تقدير محتوى عصير ثمار صنفين من الكرز الحلو من السكريات بتقانة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الاداء HPLC

الدكتورة نجاة جنود*

هنادي محمد شهيله**

□ الملخص □

تتناول هذه الدراسة استخدام تقنية التحليل الكروماتوغرافي السائلة فائقة الأداء HPLC على عصير ثمار صنفين من الكرز الحلو المزروعة محلياً في سورية، لتحديد محتواها من السكريات الأحادية (الغلوكوز و الفركتوز) والثنائية (السكروز)، مستخدمين العمودNH2 ،الكاشف RID (قرنية الانكسار)، واستخدم المحلول اسيتونتريل كطور متحرك (85%) Acetonitrile

تميزت هذه الطريقة بتفريق جيد للسكريات وسرعة في انجاز العمل.

أظهرت نتائج تحليل السكريات أن الغلوكوز والفركتوز هي السكريات الأكثر وجوداً في عصير الثمار اذ ساهما على التوالي بنسبة (29. 7 – 4.36) % من إجمالي محتوى السكر .

كلمات مفتاحية : الكرز الحلو –الصنف راينر – الصنف بينغ – التحليل الكروماتوغرافي – HPLC .

* أستاذ– قسم علم الحياة النباتية – كلية العلوم – جامعة اللاذقية – سورية.

**طالبة دراسات عليا (دكتوراه)– قسم علم الحياة النباتية – كلية العلوم – جامعة اللاذقية – سورية.

Determination of the sugar content of the juice of two sweet cherry varieties using high-performance liquid chromatography (HPLC) technology

□ ABSTRACT □

This study deals with the use of HPLC technology on the juice of two varieties of sweet cherries grown locally in Syria. To determine the content of monosaccharides (glucose and fructose) and disaccharides (sucrose), using the NH2 column, the RID reagent, and the acetonitrile reagent solution (85%), this method was characterized by good dispersal of sugars and speed In completing the work.

The results of the sugar analysis showed that glucose and fructose are among the sugars most abundant in fruit juice, as they respectively contributed (7.29 - 4.36)% of the total sugar content.

Key words: Sweet cherry, Riner cultivar, Ping cultivar ,chromatographic analysis - HPLC.

1- المقدمة

تطبق تقنية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء High Performance Liquid Chromatography (HPLC) على المواد الطبيعية غير الطيارة والتي تتأثر بالحرارة، يكون الطور الثابت فيها مكون من جزئيات دقيقة جداً قد يصل قطر الواحدة منها إلى 5 ميكرومتر، محشوة في عمود مغلق، نقوم بحقن كمية ، قليلة جداً من العينة المراد تحليلها في المحلول وتحت الضغط و بعد فصل المكونات يتم الكشف عنها في مخرج العمود بواسطة كاشف [1].

وفي الآونة الأخيرة استخدمت تقانة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء بشكل واسع، والتي ينجز بواسطتها العمل التحليلي في درجة الحرارة الاعتيادية، وتعد هذه التقانة من أفضل التقانات التحليلية لفصل وتحليل المركبات كونها تتم في دقائق وبكفاءة فصل ممتازة [2] و[3].

لقد تمّ استخدام هذه التقانة في مجالات عدة منها: الصناعات الغذائية (تحليل الأغذية) والتحاليل البيئية (تحليل المياه والتربة وغيرها) والصيدلية (تحليل وفصل الأدوية والعقاقير) وتحاليل الكيمياء الحيوية (السكريات والفيتامينات..) وتحليل وفصل المبيدات الحشرية [4]

وفي مجال تحليل الأغذية تعتبر تقنية الـ HPLC من أكثر التطبيقات استخداماً [5] وقد استخدمت هذه التقانة من قبل الكثير من الباحثين لتحليل وفصل مكونات عصير ثمار الكرز [6]

يعد الكرز الحلو نوعاً ذو أهمية اقتصادية كبيرة بسبب القيمة الغذائية والصحية لثماره، وتعتمد الأهمية الاقتصادية للكرز على ما يحتويه من المركبات الكيميائية التي تمثل مصدراً هاماً لمانعات التأكسد والمركبات الفينولية المسوؤلة عن العديد من النشاطات الحيوية [11-10-9-8-7].

