مجلة جامعة دمشق للعلوم الأساسية
مجلد 40- (2024): 69-81

Damascus University Journal for the Basic Sciences
Vol 40 (2024): 69 -81

مقارنة بين طريقتي الأمواج فوق الصوتية والحاضنة الهزازة لاستخلاص بعض المركبات الفعالة حيوياً من قشور الرمان

صفاء محمد العامر [1] فادي فؤاد خضر [2] إيمان مصطفى البكري [3]

[1] طالبة ماجستير قسم الكيمياء، كلية العلوم، جامعة دمشق، سورية.
safaa97.mohammad@damascusuniversity.edu.sy

[2] مدرس في قسم الكيمياء، كلية العلوم، جامعة دمشق، سورية.
fadi.kheder@damascusuniversity.edu.sy

[3] أستاذ مساعد في قسم الكيمياء، كلية العلوم، جامعة دمشق، سورية.
albakri.iman@damascusuniversity.edu.sy

الملخص

عُين محتوى كُلٍ من الفينولات الكلية والتانينات الكلية والفلافونويدات الكلية والأنثوسيانينات الكلية، ودُرس النشاط المضاد للتأكسد لمستخلصات قشور الرمان. طُبقت طريقتا الاستخلاص بالأمواج فوق الصوتية والحاضنة الهزازة عند درجة حرارة 40 °C لمدة 15 دقيقة، باستعمال عدة مذيبات (إيتانول 70% وإيتانول 70% محمض بحمض الليمون 2% وإيتانول 70% محمض بحمض الليمون 4% وماء مقطر وماء مقطر محمض بحمض الليمون 2% وماء مقطر محمض بحمض الليمون 4%). أظهرت النتائج أن الإيتانول 70% أفضل من الماء المقطر في استخلاص المركبات الفعالة حيوياً من قشور الرمان، لم يلاحظ أثر واضح لتحميض الإيتانول 70% أو الماء المقطر بحمض الليمون في استخلاص هذه المركبات في كلتا الطريقتين باستثناء الفلافونويدات الكلية فقد تناقص تركيزها عند التحميض. أبدت المستخلصات المدروسة فعالية كبيرة في كسح الجذور الحرة وفق اختبار الـDPPH.

الكلمات المفتاحية: قشور الرمان – استخلاص – الفينولات الكلية – التانينات الكلية – الفلافونويدات الكلية – الأنثوسيانينات الكلية – الحاضنة الهزازة – الأمواج فوق الصوتية.

تاريخ الإيداع: 2022/06/19
تاريخ الموافقة: 2022/10/02

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

ISSN (online): 2789-6366
http://journal.damascusuniversity.edu.sy/index.php/index/index

Comparison between ultrasounds and orbital shaker incubator methods to extract some bioactive compounds from pomegranate peels

Safaa Mohammad Al-Amer [(1)] Fadi Fouad Kheder [(2)] Iman Mostafa Al-Bakri [(3)]

[1] Master's student ,Faculty of Science, Department of Chemistry, Damascus, Syria.
safaa97.mohammad@damascusuniversity.edu.sy

[2]Faculty of Science, Department of Chemistry, Damascus, Syria.
fadi.kheder@damascusuniversity.edu.sy

[3]Assistant ProfessorFaculty of Science, Department of Chemistry, Damascus, Syria.
albakri.iman@damascusuniversity.edu.sy

Abstract

The content of total phenols, total tannins, total flavonoids and total anthocyanins, and the antioxidant activity of pomegranate peel extracts were determined. Ultrasounds and orbital shaker incubator extraction methods were applied at 40 °C for 15 min, using several solvents (distilled water, distilled water acidified with citric acid 2%, distilled water acidified with citric acid 4%, ethanol 70%, ethanol 70% acidified with citric acid 2%, ethanol 70% acidified with citric acid 4%). The results showed that ethanol 70% was better than distilled water for bioactive compounds extraction from pomegranate peels. No apparent effect was observed of acidifying ethanol 70% or distilled water with citric acid on extracting these compounds using the two extraction methods, except for total flavonoids content which decreased upon acidification .The studied extracts showed a great activity in scavenging free radicals according to DPPH test.

