Identification of a number of phenolic compounds in grape seed extract tablets by high-performance liquid chromatography

Dr. Dima Diab*
Dr. Nizar Issa**
Laith Mohammmed***

(Received 6 / 4 / 2024. Accepted 30 / 6 / 2024)

□ ABSTRACT □

Grape seed extract (GSE) is a dietary supplement made by removing, drying, and pulverizing the bitter-tasting seeds of grapes, Grape seeds are rich in antioxidants, including phenolic acids, anthocyanin's, flavonoids, and oligomeric proanthocyanidin complexes (OPCs), Due to its high antioxidant content, GSE can help prevent disease and protect against oxidative stress, tissue damage, and inflammation.

The importance of this research comes from the growing popularity and use of grape seed supplements globally, and the health benefits they provide by possessing antioxidant and anti-inflammatory activity, Therefore, this study aims to extract the phenolic compounds present in a locally marketed grape seed extract preparation and to determine the identity of a number of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography.

This study found that locally marketed grape seed extract is rich in many phenolic compounds, the most important of which are quercetin, caffeic, sinapic, catechin, and small concentrations of gallic and ferulic acid. Therefore, we recommend conducting a complete identification of phenolic compounds due to the presence of many important phenolic compounds that have not been identified.

Key words: Grape seed extract (GSE)**,** Phenolic compounds, High-performance liquid chromatography.

Copyright **:**Tishreen University journal-Syria, The authors retain the copyright under a CC BY-NC-SA 04

***Associate Professor - Faculty of Pharmacy, Analytical and Food Chemistry Department, Tishreen University, Lattakia, Syria. dimaaldyab@tishreen.edu.sy**
****Associate Professor - Faculty of Science, Biotechnology and Food, Damascus University, Damascus, Syria. nizarissa@ncbt.gov.sy**
*****Postgraduate Student (MSc) - Faculty of Pharmacy, Analytical and Food Chemistry Department, Tishreen University, Lattakia, Syria. laith.mohammed@tishreen.edu.sy**

تحديد هوية عدد من المركبات الفينولية في أقراص خلاصة بذور العنب بالكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء

د. ديمة دياب*

د. نزار عيسى**

ليث محمد***

(تاريخ الإيداع 6 / 4 / 2024. قبل للنشر في 30 / 6 / 2024)

□ ملخّص □

خلاصة بذور العنب (Greep Seeds Extract) مكمل غذائي يتم تصنيعه عن طريق إزالة بذور العنب ذات المذاق المر وتجفيفها وسحقها، بذور العنب غنية بمضادات الأكسدة، بما في ذلك الأحماض الفينولية، والأنتوسيانين، والفلافونوئيد، وأليغوميرات البروأنتوسيانيدين (Oligomeric proanthocyanidin complexes)، نظرًا لمحتواها العالي من مضادات الأكسدة، يمكن أن تساعد خلاصة بذور العنب في الوقاية من الأمراض والحماية من الإجهاد التأكسدي وتلف الأنسجة والالتهابات.

تأتي أهمية هذا البحث من الشعبية المتزايدة والاستخدام المتزايد لمكملات بذور العنب عالميا، والفوائد الصحية التي تقدمها بكونها تمتلك فعالية مضادة للأكسدة وفعالية مضادة للالتهابات، لذلك تهدف هذه الدراسة إلى استخلاص المركبات الفينولية المتواجدة في أحد مستحضرات خلاصة بذور العنب المسوقة محليا وتحديد هوية عدد من المركبات الفينولية بالكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء.

لقد توصلت هذه الدراسة إلى أن خلاصة بذور العنب المسوقة محلياً غنية بالعديد من المركبات الفينولية أهمها الكيرستين والكافييك والسينابيك والكانتشين وتراكيز قليلة من حمض الغاليك والفيروليك، لذلك نوصي بالقيام بإجراء تحديد كامل للمركبات الفينولية وذلك لوجود العديد من المركبات الفينولية الهامة التي لم يتم تحديدها.

الكلمات المفتاحية: خلاصة بذور العنب (GSE)، المركبات الفينولية، الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء.

حقوق النشر :مجلة جامعة تشرين- سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب الترخيص CC BY-NC-SA 04

* أستاذ مساعد، كلية الصيدلة، قسم الكيمياء التحليلية والغذائية، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية. dimaaldyab@tishreen.edu.sy

** أستاذ مساعد، كلية العلوم، التقانة الحيوية والغذائية، جامعة دمشق، دمشق، سورية. nizarissa@ncbt.gov.sy

*** طالب ماجستير، كلية الصيدلة، قسم الكيمياء التحليلية والغذائية، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية. laith.mohammed@tishreen.edu.sy

مقدمة:

خلاصة بذور العنب (Greep Seeds Extract) هو مكمل غذائي يتم تصنيعه عن طريق إزالة بذور العنب ذات المذاق المر وتجفيفها وسحقها[1].

في السنوات الأخيرة أصبحت خلاصة بذور العنب ذات شعبية متزايدة في السوق كمكملات غذائية وخاصة في استراليا وكوريا واليابان والولايات المتحدة[2]، وذلك بسبب غناها بالمركبات الفينولية[3]، وكونها تمتلك فوائد صحية كبيرة على صحة الإنسان على سبيل المثال دورها في الوقاية من القرحة الهضمية[4].