هنالك في الوقت الحاضر اهتمام متزايد ببديل طبيعي مقابل كل ما يتم الحصول عليه من خلال التخليق الكيميائي للمواد الطبيعية ذات الخصائص المضادة للأكسدة [13-12]

حيث يفضل المستهلكون المكونات ذات الأصل الطبيعي والتي يمكن استخلاصها من النباتات والمنتجات الغذائية وغيرها من المصادر الطبيعية [14]

تعتبر السكريات من العناصر الغذائية الرئيسية ومكونات الطعم في عصائر الفاكهة والتي تساهم في المحتوى الصلب الرئيسي القابل للذوبان [15] وهي أيضاً تلعب أدواراً هامة في بنية ووظيفة النبات بأكمله وليس فقط مصدر للطاقة مختلفة [16-17]

أثناء معالجة وتخزين عصائر الفاكهة تظهر السكريات قابلية أقل للتغيرات مقارنة بالمكونات الأخرى مثل الأصباغ ومضادات الأكسدة [18] وهذا ما يجعل تحليل السكريات في عصائر الفاكهة مرغوباً.

توجد عدة طرق لتحليل السكريات وظهرت عدة أجيال من الأدوات لتحليل السكريات وبرزت من بينها تقنية الHPLC [18] نظراً لدقتها العالية وانتقائيتها التحليلية فهي يمكن أن توفر فصلاً كمياً سريعاً لعدد من المكونات في ذات الوقت [19]

وقد كشفت عديد من الأبحاث على محتوى السكريات في عصير ثمار الفاكهة باستخدام هذه التقنية [28]

2- أهمية البحث وأهدافه

انطلاقاً من الأهمية الطبية والاقتصادية لنبات الكرز وانتشاره بشكل واسع في سورية تستدعي دراسة هذا النوع وتسليط الضوء عليه.

يهدف البحث إلى تقدير محتوى عصير الكرز من السكريات كونه متوفر في بيئتنا الساحلية ولم تُنشر دراسات سابقة تتناول تحليل عصير ثمار الكرز في سورية.

3- مواد وطرائق البحث

تم إجراء البحث في مخابر قسم علم الحياة النباتية في كلية العلوم بجامعة تشرين ومخابر المعهد العالي للبحوث البيئية .

جمع النبات من بساتين كرز مختارة من موقع عين الوادي وبيرين ضمن محافظة اللاذقية ، يرتفع الأول 1200م عن سطح البحر والثاني بحدود 800م، و شملت الدراسة الصنف Riner و الصنف Bing حيث تم قطف 2كغ من الكرز عشوائياً عند النضج من مختلف الأشجار وتم استبعاد الثمار الفاسدة .

تم تنفيذ البحث في الفترة الواقعة ما بين كانون الأول 2021 وحزيران 2023.

طريقة العمل :

جمع العينات النباتية:

جمعت الثمار في حالة النضج الكامل وذات مظهر خارجي صحي في صيف 2021، وذلك من الموقعين المدروسين.

تمت تعبئة العينات المأخوذة بأكياس نايلون ملائمة محكمة الإغلاق ومن ثم سجلت عليها المعلومات اللازمة بعد ترقيمها ونقلت إلى المختبر وحفظت في الثلاجة على درجة حرارة (−20 مْ) لحين إجراء التحاليل اللازمة.

