التحليل أو بدرجة الكفاءة [9,20,19]. ركزت هذه الدراسة على استقصاء أفضل شروط استخلاص الاميغدالين وتحديد في بذور بعض المنتجات من اللوزيات الوردية (المشمش، اللوز المر، اللوز الحلو) باستخدام الكروماتوغرافيا السائلة ذات الأداء العالي بالطور العكوس نظراً لأهمية هذا المركب صحياً والحاجة الى توفره كمضاف غذائي بمنتج وطني يصنع من المنتجات المحلية المتوفرة ومراقبة محتواه في المكملات الغذائية الطبيعية المصنعة.

أهمية البحث وأهدافه:

- لهد البحث أهمية لما يملك الاميغدالين من فعالية مناعية حيوية وعلاجية متعددة كبديل للمنتجات الكيميائية الدوائية المصنعة خاصة في حقل الأغذية الوظيفية .
- ستوفر الطريقة التحليلية المعتمدة معلومات كافية عن أهم مصادر الاميغدالين وأسهل طرق استخلاصه وتحديد.

طرائق البحث ومواده:

1- المواد والأدوات المستخدمة :

- محلول عياري مرجعي للاميغدالين بنقاوة 99.9% إنتاج شركة Prodalinc Inc
- الايتانول بنقاوة 99.5% ، ماركة Sham Laboratory Chemicals
- الميثانول ماركة SIGMAALDRICH ($\geq 99.8\%$) (for HPLC).
- نظامي الهكسان 99% ، ماركة Sham Laboratory Chemicals
- ثنائي ايتيل ايتير، ماركة SIGMAALDRICH.
- ماء ثنائي التقطير .
- أوراق ترشيح سيللوزية ماركة MACHERY-NAGEL الألمانية، ورق المنيوم.
- حاقن ذو سعة 5,10ml ومرشح حقنة ذو مسام $0.45 \mu\text{m}$.
- عبوات زجاجية معقمة سعة 5ml.
- زجاجيات المانية الصنع ماركة SCHOTT (بياشر، دوارق حجمية، ماصات، أسطوانات مدرجة، أقماص فصل) مختلفة الحجم.

2- الأجهزة المستخدمة: Apparatus

- استخدمت الأجهزة الموجودة في مديرية المخابر (المخبر المركزي)، شعبة التحاليل الكيميائية وشعبة تحاليل السكريات. وزارة التجارة الداخلية وحماية المستهلك - محافظة دمشق.
- ميزان حساس ماركة (Sartorius, ED2245)، $\text{Sens} \pm 0.1 \text{mg}$.
 - سخان كهربائي مزود بمحرك مغناطيسي من (Nuova Stripate).
 - جهاز التقطير المرتد
 - ميزان حرارة زئبقي.
 - جهاز الأمواج فوق الصوتية إنتاج شركة Daihan نموذج Wise Clean WUC D-10H.

- جهاز المبخر الدوار صناعة Buchi موديل R-215 and B-491، سرعة دوران (20-280 rpm) ، مجال درجة الحرارة (20-180 C°).
- جهاز الطرد المركزي ماركة Heraeus Christ Labofuge (0-6000rpm).
- جهاز الكروماتوغرافيا السائلة إنتاج شركة HITACHI اليابانية مزود بكاشف الأشعة فوق البنفسجية (DAD L-2455) ، موصول بمعالج نموذج (CBM-20A).
- عمود كروماتوغرافي انتاج شركة Phenomenex ، نوع ، Nucleosile 3, C18(150mm× .120A , 4.60 mm,5 μm)
- خلط كهربائي

1- الجزء العملي:

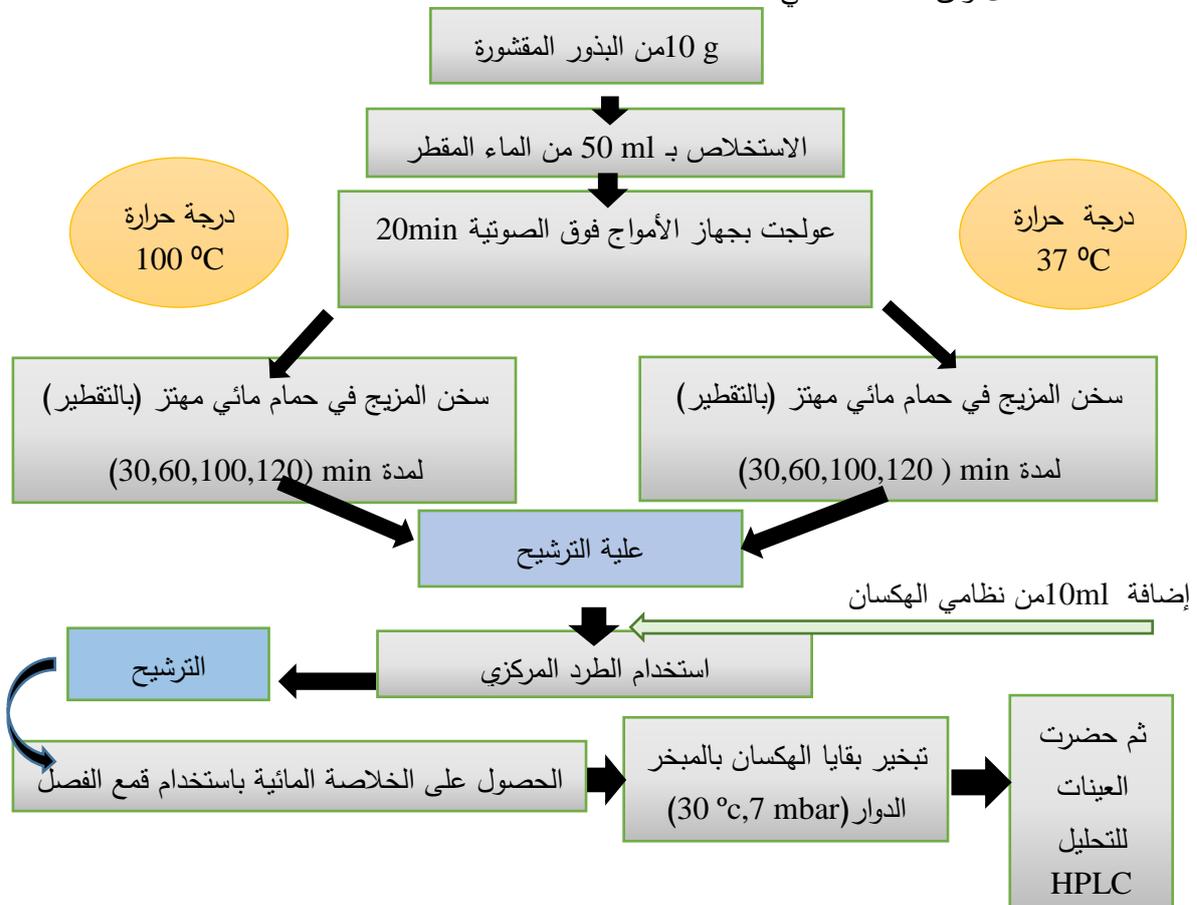
1-1- جمع العينات:

جمعت عينات الدراسة من بساتين المخرم الفوقاني وهي مركز منطقة تتبع لمحافظة حمص من عدة أشجار ومن عدة بساتين في شهر تموز موسم 2019. خضعت البذور بعدها لعدة عمليات منها التجفيف في الظل أولاً لمدة أسبوعين ثم التجفيف الحراري عند درجة حرارة 37 ± 2 °C حتى ثبات الوزن، بعدها تم تبريد البذور وتقسيرها وطحنها بطاحونة كهربائية ونخلها ثم حفظت في أكياس بولي برويلين عند درجة حرارة 4 °C لحين الاستخدام [21].

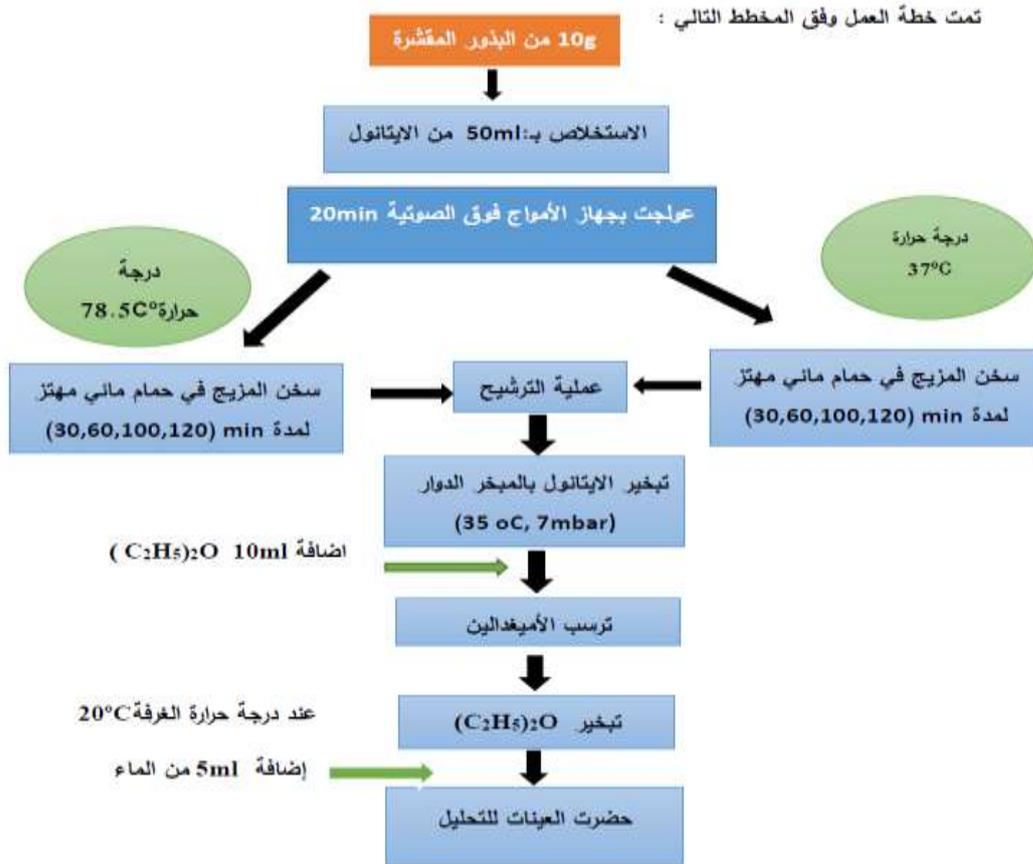
1-2-1- عمليات الاستخلاص:

1-2-1-1- الاستخلاص بالماء المقطر عند درجة 37 °C ، 100 °C : بالتقطير المرتد

تمت خطة العمل وفق المخطط التالي:



1-2-2- الاستخلاص بالايثانول عند درجة 37 °C, 78.5 °C : بالتقطير المرتد



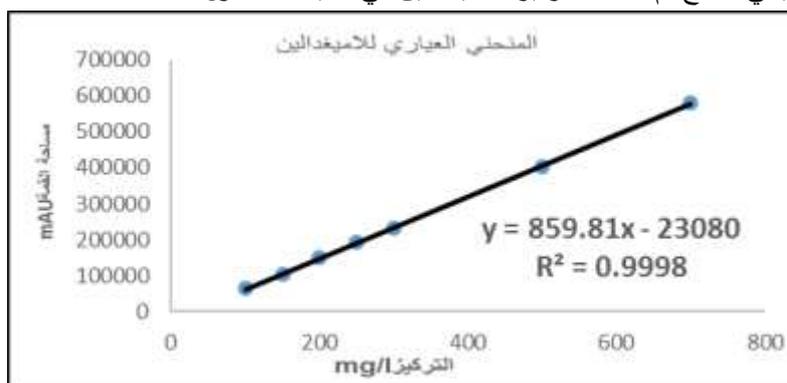
بعد ان تم تحضير العينات أجريت اختبارات تجريبية متعددة حتى تم التوصل إلى الشروط الكروماتوغرافية المثلى والتي تم اعتمادها في انجاز العمليات التحليلية وهي موضحة في الجدول (1).

جدول (1): الشروط الكروماتوغرافية المطبقة لتحديد الأميغدالين.

C18(150 mm,4.6 mm,5 µm)	العمود المستخدم
Diode Array Detectoe	الكاشف المستخدم
198 nm	طول موجة القياس
Methol:H ₂ O (40:60 v/v)	الطور المتحرك
(1.00) ml/min	تدفق الطور المتحرك
20 µl	الحجم المحقون
40 °C	درجة الحرارة فرن العمود
t _R =3.858 min	زمن احتفاظ الأميغدالين

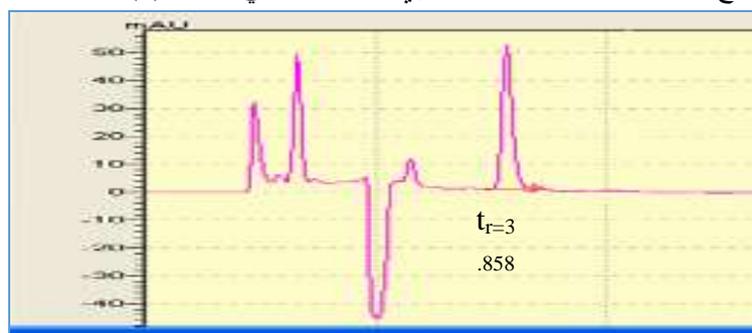
2- تحضير المحاليل العيارية وإختبار كفاءة طريقة التحليل:

تم تحضير محلول عياري من الأميغدالين بتركيز 1000 mg/l باستخدام الماء المقطر كمثل، ومنه تم تحضير سلسلة المحاليل العيارية للأميغدالين بالتركيز التالية (100,150,200,250,300,500,700) mg/l. بعدها تم تحليل سلسلة المحاليل العيارية بثلاث مكررات عند طول موجة القياس وأنجزت الحسابات الإحصائية للمعطيات التحليلية وهي موضحة في الجدول (3)، وفي الشكل (4) يظهر المنحني العياري للأميغدالين عند طول موجة القياس (198) nm ، ومن معادلة الخط البياني الناتج تم حساب تركيز الأميغدالين في العينات المدروسة.



الشكل (4) المنحني العياري للأميغدالين عند طول موجة 198nm

يظهر الكروماتوغرام الناتج عن حقن عينة المحلول العياري للأميغدالين في الشكل (5).



الشكل (5): كروماتوغرام محلول العياري للأميغدالين بتركيز 700mg/l .

من الكروماتوغرام شكل(5) تم حساب المعاملات الكروماتوغرافية وهي موضحة في الجدول (2).