أشارت العديد من الدراسات إلى الخصائص المضادة للأكسدة للمركبات الفينولية والقدرة على التخلص من الجذور الحرة في حالات الشدة التأكسدية عن طريق مجموعة متنوعة من السموم أو المحفزات الفيزيولوجية[5]، كما أكدت العديد من الدراسات في المختبر(*in vetro*) وفي الجسم الحي(*in vivo*) على خصائصها المفيدة لصحة الإنسان، وبشكل خاص أثبتت مجموعة من التجارب السريرية بوضوح أن المركبات الفينولية تمتلك خصائص مضادة للأكسدة[6,7,8] ومضادة للالتهاب[9,10] ومضادة للحساسية[11] وتأثيرات مضادة للتخثر[12,13]، كذلك تقدم حماية قوية ضد أمراض القلب والأوعية الدموية[14]، واعتلال المفاصل[15]، واعتلال الأعصاب[16]، ومرض السكري[17]، كما تتميز بامتلاكها فعالية مضادة للجراثيم[18,19]، ويرتبط التأثير المضاد للالتهاب للمركبات الفينولية بقوة بقدرتها على تثبيط إطلاق حمض الأراشيدونيك المسؤول عن تحفيز تكوين الليكوترين والبروستاغلاندين، وبالمثل فإن آثارها المضادة للأكسدة ترجع إلى قدرتها على تحييد الجذور الحرة ولعب دور فعال في مخلبة المعادن الثقيلة، مما يفيد بشكل مباشر جهاز المناعة والتحكم في دورة الخلية[20].

المركبات الفينولية المتواجدة في بذور العنب تنقسم إلى مجموعتين رئيسيتين هما الحموض الفينولية و الفلافونوئيدات، إن الحموض الفينولية الأكثر شيوعاً هي المشتقة من حمض البنزوئيك وأهمها حمض الغاليك – حمض البنزوئيك – حمض الفانيلين – حمض الجينستيك – حمض السالسيلك – حمض البروتوكاتشيك، وحموض السينامك وأهمها حمض الفيروليك – حمض الكافئيك –حمض الكوماريك – حمض الكلوروجينك – حمض السيناييك[21].

أما بالنسبة للفلافونوئيدات وهي الأشيع لدينا مركبات الفلافان 3– ول وأهمها الكاتشين والإيبي كاتشين والأليغوميرات والبوليمرات (البروأنتوسيانيدين) ومركبات الفلافانول الملونة وأهمها الكيرستين والأنتوسيانين، إضافة إلى الستلبينات وأهمها الريسفيراتول[22] .

أهمية البحث وأهدافه:

تأتي أهمية هذا البحث من الشعبية المتزايدة والاستخدام المتزايد لمكملات بذور العنب عالميا، والفوائد الصحية التي تقدمها بكونها تمتلك فعالية مضادة للأكسدة وفعالية مضادة للالتهاب، إضافة إلى أدوارها الأخرى المضادة للحساسية، والحماية من الأمراض القلبية وأمراض الأوعية الدموية والسكري، والوقاية من القرحة الهضمية، وكذلك تزايد الأبحاث والدراسات المنشورة في السنوات الأخيرة المتعلقة بمكملات خلاصة بذور العنب، إضافة إلى كون خلاصة بذور العنب أهم المصادر المعروفة لمركبات البروأنتوسيانيدين.

أما الهدف من هذه الدراسة هو تقييم جودة أحد مستحضرات خلاصة بذور العنب المسوق محلياً وذلك باستخلاص المركبات الفينولية وتحديد هوية عدد من المركبات الفينولية بالكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء.

طرائق البحث ومواده:

الأجهزة والمواد المستخدمة:

يوضح كل من الجدول (1) والجدول (2) مجموعة الأجهزة والأدوات الموجودة في مخابر التقانة الحيوية جامعة دمشق والتي استخدمت في هذه الدراسة على التتالي كما يوضح الجدول رقم (3) المواد والمذيبات المستخدمة:

الجدول(1): الأجهزة المستخدمة في الدراسة

الجهاز المستخدم	الطراز
ميزان ذو حساسية 0,00019	Precisa 205A
جهاز الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC العمود المستخدم المكشاف	Yl9100 plus + HPLC system InertSustain C18 (5µm, 4.6x150mm) Yl9160 PDA Detector
ميكروبيبيتMicropipette	Labkit (chemelexm, S.A.spain)
حمام مائي Water bath	Memmert

الجدول(2): الأدوات المستخدمة في الدراسة

الأدوات المستخدمة	سعة الأداة (مل)
بيشر Beaker	250
دورق مخبري Laboratory flask	100
أسطوانة مدّرجة Graduated cylinder	50
قمع ترشيح Fillration funnel	-
أنابيب اختبار Test tubes	10
مراشح بقطر 0.45 ميكرون Filtter	-

الجدول(3): المواد والمذيبات المستخدمة في الدراسة

المادة	الشركة
حمض الغاليكGallic Acid	SIGMA ALDRICH
حمض الكافييكCaffeic Acid	SIGMA ALDRICH
حمض السينابيكSinapic Acid	SIGMA ALDRICH
الكاتشينCatechin(+)	SIGMA ALDRICH
حمض الفيروليكTrans Ferulic	SIGMA ALDRICH
الكرسيتينQuercetin	SIGMA ALDRICH
أسيتونيتريلAcetonitrile	Honeywell, Riedel-de Haen
حمض الخل Acetic Acid	CARLROTH
ميتانول Methanol	CARLROTH

طرائق البحث:

1. المحاليل المستخدمة في تحديد هوية عدد من المركبات الفينولية في أقراص خلاصة بذور العنب بالكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC

❖ حمض الخل المنحل بالماء ذو التركيز% 0.05 : نأخذ حجم 50 ميكرولتر من حمض الخل المطلق ثم نقوم بتمديده بالماء المقطر في أسطوانة مدرجة سعة 100 مل حتى خط العيار.