تحضير العينة :

تم تحليل السكريات (فركتوز، غلوكوز، سكروز) في عصير ثمار الكرز، باستخدام تقنية الفصل الكروماتوغرافي السائل عالي الأداء (HPLC) الشكل (1)، استند التحليل على الطريقة المعدلة لـ(2000) Melgarejo *et al.*، حيث تم أخذ 5 gr من عصير الثمار لتحليل السكريات من كل صنف، تم تثفيل العصير لمدة5 دقائق 1200 دورة/دقيقة باستخدام جهاز الطرد المركزي، ثم تم خلط العينات بشكل متجانس ، و تخزينها بالدرجة −20 درجة مئوية لحين التحليل، وعند التحليل تم ترشيح العصير باستخدام فلاتر خاصة ذات قطر 0,45 ميكرون ثم تم حقنها في جهاز HPLC.

الشروط الكروماتوغرافية :

تم اجراء التحليل HPLC على نظام Shimadzu المجهز بمضخة متدرجة رباعية LC−20 AT والحاقن الآلي SIL−20A تم الفصل على العمود نوع ($-NH_2$ 250×4.6 mm (5µm Teknokroma،الكاشف RID−10A (قرنية الانكسار)، واستخدم الطور المتدفق أسيتونتريل: ماء (15:85) وكان معدل التدفق 1ml / min وتم التحليل في المعهد العالي للبحوث البيئية− جامعة تشرين.

الشكل (1) جهاز الكروماتوغرافيا السائلة HPLC

4- النتائج والمناقشة:

تم تحليل السكريات الموجودة في عصير ثمار الكرز المأخوذة من مواقع الدراسة باستخدام تقنية الـ HPLC وتحديد تركيز السكريات من سكر العنب وسكر الفاكهة وسكر القصب وتم عرض النتائج التي حصلنا عليها في الجدول التالي:

الجدول (1): نتائج تحليل السكر في عصير ثمار الكرز باستخدام تقنية الـHPLC

العينة	فركتوز %	غلوكوز %	سكروز %
عين الوادي /A/Bing/	5.75	8.78	0.29
بيرين/B/Bing/	4.91	9.05	0.33
عين الوادي/C/Rainer/	4.35	7.29	0.12
بيرين/D/Rainer/	7.23	12.00	0.28

تركيز المحلول العياري: 0.4 %

يوضّح الجدول السابق أن السكر المهيمن في عصير ثمار الكرز هو سكر العنب (الغلوكوز) بينما سُجلت أقل قيمة لسكر القصب (السكروز).

وهذا متوافق مع النتائج التي تم الحصول عليها في دراسة تتضمن تحليل عصير ثمار الصنف بنغ في الولايات المتحدة الأمريكية (22).

وفي دراسة أخرى لتراكيز السكريات في عصائر أصناف متنوعة من الكرز التي فُصلت بتقانة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء وجد ارتفاع في تركيز سكر العنب والذي تراوحت قيمته بين (5.5،8.8) g، وسكر الفاكهة بين (6.4−4.4)g (Girard and Kopp., 1998) .