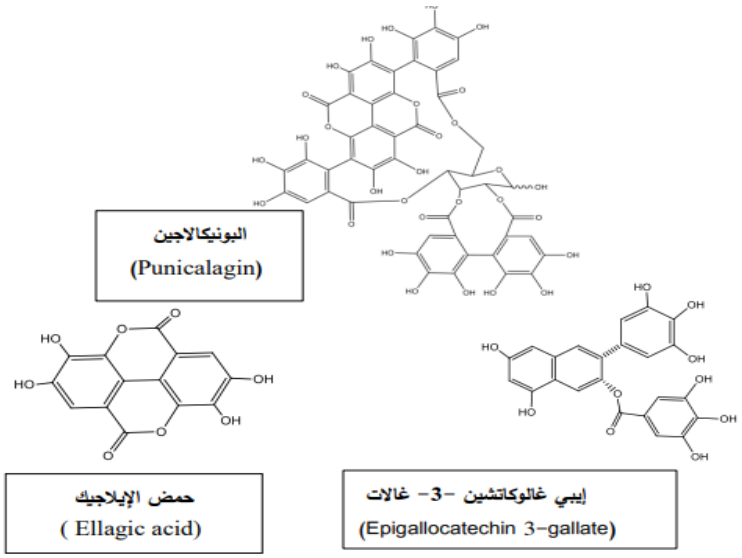
Received :2022/06/19
Accepted:2022/10/02

Copyright:Damascus University- Syria, The authors retain the copyright under a CC BY- NC-SA

Key words: Pomegranate peels- Extraction - Total phenols - Total tannins - Total flavonoids - Total anthocyanins - Orbital shake incubator- Ultrasounds.

1. المقدمة:

ازداد وعي المستهلك في السنوات الأخيرة لإدخال المصادر النباتية مثل الفواكه والخضروات ومخلفاتهما في منتجاته الغذائية لغناها بالمركبات الفعالة حيوياً والتي لها دور في تعزيز صحة الإنسان وحِمايته من الأمراض المختلفة [1]. يُعدُّ الرمان مثالاً مهماً عن هذه المصادر الطبيعية حيث يتميز بغناه بالعديد من المركبات المضادة للتأكسد التي تُستخدم في الكثير من المجالات الطبية [1]، ينتمي الرمان (Punica granatum L) إلى العائلة Punicaceae، وينتشر في المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية، وفي الشرق الأوسط والهند. عُرف الرمان منذ القدم واشتهر بشعبية واسعة في مختلف الثقافات واستخدم كمضاد للسرطان والجراثيم ولمعالجة أمراض القلب والأوعية الدموية [2,1]. يتميز عصير الرمان بفعالية مضادة للتأكسد كبيرةً مقارنةً بالنبيذ الأحمر والشاي الأخضر نظراً لاحتوائه نسبة عالية من متعددات الفينول مثل التانينات والفلافونويدات والأنثوسيانينات التي تمنح العصير لونه الأحمر الداكن [2]. تعد قشور الرمان، والتي تشكل ما يقارب 30–40٪ من وزن الفاكهة، نفايات زراعية مهمة يمكن إعادة تدويرها واستخدامها في مجالات مختلفة مثل الدباغة والصباغة [3]. تتميز قشور الرمان بغناها بالمركبات التانينية التي تُقسم وفقاً لخصائصها البنيوية إلى أربع مجموعات رئيسية: الغالوتانينات والإيلاجيتانينات مثل البونيكالاجين وحمض الإيلاجيك (الشكل (1)) والتانينات المتكاثفة كالإيبي 3–غالوكاتشين (الشكل (1)) بالإضافة إلى التانينات المعقدة [4]. يتراوح الوزن الجزيئي للتانينات من 500 إلى 3000 دالتون [5]، وتعطى وفقاً لهيئة دستور الغذاء الرقم E181 باعتبارها ملوناً طبيعياً. استخدمت التانينات في الطب والصيدلة بفضل خصائصها المضادة للفيروسات والمضادة للسرطان والمضادة للالتهابات ولمعالجة مرضى السكري [7,6]، بالإضافة إلى استخدامها في الصناعات الغذائية والتجميلية كمادة حافظة طبيعية [6,5]،



الشكل (1): صيغ بعض المركبات المضادة للتأكسد الموجودة بوفرة في قشور الرمان.