❖ المحاليل العيارية الخاصة بالمركبات الفينولية بتركيز 0.5 ملغ/ مل: جرى تحضير هذه المحاليل بأخذ وزنة مقدارها 0.5 ملغ وحلها في 1 مل ميتانول 80%.

قمنا بإمرار هذه المحاليل على مراشح بقطر 0.45 ميكرون قبل إدخالها إلى جهازHPLC ، المحاليل العيارية التي جرى تحضيرها حمض الغاليك، الكاتشين، حمض الكافييك، حمض السينابيك، حمض الفيروليك، الكيرستين.

2. تحديد هوية عدد من المركبات الفينولية في أقراص خلاصة بذور العنب باستخدام الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC

جرى بدايةً تحضير العينة وذلك بطحن المضغوطة في هاون، ثم نقوم بعملية استخلاص للمركبات الفينولية وذلك باستخدام الميتانول 80%[23]، حيث نقوم بإضافة 3 مل إلى مسحوق المضغوطة في بيشر ثم نقوم بعملية الرج لمدة دقيقتين، وبعدها نقوم بعملية الترشيح باستخدام ورقة ترشيح، نقوم بتكرار العملية السابقة 3 مرات ونقوم بجمع الخلاصة الميتانولية ثم نقوم بتبخيرها في حمام مائي عند الدرجة 65 م لمدة 5 دقائق، ثم يجري إمرار العينة على مراشح بقطر0.45 ميكرون قبل الحقن بجهاز الHPLC، وفق شروط الفصل التالية [24].

- الطور المحرك:

A حمض الخل المنحل بالماء (0.05%)

B الأسيتونتريل

- نمط التدفق:

	Time	A	B
1	0- 0,10	92%	8%
2	0,10- 2	90%	10%
3	2- 27	70%	30%
4	27- 37	44%	56%
5	37- 37,10	92%	8%
6	37,10- 45	92%	8%

- حجم الحقنة 10 µl
- معدل التدفق 1mL/min عند 30 م
- قياس الامتصاص للمحاليل العيارية وعينة خلاصة بذور العنب عند جميع الأطوال الموجية التالية:

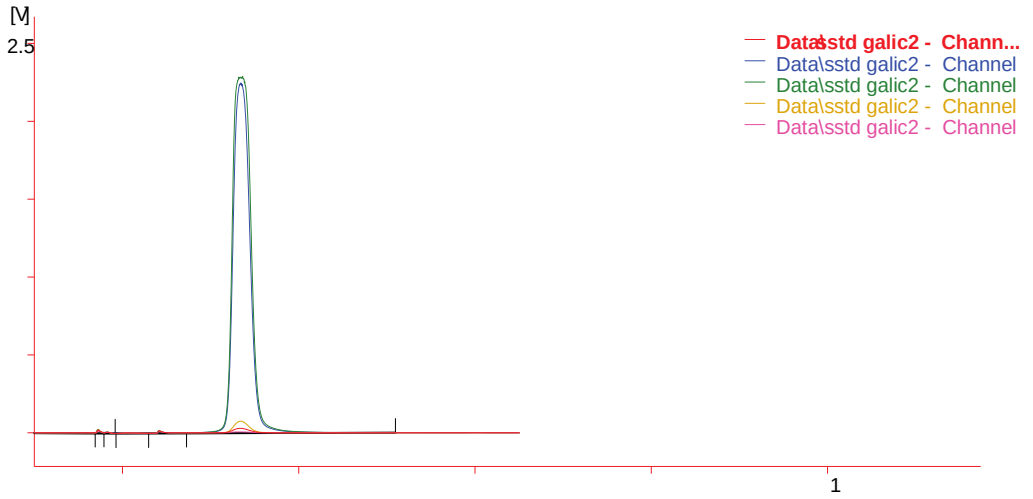
(nm) 256 –280 –324 –330 –365

- يتم تحديد هوية المركبات الفينولية في العينة وذلك بالمقارنة مع أزمنة الاحتفاظ للمحاليل العيارية

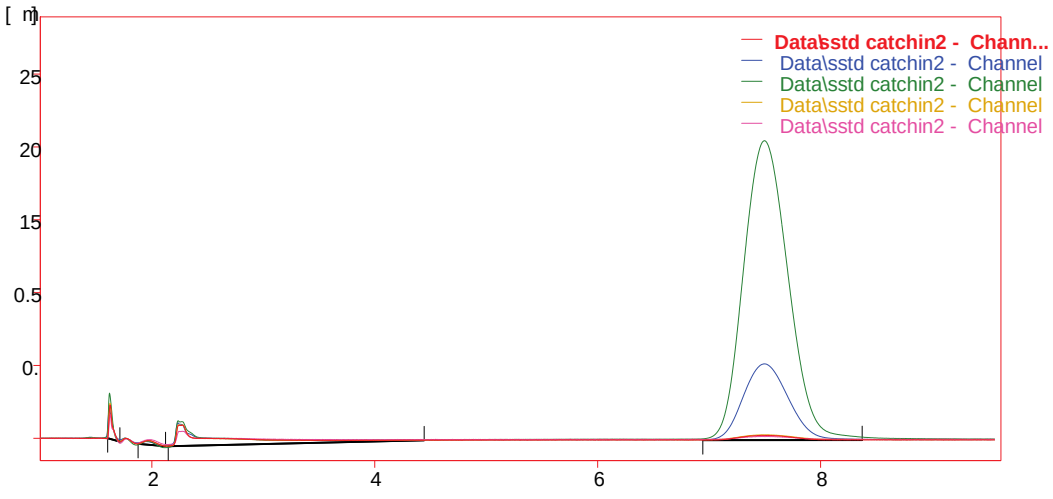
النتائج والمناقشة:

تحديد هوية عدد من المركبات الفينولية في أقراص خلاصة بذور العنب باستخدام الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC

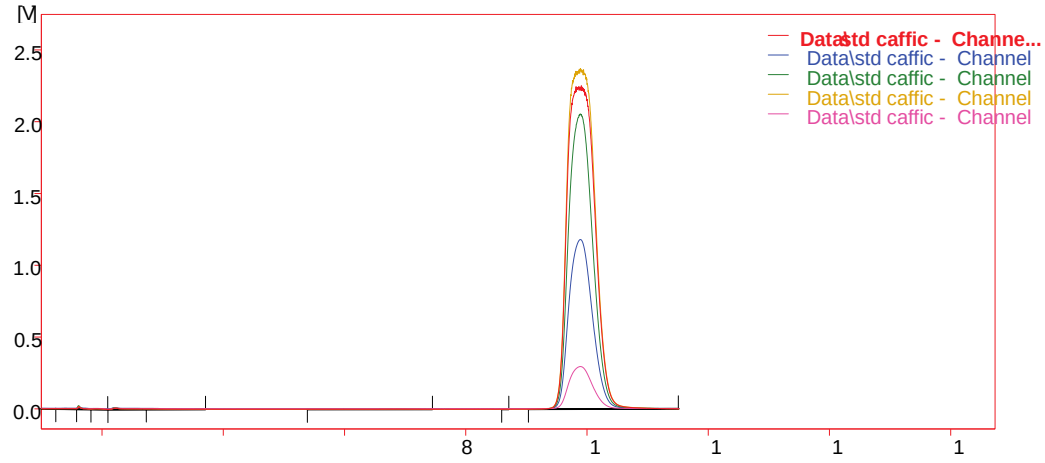
الكروماتوغرام الخاص بالمحاليل العيارية عند الأطوال الموجية: 256 (اللون الأزرق)، 280 (اللون الأخضر)، 324 (اللون الأصفر)، 330 (اللون الأحمر)، 365 (اللون البنفسجي)



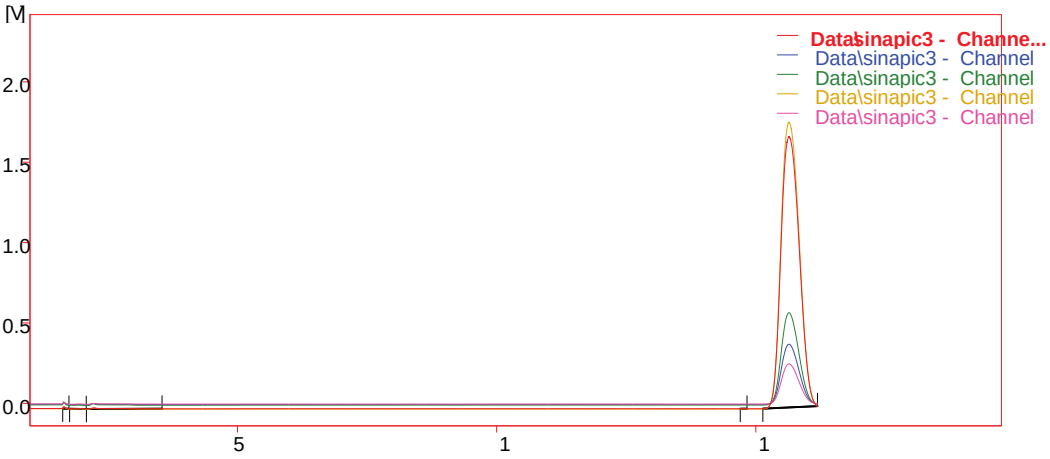
الشكل(1): الكروماتوغرام الخاص بالمحلول العياري حمض الغاليك



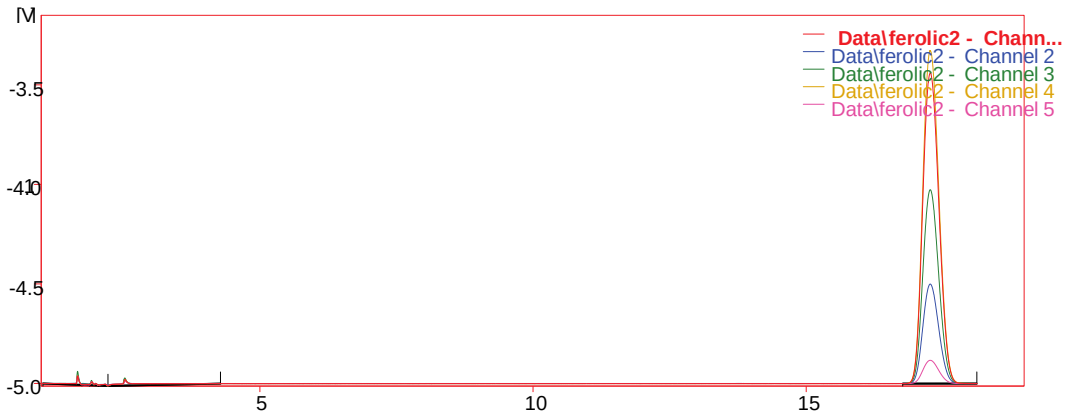
الشكل(2): الكروماتوغرام الخاص بالمحلول العياري الكاتشين