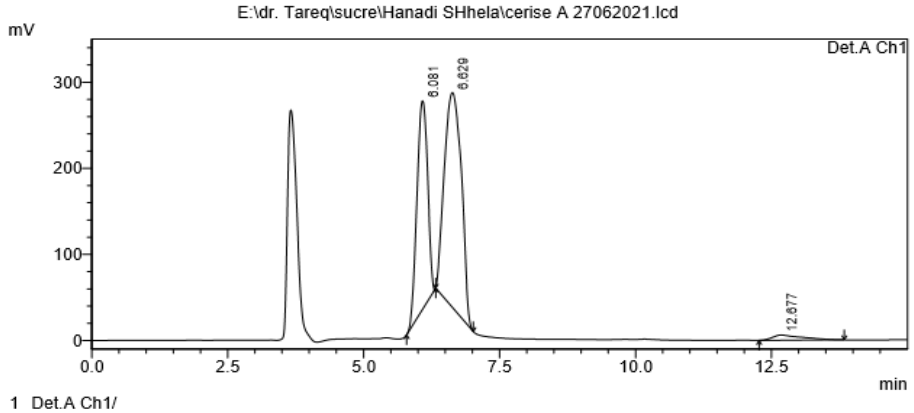
وقد أبلغ باحثون آخرون (Ma et al., 2014) في دراسة لهم عن نتائج مشابهة لنتائج دراستنا . تتفق نتائج دراستنا أيضاً فيما يتعلق بالسكريات التي تم فحصها مع تلك التي توصل إليها الباحثان Wrolstad & Schallenberger (1981) الذين ابلغوا عن قيم متوسطة لمجموعة كبيرة ومتنوعة من ثمار الكرز بلغت (7.78،7.09) g للغلوكوز والفركتوز على التوالي، وهذه النتائج أيضاً قابلة للمقارنة مع تلك النتائج التي حصل عليها. Wills *et al* (1987) للثمار الكرز الأسترالي.

في دراسات أخرى كانت نسبة السكروز منخفضة (0.64) g، في حين لم يتم اكتشاف السكروز في بعض أصناف الكرز .Wrolstad *et al* (1990).

تم اثبات طريقة HPLC لتكون طريقة مناسبة لفصل وقياس السكريات من فركتوز وغلوكوز وسكروز في وقت قصير و فصل جيد.

كانت نتائج تحليل العينات متفقة بشكل جيد مع تلك التي حصل عليها آخرون [28]

<Chromatogram>



1 Det.A Ch1/

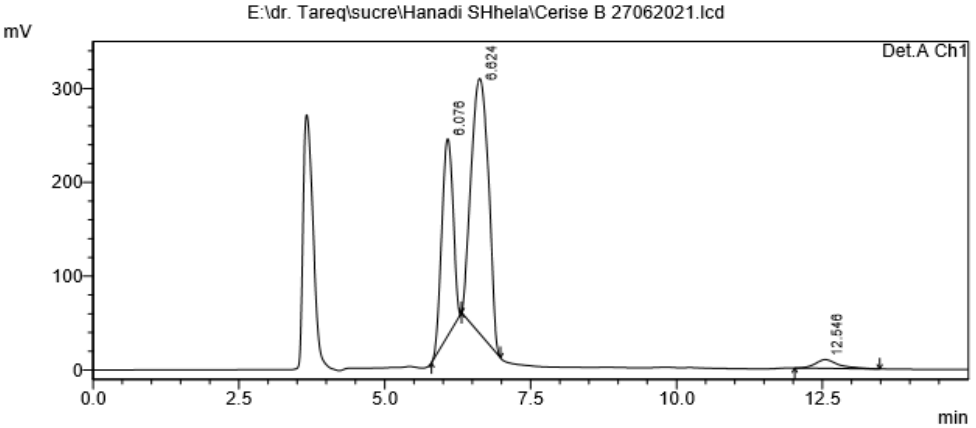
PeakTable

Detector A Ch1

Name	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Height
RT6.081	6.081	3318305	242483	0.223
RT6.629	6.629	5437901	249214	0.377
RT12.677	12.677	227480	5914	0.616
		8983686	497611	

الشكل (2): كروماتوغرام يبين فصل السكريات في العينة A.