جدول (2): المعاملات الكروماتوغرافية الموافقة لفصل الأميغدالين.

المعامل الكروماتوغرافي	العلاقة المعبرة عنه	قيمه بالنسبة للأميغدالين
t_R - زمن الفصل (min)	-	3.858
k' - عامل الفصل	$k' = (t_R - t_m) / t_m$	1.624
N - عدد المراكز الفصل	$N = 16(t_R / W)^2$	4135
H - ارتفاع مراكز الفصل (cm)	$H = L / N$	0.04
t_m - زمن عبور الطور المتحرك ، W - عرض القمة (cm) ، L - طول العمود الكروماتوغرافي (cm)		

جدول(3): المعطيات التحليلية للمحاليل العيارية والحسابات الإحصائية لها (n=3).

C(mg/l)	S (MAU)	Cexp (ppm)	\bar{C}_{exp} (ppm)	SD	RSD%	$\bar{R}ec\%$	Rec%
100	62253	99.298	100.954	1.47	1.456109	100.17%	100.95%
	64094	101.439					
	64684	102.125					
150	105345	149.404	149.932	0.49	0.326815	100.17%	99.95%
	106179	150.374					
	105873	150.018					
200	151740	203.351	203.709	0.79	0.387808	100.17%	101.85%
	152831	204.62					
	151573	203.157					
250	191741	249.863	250.234	0.74	0.295723	100.17%	100.09%
	192849	251.152					
	191590	249.688					
300	230885	295.379	296.386	0.96	0.323902	100.17%	98.80%
	232521	297.281					
	231847	296.498					
500	401857	494.181	495.081	1.05	0.212087	100.17%	99.02%
	403619	496.23					
	402417	494.832					
700	581374	702.918	703.703	0.91	0.129316	100.17%	100.53%
	582913	704.708					
	581860	703.484					

RSD% -التركيز النظري، Cexp- التركيز المقاس، \bar{C}_{exp} -متوسط التركيز المقاس، S- مساحة القمة، RSD%
 C* -التركيز النظري، Cexp- التركيز المقاس، \bar{C}_{exp} -متوسط التركيز المقاس، S- مساحة القمة، RSD%
 Standard Deviation، الانحراف المعياري النسبي المئوي، SD Standard Deviation الانحراف
 المعياري النسبي، Rec%-الاسترجاعية، $\bar{R}ec\%$ - متوسط الاسترجاعية.

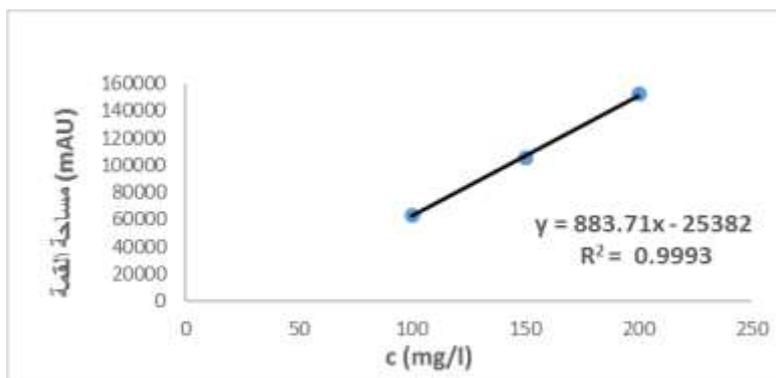
بلغ متوسط الاسترجاعية في العمليات التحليلية ($100.95 \pm 2.15\%$) وانحراف نسبي مئوي ($1.45 - 0.12\%$) كما هو موضح بالجدول (3).

3- تقدير حدود الكشف:

من خلال حساب الانحراف المعياري SD، و m ميل المنحني العياري الناتج عن تحليل السلسلة العيارية عند التراكيز المنخفضة لمركب الأميغدالين جدول (4) وشكل (6) تم تحديد حدود الكشف من العلاقتين (1) و(2) الأتيتين .

$$LOD=3 \times SD/m \quad \dots\dots\dots(1)$$

$$LOQ=10 \times SD/m \quad \dots\dots\dots(2)$$



الشكل (6): المنحني المعياري للأميغدالين عند تراكيز منخفضة.

جدول (4): متوسط المساحات الناتجة عن حقن التراكيز الصغيرة.

المركب	C (mg/l)	S(mAU)	SD
الأميغدالين	100	63677	1.47
	150	105799	0.49
	200	152048	0.79

وتظهر قيم كل من حد الكشف LOD وحد الكشف الكمي LOQ في الجدول (5) التالي.

الجدول (5): قيم حدود الكشف للأميغدالين

المركب المدروس	SD	m	LOD mg/l	LOQ mg/l
الأميغدالين	1684.840	883.71	5.72	19.07

حيث: SD الانحراف المعياري النسبي، m ميل المستقيم في المنحني المعياري .

النتائج والمناقشة:

تظهر النتائج التحليلية لمحتوى نوى بذور المشمش المرة من الاميغدالين المستخلص بالماء المقطر والايثانول في الجدول (6) و جدول (7) على التوالي.