أُستخلص Kennas وزملاؤه [1] بعض المركبات الفعالة حيوياً من قشور الرمان بطريقة الهزاز المحوري عند درجة حرارة الغرفة طوال الليل بسرعة 500 دورة/ دقيقة باستخدام خمسةِ مذيبات (الإيتانول 96%، الميتانول، الماء، الأستون، مزيج من الماء والميتانول 50:50). قام Çam وHisil [8]باستخلاص أهم المركبات الفعالة حيوياً من قشور الرمان بطريقة التحريك المغناطيسي عند درجة الحرارة 40 °C لمدة ساعة مع دراسة أثر المذيب (الميتانول، الماء، الأستون، الإيتانول، خلات الإيتيل) في عملية الاستخلاص تلك. طبق Motikar وزملاؤه [9]، من جهةٍ أخرى، طريقة الأمواج فوق الصوتية لاستخلاص المركبات الفينولية من قشور الرمان باستخدام الإيتانول 70%

كمذيب بتغيير درجة حرارة الاستخلاص وتردد الأمواج فوق الصوتية المستخدمة. أجريت، أيضاً، دراسة في جامعة دمشق تم فيها تعيين التركيب الكيميائي لمستخلصات كلٍ من قشور وبذور وأزهار الرمان الناتجة بطريقتي الأمواج فوق الصوتية والهزاز المحوري [10].

يهدف هذا البحث إلى مقارنة طريقتي الأمواج فوق الصوتية والحاضنة الهزازة لاستخلاص بعض المركبات الفعالة حيوياً من قشور الرمان، ودراسة أثر المذيب المستخدم في عملية الاستخلاص، وتعيين القدرة المضادة للتأكسد للمستخلصات الناتجة.

2. مواد البحث وطرائقه:

1.2. المواد والأدوات والأجهزة المستعملة:

تم شراء الرمان من السوق المحلي في مدينة دمشق. فصل اللب عن القشور. جُففت القشور وطُحنت في مطحنة كهربائية وحفظت في عبوة عاتمة عند درجة حرارة الغرفة.

1.1.2. المواد الكيميائية:

كاشف فولين سيوكالتو من شركة Fluka، كربونات الصوديوم اللامائية (99%) وكبريتات الحديد الثنائي والأمونيوم وكلوريد الألمنيوم من شركة DeHaen–Riedel، إيتانول (95%) وخلات الصوديوم (99%) من شركة Panreac، حمض الغاليك (99%) و2،2–ثنائي فينيل بيكريل هيدرازيل (DPPH) وكيرستين (98%) من شركة Sigma Aldrich، حمض التانيك من شركة Allen&Hanburys Lted، حمض الليمون أحادي الماء (99.5%) من شركة Shamlab.

2.1.2. الأجهزة:

جهاز الأمواج فوق الصوتية (Soner203H,Frequency:53KHZ,Ultrasound power:100W)، حاضنة هزازة (JSR-JSSI-200CI)، مقياس pH (Bench Meter)،

جهاز الطيف الضوئي المرئي وفوق البنفسجي (Optizen3320 UV-VIS)، مطحنة كهربائية (Kenwood,220-240V,50/60HZ,170 W)، مجفف كهربائي (model: Jsof–100 ,data:2014, AMP Temp:20°C, Electricity: 220 VAc–50/60HZ)، ميزان حساس (Precisa-240A)، مازج رجاج (velp scientifica:code Vortex F202A0173,V:12v,W:15).

2.2. استخلاص المركبات الفعالة حيوياً:

وضعت عينات من قشور الرمان المطحونة كتلة كل منها 2 غ في عبوات زجاجية عاتمة وأضيف إليها كمذيب 50 مل من الإيتانول 70% أو الإيتانول 70% المحمض بحمض الليمون 2% أو الإيتانول 70% المحمض بحمض الليمون 4% أو الماء المقطر أو الماء المقطر المحمض بحمض الليمون 2% أو الماء المقطر المحمض بحمض الليمون 4%. أُستخلصت المركبات الفعالة حيوياً من العينات السابقة عند درجة الحرارة 40 °C خلال 15 دقيقة باستعمال جهاز الأمواج فوق الصوتية من جهة، والحاضنة الهزازة (200 دورة / دقيقة) من جهة أخرى.