<Chromatogram>



1 Det.A Ch1/

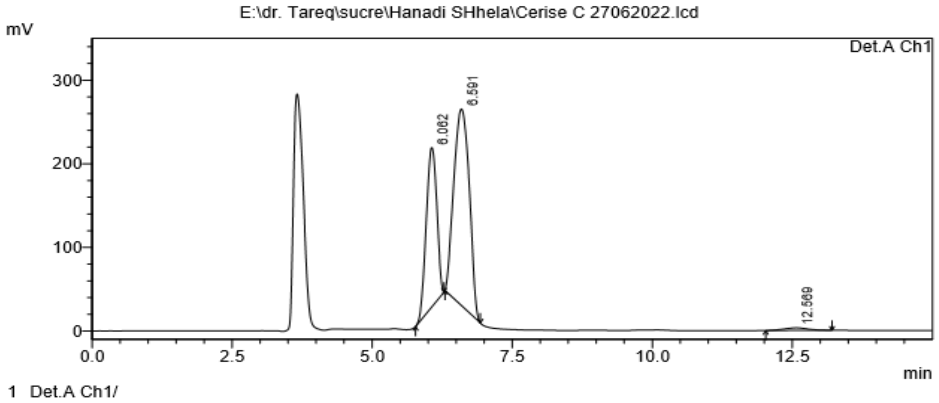
PeakTable

Detector A Ch1

Name	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Height
RT6.076	6.076	2836844	210160	0.220
RT6.624	6.624	5606941	271599	0.352
RT12.546	12.546	264254	9382	0.387
		8708040	491141	

الشكل (3): كروماتوغرام يبين فصل السكريات في العينة B.

<Chromatogram>



1 Det.A Ch1/

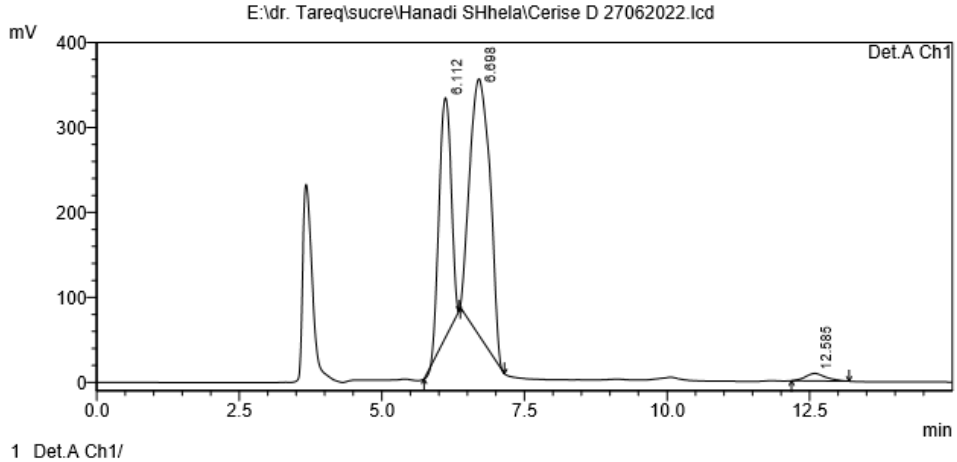
PeakTable

Detector A Ch1

Name	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Height
RT6.062	6.062	2510746	191013	0.213
RT6.591	6.591	4513323	234916	0.326
RT12.569	12.569	92812	3077	0.470
		7116881	429006	

الشكل (4): كروماتوغرام يبين فصل السكريات في العينة C.