جدول (6): يبين تركيز الأميغدالين في نوى بذور المشمش المرة عند الاستخلاص بالماء المقطر .

درجة الحرارة	زمن النقع (min)	Area (mAU)	Cexp (ppm)	\bar{C}_{exp} (ppm)	C* g/100g	C** g/100g	SD	RSD%	CL(P=0.95) $CL = \bar{X} \pm t \frac{SD}{\sqrt{n}}$
37°C	30	5893802	6880.073	6882.517	0.688	0.344	2.13	0.03094798	6882.517±6.5
		5896773	6883.527						
		5897137	6883.95						
	60	7279148	8490.917	8495.574	0.849	0.424	6.56	0.07721668	8495.574±20.02
		7289606	8503.078						
		7280705	8492.728						
	100	12213449	14228.395	14226.009	1.422	0.711	2.67	0.01876844	14226.009±8.15
		12208910	14223.118						
		12211814	14226.494						
120	9872357	11506.234	11508.935	1.15	0.575	5.12	0.04448717	11805.935±15.63	
	9879760	11514.842							
	9871923	11505.729							
100°C	30	16152614	18808.755	18812.571	1.881	0.94	3.33	0.01770093	18812.571±10.16
		16157861	18814.856						
		16157213	18814.103						
	60	22753998	26484.674	26487.323	2.648	1.324	3.22	0.01215676	26487.323±9.83
		22759352	26490.9						
		22755478	26486.395						
	100	31051562	36132.868	36136.082	3.613	1.806	5.47	0.01513722	36136.082±16.69
		31059378	36141.956						
		31052038	36134.584						
120	20698587	24094.695	24097.612	2.409	1.204	4.52	0.01875705	24097.612±13.79	
	20705574	24102.82							
	20699124	24095.32							

*تركيز الأميغدالين في مستخلص (10g) من البذور الجافة، ** تركيز الأميغدالين في (100g) بذور جافة، CL Confidence Level حد الثقة عند مستوى ثقة 95% وعدد درجات حرية t=4.303، عند ثلاث تراكيز مكررة n=3 لكل عينة من العينات المدروسة، Cexp التركيز المقاس، \bar{C}_{exp} - متوسط التركيز المقاس، Area- مساحة القمة، RSD% Percentage Standard Deviation - الانحراف المعياري النسبي، SD - Standard Deviation الانحراف المعياري النسبي.

جدول (7) يبين تركيز الأميغدالين في نوى بذور المشمش المرة عند الاستخلاص بالايثانول.

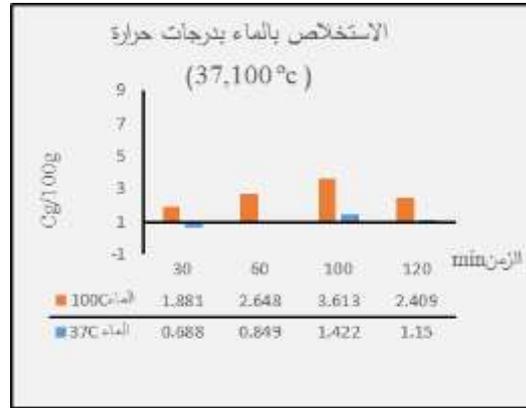
درجة الحرارة	زمن النقع (min)	Area (mAU)	Cexp (ppm)	\bar{C} exp (ppm)	C* g/100g	C** g/100g	SD	RSD%	CL(P=0.95) CL= $\bar{X} \pm t \frac{SD}{\sqrt{n}}$
37°C	30	7490190	8736.311	8738.067	0.873	0.436	3.52	0.040	8738.067±10.74
		7495187	8742.122						
		7489723	8735.768						
	60	9643040	11239.591	11237.669	1.123	0.561	3.16	0.028	11237.669±9.64
		9638247	11234.017						
		9642877	11239.401						
	100	14339704	16700.751	16697.52	1.669	0.834	4.62	0.027	16697.52±14.1
		14338698	16699.581						
		14332376	16692.229						
	120	11882060	13843.065	13839.944	1.383	0.691	4.19	0.030	13839.944±12.79
		11880785	13841.582						
		11875283	13835.185						
78.5°C	30	49017883	57023.644	57026.749	5.702	2.851	2.92	0.005	57026.749±8.91
		49019143	57025.109						
		49024636	57031.496						
	60	52504670	61077.99	61073.464	6.107	3.053	5.44	0.008	61073.464±16.6
		52502074	61074.971						
		52495587	61067.429						
	100	67484446	78496.088	78497.105	7.849	3.924	3.95	0.005	78497.105±12.05
		67489074	78501.496						
		67482443	75493.759						
	120	54703484	63634.714	63630.023	6.363	3.181	3.4	0.005	63630.023±10.38
		54701992	63632.979						
		54692871	63622.374						