3.2. تعيين مردود المستخلصات:

عُين مردود المستخلصات الملونة (Y) بأخذ 1 مل من كل مستخلص وتجفيفه بالمجفف الكهربائي عند درجة الحرارة 40 °C حتى ثبات الوزن، وحسبت النتائج كنسبة مئوية وزنية من العلاقة التالية [11]:

$$Y(\%) = \frac{W1 \times 100}{W2} \qquad (1)$$

حيث:

W1: كتلة المستخلص الجاف بعد تبخير المذيب (غ).

W2: كتلة العينة الجافة من قشور الرمان المأخوذة للاستخلاص (غ).

4.2. تعيين محتوى الفينولات الكلية:

مُزج 250 ميكرولتر من كلّ مستخلص، ممدد بالماء المقطر 55 مرة، مع 250 ميكرولتر من الماء المقطر و1250 ميكرولتر من كاشف فولين سيوكالتو الممدد 10% بالماء المقطر. أضيف بعد 8 دقائق 1000ميكرولتر من محلول كربونات الصوديوم (7.5%). مُزجت العينات بالمازج الرجاج ثمّ تُركت 90 دقيقة عند درجة حرارة الغرفة [12]. قيست امتصاصية العينات باستعمال جهاز الطيف الضوئي (UV–VIS) عند طول الموجة 765 نانومتر. أُستقرئت قيم التراكيز بالاستفادة من سلسلة معيارية (R^2=0.9995 وy=0.0093x) محضرة بالطريقة نفسها من حمض الغاليك في الإيتانول 70% (10–100مغ/ل). تم التعبير عن تراكيز الفينولات كمكافئات لحمض الغاليك (غ/100غ قشور رمان جافة).

5.2. تعيين محتوى الفلافونويدات الكلية:

تتفاعل الفلافونويدات مع أيون الألمنيوم في وسط قلوي مشكلةً معقداً أحمر اللون تقاس امتصاصيته عند طول الموجة 510 نانومتر [13]. مزج 125 ميكرولتر من كل مستخلص، ممدد 5 مرات بالإيتانول 70%، مع 500 ميكرولتر من الماء المقطر و37.5 ميكرولتر من محلول نتريت الصوديوم (5%)، ثم وضعت العينات في الظلام مدة 5 دقائق. أضيف إلى كل عينة 37.5 ميكرولتر من محلول كلوريد الألمنيوم (10%)، ثم أضيف بعد 6 دقائق 500 ميكرولتر من محلول هيدروكسيد الصوديوم (1 مول/ل) و600 ميكرولتر من الماء المقطر. قيست امتصاصية العينات عند 510 نانومتر [8]. أُستقرئت قيم التراكيز بالاستفادة من سلسلة معيارية (R^2=0.9991 وy=0.0007x) محضرة بالطريقة نفسها من الكيرستين في الإيتانول 70% (0.2–1.3 غ/ل). تم التعبير عن تراكيز الفلافونويدات كمكافئات للكيرستين (غ/100غ قشور رمان جافة).

6.2. تعيين التانينات الكلية:

حُسب تركيز التانينات الكلية من خلال الفرق بين تراكيز الفينولات الكلية والفينولات المتبقية بعد ترسيبها بالتعقيد مع بروتين الكازيئين [14].

1.6.2. تعيين الفينولات الكلية:

عينت الفينولات الكلية وفق الطريقة المتبعة في الفقرة (4.2). أُستقرئت قيم التراكيز بالاستفادة من سلسلة معيارية (R^2=0.9976 وy=0.0089x) محضرة بالطريقة نفسها من حمض التانيك (10–110 مغ/ل). تم التعبير عن تراكيز الفينولات الكلية كمكافئات لحمض التانيك (غ/100غ قشور رمان جافة).

2.6.2. تعيين الفينولات المتبقية:

أضيف 0.3 غ من الكازيئين إلى 2 مل من كل مستخلص وأضيف إليها 8 مل من الماء المقطر. حركت العينات لمدة 3 ساعات، ثم رشحت كل عينة وغسل الراسب جيداً وتُمم حجم الرشاحة بالماء المقطر إلى 10 مل، وعينت الفينولات المتبقية في كل رشاحة كما في الفقرة السابقة (1.6.2).