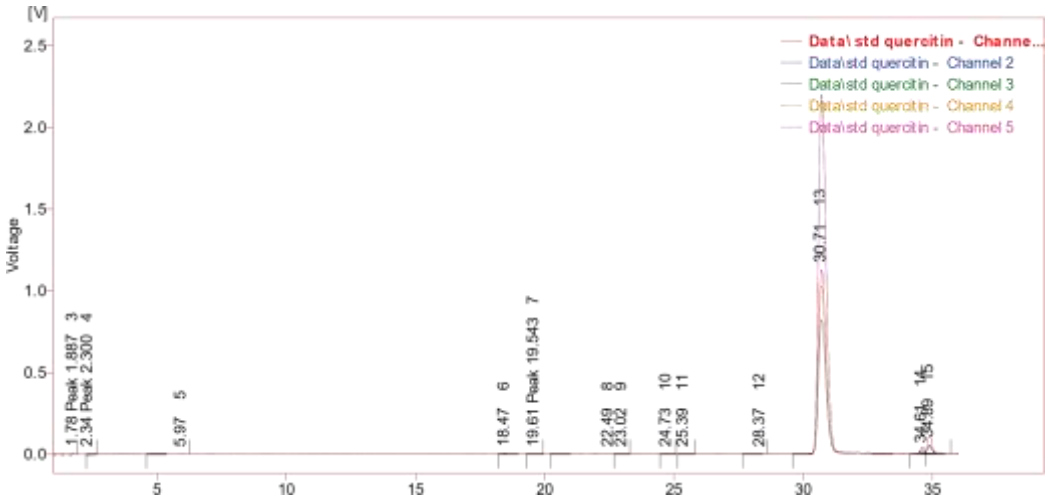
الشكل(3): الكروماتوغرام الخاص بالمحلول العياري حمض الكافييك



الشكل(4): الكروماتوغرام الخاص بالمحلول العياري حمض السينابيك

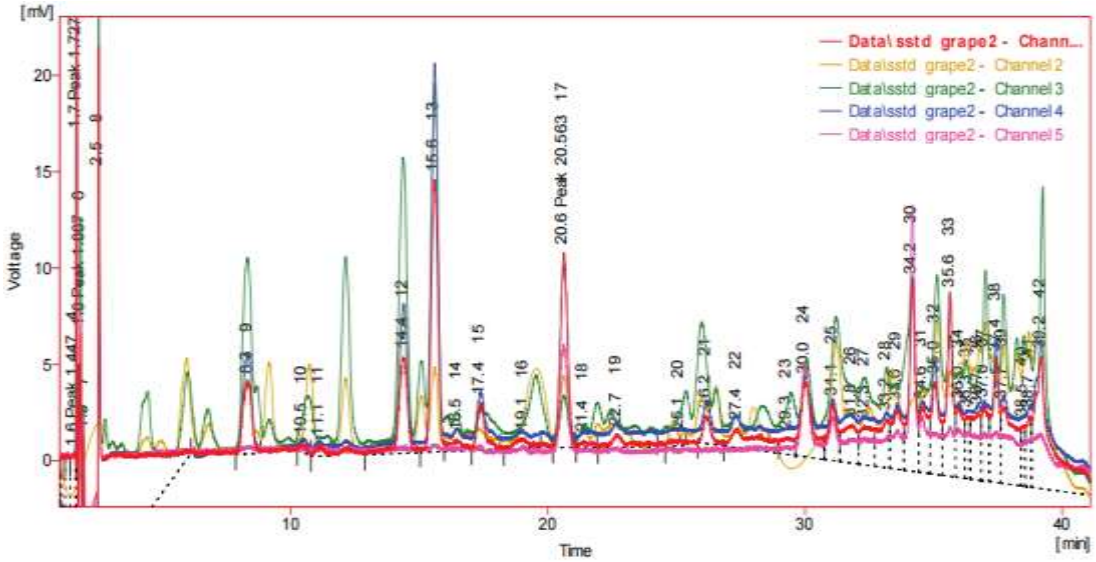


الشكل(5): الكروماتوغرام الخاص بالمحلول العياري حمض الفيروليك



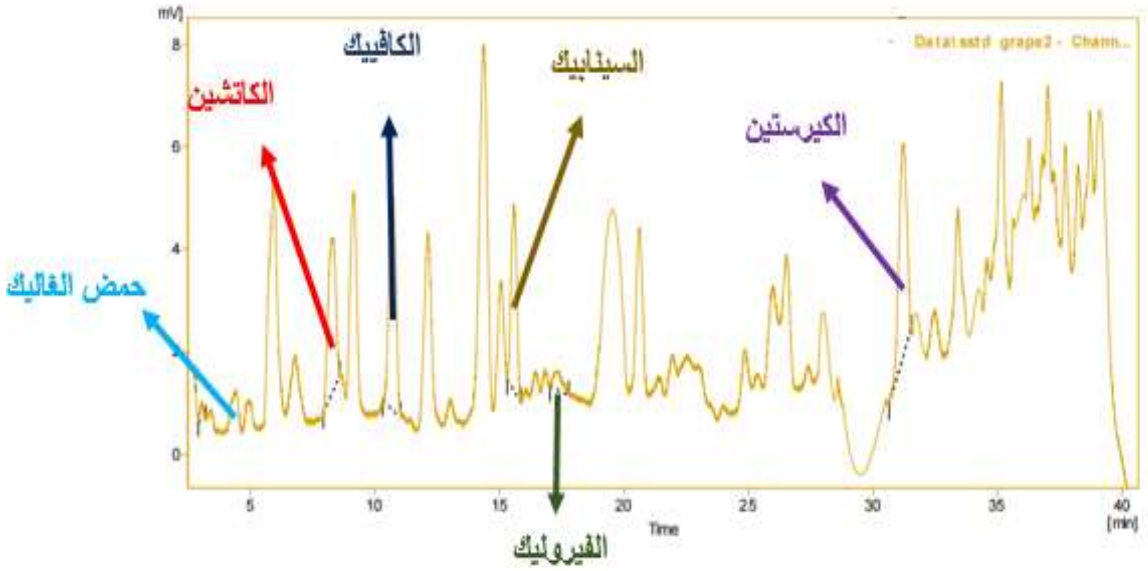
الشكل (6): الكروماتوغرام الخاص بالمحلول العياري الكيرستين