1- من الجدول (6) الذي يعطي محتوى الأميغدالين في نوى بذور المشمش المرة عند الاستخلاص بالماء المقطر نجد أنه:
 ❖ عند درجة الحرارة 37 °C ، ازداد المردود مع مرور الزمن ووصل الى أعلى قيمة عند 100 min وكانت (1.422g/100g)، لكن بعد مرور 100 min كان المردود أقل ووصل إلى (1.15g/100g)، ويعود ذلك ربما الى حدوث التحلل المائي للأميغدالين ، حيث تؤدي الزيادة في مدة النقع بدرجات حرارة منخفضة إلى زيادة النشاط الأنزيمي [21].
 ❖ عند درجة الحرارة 100 °C ، ومدة نقع 100 min وصل المردود الى (3.613g/100g) وهو كما هو مبين في الجدول أعلى منه عند درجة حرارة 37 °C ، يمكن أن تكون هذه الزيادة ناتجة عن تعطيل الإنزيمات عند درجة حرارة الغليان مما يمنع التحلل المائي للأميغدالين ويؤدي لزيادة كفاءة الاستخلاص [21].

- ❖ عند درجة الحرارة 100°C ومدة نقع أعلى من 100 min انخفض المردود حيث وصل التركيز الى $(2.409\text{g}/100\text{g})$ على الرغم من عدم وجود تحلل أنزيمي في درجات الحرارة العالية، ويفسر هذا بأن الأميغدالين قد تحول الي أحد مماكبته نيو أميغدالين في درجات الحرارة العالية [22].
- 2- من الجدول (7) الذي يعطي محتوى نوى بذور المشمش المرة من الأميغدالين عند الاستخلاص بالإيثانول نجد أنه:
- ❖ عند درجة الحرارة 37°C ، ازيد المردود مع مرور الزمن حيث وصل التركيز الى أعلى قيمة عند 100 min وكانت $(1.669\text{g}/100\text{g})$ ، لكن بعد مرور 100 min كان المردود أقل ووصل إلى $(1.383\text{g}/100\text{g})$ ،
- ❖ عند درجة الحرارة 78.5°C ، ومدة نقع 100 min تم الحصول على أعلى مردود للأميغدالين وبلغ التركيز $(7.849\text{g}/100\text{g})$ وهي أعلى من تلك التي لوحظت عند مدة نقع 100 min عند الاستخلاص بالماء المغلي $(3.613\text{g}/100\text{g})$ وبالماء عند درجة حرارة 37°C $(1.422\text{g}/100\text{g})$ ، وبالإيثانول عند درجة حرارة 37°C $(1.669\text{g}/100\text{g})$.
- ❖ مردود الأميغدالين عند الاستخلاص بالإيثانول عند درجة الحرارة 37°C لمدة 100 min كان أعلى من المردود بالاستخلاص بالماء عند الدرجة 37°C لمدة 100 min وأقل من الاستخلاص بالماء عند الدرجة 100°C لمدة 100 min ويمكن أن يكون الانخفاض في المردود بالاستخلاص بالإيثانول عند الدرجة 37°C لمدة 100 min عند المقارنة بالماء عند الدرجة 100°C والإيثانول عند الدرجة 78.5°C نتيجة لانخفاض ذوبانية الأميغدالين في الإيثانول بدرجات حرارة منخفضة ، لذلك يعتبر الاستخلاص بالإيثانول عند درجة حرارة 78.5°C ومدة نقع 100 min أفضل طريقة لاستخلاص أكبر كمية ممكنة من الأميغدالين من البذور.
- في الشكل (7) و(8): يظهر تركيز الأميغدالين في نوى بذور المشمش المرة الناتج عن الاستخلاص بالماء والإيثانول عند درجات الحرارة وأزمنة النقع مختلفة.



الشكل(8): تركيز الأميغدالين في نوى بذور المشمش المرة عند الاستخلاص بالإيثانول بتابعية الزمن.



الشكل (7): تركيز الأميغدالين في نوى بذور المشمش المرة عند الاستخلاص بالماء بتابعية الزمن.

في الجدول (8) والجدول (9) يظهر محتوى الأميغدالين في اللوز المر والحلو عند الاستخلاص بالماء المقطر والإيثانول على التوالي.

جدول(8): تركيز الأميغدالين في بذور اللوز المر والحلو المستخلصة بالماء المقطر

نوع العينة	Area(mAU)	ĀArea(mAU)	Cexp(ppm)	Ĉexp(ppm)	Cg/100g	SD	RSD%	CL(P=0.95)
المشمش المر	31051562	31045326	36132.868	36136.082	3.613	5.47	0.015137225	36136.082±16.69
	31059378		36141.956					
	31052038		36134.584					
لوز المر	11395499	11397409	13277.304	13279.525	1.327	2.42	0.018223543	13279.525±7.39
	11399625		13282.102					
	11397103		13279.169					
لوز حلو	2139780	2141619	2514.992	2517.131	0.251	2.27	0.090182037	2517.131±6.93
	2143662		2519.506					
	2141415		2516.894					

نوع العينة	Area(mAU)	ĀArea(mAU)	Cexp(ppm)	Ĉexp(ppm)	Cg/100g	SD	RSD%	CL(P=0.95)
المشمش المر	31051562	31045326	36132.868	36136.082	3.613	5.47	0.015137225	36136.082±16.69
	31059378		36141.956					
	31052038		36134.584					
لوز المر	11395499	11397409	13277.304	13279.525	1.327	2.42	0.018223543	13279.525±7.39
	11399625		13282.102					
	11397103		13279.169					
لوز حلو	2139780	2141619	2514.992	2517.131	0.251	2.27	0.090182037	2517.131±6.93
	2143662		2519.506					
	2141415		2516.894					

الجدول (9): تركيز الأميغدالين في بذور اللوز المر والحلو المستخلصة بالايثانول.