7.2. تعيين الأنثوسيانينات الكلية:

عينت الأنثوسيانينات وفق طريقة تغير الـpH [15]، مع بعض التعديلات، باستعمال محلولين موقيين الأول: pH=1 (بمزج 125 مل من محلول كلوريد البوتاسيوم (0.2 مول/ل) مع 375 مل من حمض كلور الماء (0.2 مول/ل))، والثاني pH=4.5 (بمزج 250 مل من محلول خلات الصوديوم (0.1 مول/ل) و200 مل من حمض الخل (0.1 مول/ل) و50 مل من حمض كلور الماء (0.1 مول/ل)).

مُزج 400 ميكرولتر من كل مستخلص مع 1600 ميكرولتر من أحد المحلولين الموقيين وقيست الامتصاصية عند طول الموجة 510 نانومتر، أعيدت التجربة باستخدام المحلول الموقي الآخر ثمّ حسبت الامتصاصية A وفق العلاقة (2).

$$A= (A_{510})_{PH\ (1)} - (A_{510})_{PH\ (4.5)} \qquad (2)$$

حُسب تركيز الأنثوسيانينات الكلية (مغ/ل) من العلاقة (3) كمكافئات للسيانيدين-3-غلوكوزيد.

$$Total_{\ Anthocyanins} = (A \times M_W \times Df \times 1000) / \varepsilon_0 \qquad (3)$$

حيث:

A: الامتصاصية (العلاقة (2)).

Df: معامل التمديد، 5 مرات.

M_w: الكتلة المولية لسيانيدين-3-غلوكوزيد وقدرها 449.2 غ/مول.

ε_0: معامل الامتصاص المولي لسيانيدين-3- غلوكوزيد و قدره 26900 ل/ سم.مول.

8.2. الفعالية المضادة للتأكسد (اختبار الـDPPH):

مُزج 50 ميكرولتر من كل مستخلص، ممدد 20 مرة بالماء المقطر، مع 1950 ميكرولتر من محلول الـDPPH (50 مغ/ل محضر في الإيتانول 99%). تركت العينات في الظلام مدة 30 دقيقة. حُسبت قدرة المستخلصات على كسح الجذور الحرة (I%) من العلاقة (4) [16].

$$I\% = \frac{(A_{control(517nm)} - A_{sample(517nm)})}{A_{control(517nm)}} \times 100 \qquad (4)$$

حيث:

I%: النسبة المئوية لتثبيط الجذور الحرة.

$A_{Control}$: امتصاصية الشاهد.

A_{sample} : امتصاصية العينة.

حُضرّ الشاهد بمزج 50 ميكرولتر من الإيتانول 70% مع 1950 ميكرولتر من محلول الـDPPH.

9.2. التحليل الإحصائي:

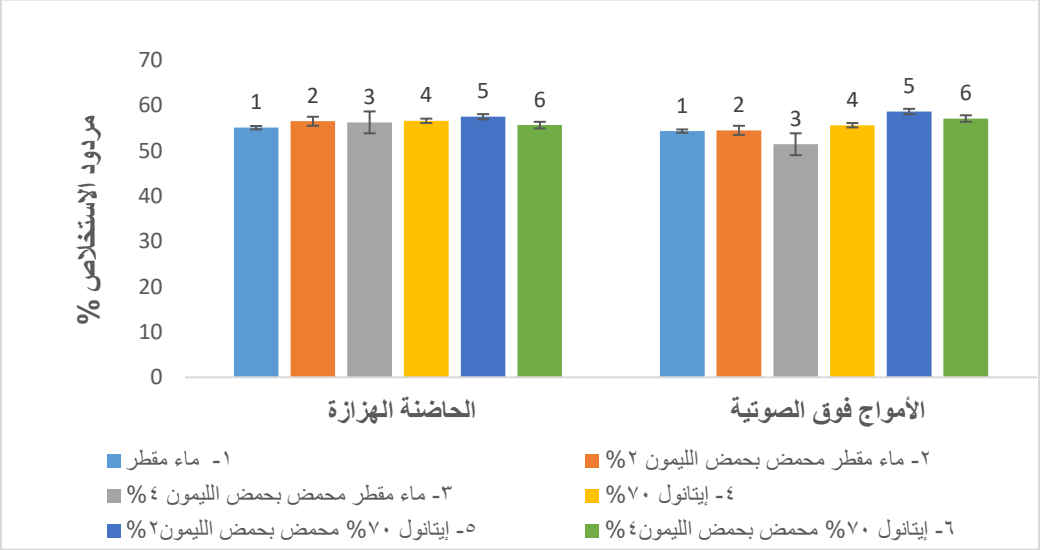
حُسبت المتوسطات الحسابية والانحرافات المعيارية والفروق المعنوية بين المتوسطات بمجال ثقة 95% (P=0.05). استخدم برنامج IBM SPSS Statistic23 لمعالجة النتائج، وهي حزمة برمجيـــــة للتحليل الإحصـائي وإدارة البيانات، وذلك بالاعتماد على اختبار Tuky. كُررت كل تجربة 5 مرات (n =5) لجميع النتائج باسـتثناء تجارب قياس الفعالية المضـادة للتأكسـد (n=3). تم التعبير عن النتائج بالمتوسط الحسابي ± الانحراف المعياري.