الكروماتوغرام الخاص بعينة خلاصة بذور العنب عند جميع الأطوال الموجية المذكورة :



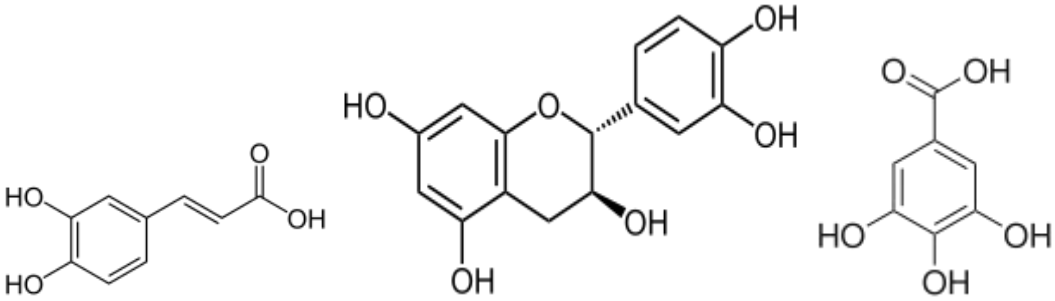
الشكل (7): الكروماتوغرام الخاص بعينة خلاصة بذور العنب عند جميع الأطوال الموجية

يظهر في الشكل التالي كروماتوغرام لعينة أقراص بذور العنب عند طول الموجة 324 nm وبعد مقارنة أزمة الاحتفاظ الخاصة بالمحاليل العيارية مع كروماتوغرام العينة جرى تحديد هوية عدد من المركبات الفينولية وهي حمض الغاليك، الكاتشين، الكافييك، السينابيك، الفيروليك والكيرستين والتي تمتلك الصيغ الكيميائية الموضحة بالشكل:

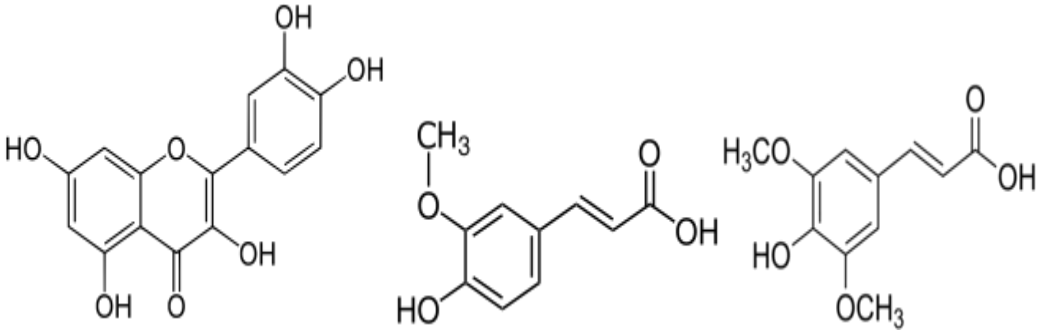


الشكل (8): الكروماتوغرام الخاص بعينة خلاصة بذور العنب عند طول الموجة 324 nm محدد عليه هوية عدد من المركبات الفينولية

الصيغ الكيميائية للمركبات الفينولية التي جرى تحديدها :



الشكل (8): حمض الغاليك **الشكل (9): الكاتشين** **الشكل (10): حمض الكافييك**



الشكل (11): حمض السينابيك **الشكل (12): حمض الفيروليك** **الشكل (13): الكيرستين**

إن العمود المستخدم في الفصل هو عمود C18 وبالتالي فإن الطور الثابت ذو طبيعة غير قطبية، بينما الطور المتحرك كان مزيج من الأسيتونتريل وحمض الخل المنحل في الماء وبالتالي فإن الطور المتحرك ذو طبيعة قطبية، والكروماتوغرافيا المستخدمة في الفصل هي كروماتوغرافيا الطور العكوس RP، بالنسبة لكروماتوغرافيا الطور العكوس فإن المركبات الفينولية الأعلى قطبية تخرج أولا من العمود وتمتلك زمن الاحتفاظ الأقل ثم تليها المركبات الفينولية الأقل قطبية.

لقد كان حمض الغاليك المركب الفينولي الأول الذي غادر العمود وذلك لكونه المركب الأعلى قطبية حيث نلاحظ أنه يمتلك في صيغته الكيميائية 3 مجموعات هيدروكسيل ومجموعة كربوكسيل ذات القطبية العالية، ثم تلاه مركب الكاتشين فهو مركب ذو قطبية عالية كونه يمتلك 5 مجموعات هيدروكسيل ذات القطبية العالية والجزء القطبي أكبر من الجزء غير القطبي، ثم مركب حمض الكافييك الأقل قطبية والذي يمتلك مجموعة كربوكسيل ومجموعتي هيدروكسيل، نلاحظ أن كل من حمض السينابيك وحمض الفيروليك يمتلكان الصيغة الكيميائية نفسها تقريباً باستثناء كون حمض السينابيك يمتلك مجموعة كيتونية إضافية مما يمنحه قطبية أعلى من حمض الفيروليك وبالتالي احتفاظ أقل على العمود، أما الكيرستين فيمتلك زمن الاحتفاظ الأكبر وذلك لأن الجزء غير القطبي لديه أكبر من الجزء القطبي.