نوع العينة	Area (mAU)	Cexp (ppm)	Ĉexp (ppm)	C* g/100g	C** g/100g	SD	RSD%	CL(P=0.95) * CL = $\bar{X} \pm t SD / \sqrt{n}$
لوز المر	52345406	60892.802	60895.061	6.089	3.044	2.34	0.003842676	60895.061±7.14
	52349421	60897.471						
	52347220	60894.911						
لوز حلو	19660529	22887.668	22890.511	2.289	1.144	3.1	0.01354273	22890.511±9.46
	19665821	22893.822						
	19662572	22890.044						

- نلاحظ من الجدول (8) الذي يبين محتوى الأميغدالين في اللوز المر والحلو عند الاستخلاص بالماء المقطر: عند درجة الحرارة 100 °C و زمن نقع 100 min، تبين أن محتوى الأميغدالين في نوى بذور اللوز المر أعلى بكثير من نوى بذور اللوز الحلو حيث بلغ (1.327g/100g) و(0.251g/100g) على التوالي.
- من الجدول (9) الذي يبين محتوى الأميغدالين في اللوز المر والحلو عند الاستخلاص بالايثانول نجد أنه: عند درجة الحرارة 78.5 °C و زمن نقع 100 min كان محتوى الأميغدالين في نوى بذور اللوز المر أعلى من الحلو وبلغ (6.089g/100g).

في الشكل (9) يتم عرض مقارنة بين محتوى الأميغدالين في عينات اللوز الحلو والمر عند الاستخلاص بالماء المقطر والايثانول.



الشكل (9): مقارنة بين محتوى الأميغدالين في عينات اللوز الحلو والمر عند الاستخلاص بالماء والايثانول.

وبالمقارنة مع دراسات مرجعية كانت النتائج متقاربة نوعاً ما مع اختلاف يعود لظروف المناخ والتربة التي نمت بها أشجار اللوز ففي تركيا كان مردور الأميغدالين المستخلص بالميتانول في اللوز المر (4.41-6.35 g/100g) وفي اللوز الحلو (0.6-1 g/100g) [23].

وفي دراسة أخرى كان مردور الأميغدالين في اللوز المر المستخلص بالماء (6.8 g/100g) و المستخلص بالايثانول (11.9 g/100g) [21].

الاستنتاجات والتوصيات:

الاستنتاجات:

- 1- من الناحية العملية تمكن هذه الدراسة من المفاضلة بين البذور واختيار المصدر الأغنى بالاميغدالين حيث تبين ان محتوى بذور المشمش المرة هو الأكبر يليها اللوز المر ثم اللوز الحلو.
- 2- مدة النقع لنوى البذور في المحل تلعب الدور مهماً في زيادة المردود.
- 3- استخلاص الاميغدالين من البذور عند درجات الحرارة المرتفعة حقق أعلى مردود حيث لا يحدث تحلل للاميغدالين بفعل الأنشطة الانزيمية على عكس الاستخلاص عند درجات الحرارة المنخفضة دون الـ 45 °C.
- 4- حقق استخدام الايثانول كمحل مردود أعلى في استخلاص الأميغدالين وصل إلى ثلاثة اضعاف ما هو عليه في الاستخلاص بالماء المقطر.

التوصيات:

- 1- تشجيع التوجه نحو العلاج الطبيعي واستخدام المنتجات الطبيعية والمكملات الغذائية الطبيعية كبديل عن المنتجات الكيميائية وتحت اشراف المختصين لا العامة من الناس.
- 2- التوجه الى انتاج المكملات الغذائية الوظيفية من الموارد الطبيعية المتوفرة بكثرة وتوطين صناعتها ومنها المكملات الغذائية من اللوزيات الوردية ومنها الأميغدالين.