<Chromatogram>



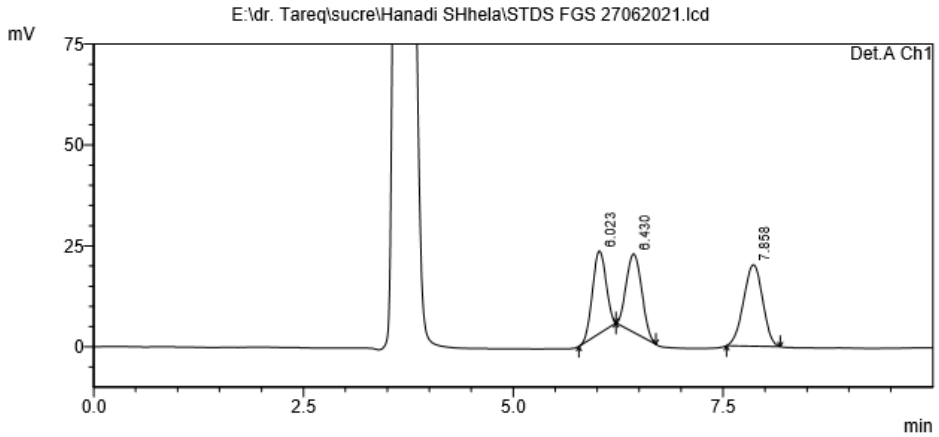
PeakTable

Detector A Ch1

Name	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Height
RT6.112	6.112	4174643	282872	0.244
RT6.698	6.698	7430444	301863	0.427
RT12.585	12.585	220872	8827	0.376
		11825960	593562	

الشكل (5): كروماتوغرام يبين فصل السكريات في العينة D.

<Chromatogram>



1 Det.A Ch1/

PeakTable

Detector A Ch1

Name	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Height
RT6.023	6.023	231017	20492	0.180
RT6.430	6.430	247787	19443	0.207
RT7.858	7.858	319141	20147	0.251
		797945	60083	

الشكل (6): كروماتوغرام يبين فصل السكريات في المحلول المعياري.

5-الإستنتاجات والتوصيات

1. إن تقنية الـ HPLC مناسبة لفصل وقياس السكريات بشكل دقيق وسريع وفي وقت واحد.
2. بينت الدراسة أن الغلوكوز هو السكر الأعلى نسبةً بينما للسكروز نسبة قليلة جداً.
3. اجراء دراسات معمقة على أصناف الكرز الحلو المختلفة المنتشرة في سورية.

6- المراجع

1-SMITH, I, 2013-Chromatography: Elsevier.

2-SNYDER, L.R,1968. In Modern Practice of Liquid Chromatography, Marcel Dekker, New York.

3- SKOOG, D. A, WEST, D. M, HOLLER, F. J, CROUCH, R. C, 1964. Analytical Chemistry an Introduction 7th , Harcourt College, Philadelphia.

4- HARVEY, D, 1982.Modern Analytical Chemistry, Depauw University, (578).

5- SUNDLE, I, MURKOVIC, M, BONDANIENE, D, WINKLHOFER, B ,M, 2007 .J. Clinical Nutrition, 26 (1), 145.

6- WESTPHAL, Y, SCHOIS, H, VORAGEN, A, GRUPPEN, H, 2010. Introducing porous graphitized carbon liquid chromatography with evaporative light scattering and mass spectrometry detection into cell wall oligosaccharide analysis. Journal of Chromatography .A, 1217(5), 689–695

7-KELEBEK, H and SELLI, S , 2011. Evaluation of chemical constituents and antioxidant activity of sweet cherry (Prunus avium L.) cultivars. International Journal of Food Sci Technol,46:2530 – 2537.

8-FAZZARI,M, FUKUMOTO, L, MAZZA,G, LIVREA, MA, TESORIERE, L and MARCO, D, 2008 .In vitro bioavailability of phenolic compounds from five cultivars of frozen . sweet cherries (Prunus avium L.). J Agric Food Chem, 56:3561–3568.

9-FERRETTI,G, BACCHETTI,T, BELLEGGIA,A, NERI, D, 2010. Cherry Antioxidants: From Farm to Table, Molecules,15, 6993-7005.

10-MOZAFFARI, J, JAMALI,H, KAVAND,A.R, SADEGhIAN, S.Y, BOUZARI, N, 2011. DNA fingerprinting of commercial cherry cultivars in Iran. Ministry of Jihad-eagriculture. Agricultural research and education organization, Seed and Plant Improvement Institute,Final report of project, 110.

11-RADICEVIC,S, NIKOLIC,D, CEROVIC,R, DORDEVIC,M, 2013.In vitro pollen germination and pollen grain morphology in some sweet cherry (Prunus avium L.) cultivars, Romanian Biotechnological Letter ,18, 8341- 8349.