نستنتج أن خلاصة بذور العنب المسوقة محليا غنية بالعديد من المركبات الفينولية أهمها الكيرستين والكافييك والسينابيك والكاتشين وتراكيز قليلة من حمض الغاليك والفيروليك.

في دراسة أجراها أحد الباحثين على بذور عنب فيتاسكو نيغرو Fetească neagră وهو من صنف Vitis vinifera حيث توصل إلى أن هذه الخلاصة غنية بالمركبات الفينولية كالكيرستين والكافييك وحمض الغاليك والفيروليك وتراكيز زهيدة من الكاتشين وحمض السينابيك[24].

كما قام أحد الباحثين في دراسة مشابهة بتحديد محتوى عدد من المركبات الفينولية في بذور العنب الأحمر Red Globe وهو من صنف Vitis vinifera حيث توصل إلى احتواء هذه الخلاصة الفينولية على حمض الكافييك والفيروليك والكاتشين، وتراكيز زهيدة من حمض الغاليك والكيرستين في حين لم يجري تحديد حمض السينابيك ومع العلم بأن عملية الاستخلاص تمت باستخدام مزيج من الميتانول والماء وحمض الفورميك[25].

لقد كانت نتائج هذه الدراسة متشابهة مع الدراسات السابقة باحتواء خلاصة بذور العنب على العديد من المركبات الفينولية الهامة كالكيرستين والكافييك والسينابيك والكاتشين وحمض الغاليك والفيروليك، ولكن لابد من إجراء تحديد كمي وذلك لتحديد تراكيز هذه المركبات الفينولية بشكل دقيق، علما أن هناك العديد من العوامل التي تؤثر على نوع و تركيز المركبات الفينولية أهمها نوع العنب حيث أن هناك بين 5000–10000 نوع من صنف كرمة العنب Vitis vinifera حوالي 350 نوع منها هي الأشيع للأغراض الصناعية والتجارية، وزراعة الكروم والعوامل البيئية[26]، إضافة إلى تعدد طرق استخلاص المركبات الفينولية، والتنوع الهيكلي للمركبات الفينولية والذي يجعل من المستحيل تحديد المذيب المناسب لجميع المركبات الفينولية، وكذلك الدور الهام للمذيب المستخدم في عملية الاستخلاص وقد تؤدي مزائج المذيبات إلى تحسين مردود الاستخلاص وتحقيق كفاءة أعلى[27]، كما يمكن أن تؤثر شروط عملية الاستخلاص المختلفة مثل نسبة العينة إلى المذيب والحرارة والزمن على استخلاص المركبات الفينولية[28].

الاستنتاجات والتوصيات:

الاستنتاجات:

- إن خلاصة بذور العنب المسوقة محلياً تحتوي العديد من المركبات الفينولية أهمها الكيرستين والكافييك والسينابيك والكاتشين وتراكيز قليلة من حمض الغاليك والفيروليك.

التوصيات:

- ضرورة إجراء تحديد كمي للمركبات الفينولية المتواجدة في خلاصة بذور العنب المسوقة محلياً.
- القيام بإجراء تحديد كامل للمركبات الفينولية المتواجدة في خلاصة بذور العنب المسوقة محلياً وذلك لوجود العديد من المركبات الفينولية الهامة التي لم يتم تحديدها.
- القيام باستخلاص المركبات الفينولية بالعديد من طرق الاستخلاص الآخرى والتي قد تكون أكثر كفاءة، إضافة إلى استخدام العديد من المذيبات وتغيير في شروط عملية الاستخلاص للوصول إلى عملية الاستخلاص الأعلى كفاءة.

Reference

1. Cádiz-Gurrea, M. D. L. L., Borrás-Linares, I., Lozano-Sánchez, J., Joven, J., Fernández-Arroyo, S., & Segura-Carretero, A. (2017). Cocoa and grape seed byproducts as a source of antioxidant and anti-inflammatory proanthocyanidins. *International journal of molecular sciences*, *18*(2), 376.

2. Yamakoshi, J., Saito, M., Kataoka, S., & Kikuchi, M. (2002). Safety evaluation of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. *Food and chemical toxicology*, *40*(5), 599-607.