References:

- 1) Cortés, V., Talens, P., Barat, J. and Lerma-García, M., 2018. Potential of NIR spectroscopy to predict amygdalin content established by HPLC in intact almonds and classification based on almond bitterness. *Food Control*, 91, pp.68-75 .
- 2) Dimitrov M, Iliev I, Bardarov K, Georgieva D, Todorova T. Phytochemical characterization and biological activity of apricot kernels' extract in yeast-cell based tests and hepatocellular and colorectal carcinoma cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*. 2021;279:114333.
- 3) Wu H, Cao C, Zhou C. Analysis of bioactive triterpenes in *Eriobotrya japonica* Lindl. By high-performance liquid chromatography. *Journal of Food and Drug Analysis*.2017;28(20):8827_8831.
- 4) Karsavuran N, Charehsaz M, Celik H, Asma B, Yakıncı C, Aydın A. Amygdalin in bitter and sweet seeds of apricots. *Toxicological & Environmental Chemistry*. 2014;96(10):1564-1570.
- 5) Srivastava N. Vitamin B17 and its Proposed Application in Treating Cancer. *Interdisciplinary journal of contemporary research [Internet]*. 2017 [cited 7 August 2022];3(6):109_1122.Available from: <https://www.researchgate.net/publication/320869871>.
- 6) Jaszczak-Wilke E, Polkowska Ż, Koprowski M, Owsianik K, Mitchell A, Bałczewski P. Amygdalin: Toxicity, Anticancer Activity and Analytical Procedures for Its Determination in Plant Seeds. *Molecules*. 2021;26(8):2253.
- 7) Chang H, Shin M, Yang H, Lee J, Kim Y, Lee M et al. Amygdalin Induces Apoptosis through Regulation of Bax and Bcl-2 Expressions in Human DU145 and LNCaP Prostate Cancer Cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2006;29(8):1597-1602.
- 8) Yildirim A, Akinci-Yildirim F, Polat M, Şan B, Sesli Y. Amygdalin Content in Kernels of Several Almond Cultivars Grown in Turkey. *HortScience*. 2014;49(10):1268-1270.
- 9) Savic Ivan M, Stankovic Mihajlo Z. Development and validation of HPLC method for the determination of amygdalin in the plant extract of plum kernel. *Research journal of chemistry and environment*. 2012;16(4):80_86.
- 10) Radoičić A, Petronijević R, Andrić F, Tešić Ž, Milojković-Opsenica D. Development and validation of high-performance thin-layer chromatographic method for determination of amygdalin. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2017;40(5-6):297-303.
- 11) Gómez Castaño J, Amaya Salcedo J, Cardenas González O. Solid-to-liquid extraction and HPLC/UV determination of amygdalin of seeds of apple (*Malus pumila* Mill): Comparison between traditional-solvent and microwave methodologies. *Acta Agronómica*.2018;67(3):381-388.
- 12) Chaouali N, Gana I, Dorra A, Khelifi F, Nouioui A, Masri W et al. Potential Toxic Levels of Cyanide in Almonds (*Prunus amygdalus*), Apricot Kernels (*Prunus armeniaca*), and Almond Syrup. *ISRN Toxicology*. 2013;2013:1-6.
- 13) Blaheta R, Nelson K, Haferkamp A, Juengel E. Amygdalin, quackery or cure?. *Phytomedicine*. 2016;23(4):367-376.
- 14) their nature, occurrence and metabolic (17-Krebs E. nitrilosides (vitamin B Internet]. *AGRIS: International Information] 17-neoplastics vitamin B significance anti :System for the Agricultural Science and Technology*. 2022. Available from [search/search.do?recordID=US201302388335-ishttps://agris.fao.org/agr](https://agris.fao.org/agr)

- 15) Saleem M, Asif J, Asif M, Saleem U. Amygdalin from Apricot Kernels Induces Apoptosis and Causes Cell Cycle Arrest in Cancer Cells: An Updated Review. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2019;18(12):1650-1655.-
- 16) Qiang L., and Jin-ping, C. "Water extracting process for amygdalin in almond and its content determination" *Food Science*.2006 ;9:29 .
- 17) Merkoçi A, Fàbregas E, Alegret S. A Practical Approach to Potentiometric Biosensors Based on Consolidated Composites: Construction and Evaluation of a D-Amygdalin Biosensor. *The Chemical Educator*. 1999;4(4):137-140.
- 18) Mandeni C, Buelow L, Danielsson B. Determination of amygdalin and cyanide in industrial food samples using enzymic methods. *Chemischoer Informationsdienst*. 1984;15(15).
- 19) Cairns T, Froberg J, Gonzales S, Langham W, Stamp J, Howie J et al. Analytical chemistry of amygdalin. *Analytical Chemistry*. 1978;50(2):317-322.
- 20) Rauws A, Gramberg L, Olling M. Determination of amygdalin and its major metabolite prunasin in plasma and urine by high pressure liquid chromatography. *Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition*. 1982;4(6):172-175.
- 21) Bolarinwa I, Orfila C, Morgan M. Amygdalin content of seeds, kernels and food products commercially-available in the UK. *Food Chemistry*. 2014;152:133-139.
- 22) Koo J, Hwang E, Cho S, Lee J, Lee Y, Hong S. Quantitative determination of amygdalin epimers from armeniacaee semen by liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*.2005;814(1):69-73.
- 23) Yildirim F, Askin A. Variability of amygdalin content in seeds of sweet and bitter apricot cultivars in Turkey. *Journal of Biotechnology* Vol. 9(39), pp. 6522-6524.