12-DENG, G.F, LIN, X, XU, X.R, GAO, L.L, XIE, J.F, LI, H.B,2013. Antioxidant Capacities and Total Phenolic Contents of 56 Vegetables. Journal of Functional Foods, 5(1), 260–266.
13-CONTESSA, C, MEllANO, M.G, BECCARO, G.L, GIUSIANO, A, BOTTA, R, 2013.Total Antioxidant Capacity and Total Phenolic and Anthocyanin Contents in Fruit Species Grown in Northwest Italy. Scientia Horticulturae, 160, 351–357.

14-EGEA, I, SANCHEZ-BEL, P, ROMOJARO, F, PRETEL, M.T,2010. Six Edible Wild Fruits as Potential Antioxidant Additives or Nutritional Supplements. Plant Foods for Human Nutrition, 65(2), 121–129.

15-BUNCH, B, FINDLAY, R. M , 1984. Export stonefruit tree survey - progress report. The orchardist of New Zealand. 57: 205-.209

16- BROCARD, I. M, LYNCH, T. J, FINKElSTEIN, R. R,2002 . Regulation and role of the Arabidopsis abscisic acid-insensitive 5 gene in abscisic acid, sugar, and stress response. Plant Physiology, 129(4), 1533–1543.

17-CHENG, W. H, ENDO, A, ZHOU, L, PENNEY, J, CHEN, H. C,ARROYO, A, 2002. A unique short-chain dehydrogenase/reductase in Arabidopsis glucose signaling and

abscisic acid biosynthesis and functions. Plant Cell, 14(11), 2723-2743.

18-BROKL, M, HERNANDEZ, O, SORIA, A. C, SANZ, M. L,2011. Evaluation of different operation modes of high performance liquid chromatography for the analysis of complex mixtures of neutral oligosaccharides. Journal of Chromatography A, 1218, 7697–7703.

19- GOTO, T, KONDO, T,1991 . Structure and molecular stacking of anthocyanins - flower color variation. Angewandte Chemie International; English edition 30: 17-33.

20- KRISHNAN, H. B, PUEPPKE, S. G,1990. Cherry fruit invertase: partial purification, characterization and activity during fruit development. Journal of plant physiology, 135: 662-666.

21-MELGAREJO, P, SALAZAR, D.M, and ARTES,F, 2000. Organic acids and sugars composition of harvested pomegranate fruits. European Food Res. Technol, 211: 185–190.

22- GARDINER ,.A.M, BEYER, R. MELTON,D.L, 1993. Sugar and anthocyanidin content of two processing-grade sweet cherry cultivars and cherry products. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science. Vol. 21: 213-218.

23- GIRARD, B, KOPP, T. G, 1998.Physicochemical characteristics of selected sweet cherry cultivars. J. Agric. Food Chem, 46 , 471– 476.

24- MA, CH, SUN, Z, CHEN, C, ZHANG, L, ZHU, S, 2014. Simultaneous separation and determination of fructose, sorbitol, glucose and sucrose in fruits by HPLC–ELSD. Food Chemistry, 145, 784–788.

25- WROLSTAD, E, SCHALLENBERGER, R ,1981. Free sugars and sorbitol in fruits-a compilation from the literature. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 64: 91-103.

26- WIllS, R. B. H, LIM, J. K, GREENFIELD, H,1987. Composition of Australian foods. 40. Temperate fruits. Food technology in Australia ,39: 520521, 530.

27- Wrolstad, R. E, Skrede, G, Lea, P, Enersen, G, 1990. Influences of sugar on anthocyanin pigment stability in frozen strawberries. Journal of food science 55: 1064-1065.

28- USENIK, V, FABC, J, STAMPAR, F, 2008. Sugars, organic acids, phenolic composition and antioxidant activity of sweet cherry (Prunus avium L.). Food Chemistry, 107(1), 185–192.