3. Montealegre, R. R., Peces, R. R., Vozmediano, J. C., Gascueña, J. M., & Romero, E. G. (2006). Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape Vitis vinifera varieties grown in a warm climate. *Journal of Food Composition and Analysis*, *19*(6-7), 687-693.
4. Kim, T. H., Jeon, E. J., Cheung, D. Y., Kim, C. W., Kim, S. S., Park, S. H., ... & Kim, J. I. (2013). Gastroprotective effects of grape seed proanthocyanidin extracts against nonsteroid anti-inflammatory drug-induced gastric injury in rats. *Gut and liver*, *7*(3), 282.
5. El-Beshbishy, H. A., Mohamadin, A. M., & Abdel-Naim, A. B. (2009). In vitro evaluation of the antioxidant activities of grape seed (Vitis vinifera) extract, blackseed (Nigella sativa) extract and curcumin. *Journal of Taibah University Medical Sciences*, *4*(1), 23-35.
6. Al-Diab, D. and N. Al-As'aad, Determination of Phenolic Compounds Levels and Their Antioxidant Activity in Some Local Functional Juices. Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Health Sciences Series, 2015.
7. Al-Diab, D. and N. Al-As'aad, Comparative analysis of ascorbic acid content and antioxidant activity of some fruit juices in Syria. Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Health Sciences Series Vol. (11) No. (2) 2018.
8. Al-Diab, D. and A. Sahunie , Effect of Rosemary and Marjoram Extracts on Oxidative Stability of Refined Sunflower Oil. Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Health Sciences Series Vol. (45) No. (1) 2023.
9. Al-Diab, D., N. Hasan, and A. Nezam, Using Albumin Denaturation Inhibition Method to Determine the Anti-Inflammatory Activity of Phenolic Compounds in Some Locally Available Fruit Juices. Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Health Sciences Series, 2021. Vol (43), No(1) 2021.
10. Al-Diab, D., N. Hasan, and A. Nezam, In-vitro Anti-inflammatory activity of Total Phenolic content of some fruit juices in Syria. Tishreen University Journal. Health Sciences Series Vol (14), No(7) 2021.
11. Jo, B. G., Bong, S. K., Jegal, J., Kim, S. N., & Yang, M. H. (2020). Antiallergic effects of phenolic compounds isolated from Stellera chamaejasme on RBL-2H3 cells. *Natural Product Communications*, *15*(7), 1934578X20942352.
12. Al-Diab, D., N. Hasan, and A. Ahmad, دراسة الفعالية المضادة للتخثر لمستخلص الوردة الدمشقية في الزجاج Tishreen University Journal. Health Sciences Series Vol (45), No(3) 2023.
13. Al-Diab, D., N. Hasan, and K. Saeed, In vitro evaluation of the effect of yerba mate on warfarin efficacy. international journal of advance healthcare research Vol (7), No(11) 2023.
14. Vázquez-Ruiz, Z., Toledo, E., Vitelli-Storelli, F., Goni, L., de la O, V., Bes-Rastrollo, M., & Martínez-González, M. Á. (2022). Effect of dietary phenolic compounds on incidence of cardiovascular disease in the sun project; 10 years of follow-up. *Antioxidants*, *11*(4), 783.
15. Direito, R., Rocha, J., Sepodes, B., & Eduardo-Figueira, M. (2021). Phenolic compounds impact on rheumatoid arthritis, inflammatory bowel disease and microbiota modulation. Pharmaceutics, 13(2), 145.
16. Smejkal, K. (2014). Selected natural phenolic compounds-potential treatment for peripheral neuropathy?. *Ceska a Slovenska farmacie: casopis ceske farmaceuticke spolecnosti a Slovenske farmaceuticke spolecnosti*, *63*(2), 55-70.
17. Alsalti, A.A., N. Hasan, and D. Diab, In-vitro and In-vivo hypoglycemic efficacy of Rosa damascena petals extracts. Bulletin of Pharmaceutical Sciences. Assiut, 2022 Vol (45), No(2) 2022.

18. Al-Diab, D., D. Nazih and A. Ahmad, Antimicrobial effect of Rosmary extract to improve the shelf life of chicken meat. Tishreen University Journal -Medical Sciences Series Vol (45), No(3) 2023.
19. Al-Diab, D., N. Hasan and K. Rafah, Antibacterial activity of Rosa damascene petals mill extracts. Research Journal of Pharmacy and Technology Vol (16), No(11) 2023.
20. Ruiz-Ruiz, J. C., Matus-Basto, A. J., Acereto-Escoffié, P., & Segura-Campos, M. R. (2017). Antioxidant and anti-inflammatory activities of phenolic compounds isolated from Melipona beecheii honey. Food and Agricultural Immunology, 28(6), 1424-1437.
21. Karaman, S., Karasu, S., Tornuk, F., Toker, O. S., Gecgel, U., Sagdic, O., ... & Gul, O. (2015). Recovery potential of cold press byproducts obtained from the edible oil industry: Physicochemical, bioactive, and antimicrobial properties. *Journal of agricultural and food chemistry*, *63*(8), 2305-2313.
22. Da Silva, J. M. R., Rigaud, J., Cheynier, V., Cheminat, A., & Moutounet, M. (1991). Procyanidin dimers and trimers from grape seeds. *Phytochemistry*, *30*(4), 1259-1264.
23. Rajbhar, K. A. R. I. S. H. M. A., Dawda, H., & Mukundan, U. S. H. A. (2015). Polyphenols: Methods of extraction. *Sci. Revs. Chem. Commun*, *5*(1), 1-6.
24. Özcan, M. M., Al Juhaimi, F., Gülcü, M., Uslu, N., & Geçgel, Ü. (2017). Determination of bioactive compounds and mineral contents of seedless parts and seeds of grapes. *South African Journal of Enology and Viticulture*, *38*(2), 212-220.
25. Cotea, V. V., Luchian, C., Niculaua, M., Zamfir, C. I., Moraru, I., Nechita, B. C., & Colibaba, C. (2018). EVALUATION OF PHENOLIC COMPOUNDS CONTENT IN GRAPE SEEDS. *Environmental Engineering & Management Journal (EEMJ)*, *17*(4).
26. Shinagawa, F. B., SANTANA, F. C. D., TORRES, L. R. O., & Mancini-Filho, J. (2015). Grape seed oil: a potential functional food?. *Food Science and Technology*, *35*, 399-406.
27. Al-Diab, D., Effect of Preparation Conditions on Phenolic Content and Antioxidant Activity of Various Teas and Herbal Teas. journal of Chemical and Pharmaceutical sciences Vol (11), No(3) 2018.
28. Shi, J., Yu, J., Pohorly, J., Young, J. C., Bryan, M., & Wu, Y. (2003). Optimization of the extraction of polyphenols from grape seed meal by aqueous ethanol solution. *J. Food Agric. Environ*, *1*(2), 42-47.