3. النتائج والمناقشة:

1.3. تعيين مردود الاستخلاص:

تُعد طريقة الاستخلاص ونوع المذيب ودرجة الحرارة والزمن من العوامل التي يجب اختيارها بعناية من أجل تحسين كفاءة الاستخلاص وذلك للحصول على مردود مرتفع من المركبات الفعالة حيوياً. توضح نتائج الشكل (2) النسب المئوية لمردود الاستخلاص من قشور الرمان بطريقتي

الأمواج فوق الصوتية والحاضنة الهزازة باستخدام عدّة مذيبات (ماء مقطر – ماء مقطر محمض بحمض الليمون 2% – ماء مقطر محمض بحمض الليمون 4% – إيتانول 70% – إيتانول 70% محمض بحمض الليمون 2%–إيتانول 70% محمض بحمض الليمون 4%).



الشكل (2): النسب المئوية لمستخلصات قشور الرمان الناتجة عند الاستخلاص بطريقتي الأمواج فوق الصوتية والحاضنة الهزازة (200 دورة/ دقيقة) خلال 15 دقيقة عند درجة حرارة 40 °C.

لم يلاحظ وجود أي فروق معنوية بين قيم المردود الناتجة باستخدام طريقتي الاستخلاص حسب برنامج الـ SPSS (الشكل (2)). تراوحت قيم مردود الاستخلاص لجميع المذيبات المدروسة من 51 إلى 58%، ولم يلاحظ أي تأثير لتحميض الماء المقطر أو الإيتانول 70% بحمض الليمون على زيادة مردود الاستخلاص أو نقصانه (الشكل (2)).

بلغ مردود الاستخلاص، في دراسة أجراها Çam وHisil على قشور الرمان، 46% و17% باستخدام الميتانول 99% والماء المقطر كمذيب، على الترتيب، وذلك بتطبيق طريقة الاستخلاص بالتحريك المغناطيسي لمدة ساعة عند درجة حرارة 40 °C [8]. توصل Wang وزملاؤه، من جهةٍ أخرى، إلى قيمة مماثلة لمردود الاستخلاص من قشور الرمان بتطبيق طريقة الهزازة الكهربائية لمدة 4 ساعات عند درجة حرارة 40 °C باستخدام الميتانول 99% كمذيب، بلغ مردود الاستخلاص، في دراسة أخرى، عند استخدام الإيتانول 99% والماء المقطر 17.7% و43% على الترتيب [2]. يلاحظ أن القيم المرجعية السابقة لمردود الاستخلاص أقل من القيم الناتجة في هذا البحث. قد يعود سبب ذلك إلى اختلاف طريقة الاستخلاص المتبعة والمذيب المستخدم من جهة، وإلى اختلاف تركيز الإيتانول المستخدم من جهة أخرى، حيث يبدو أن الإيتانول 70% أفضل كمذيب استخلاص في هذه الحالة من الإيتانول 99%. تلعب قطبية المذيبات دوراً مهماً في كفاءة الاستخلاص و تعيين نوع المركبات المستخلصة [2]. أظهرت الدراسة التي أجراها putnik وزملاؤه على قشور العنب، ودراسة Abou–Arab وزملائه على أزهار الكركدية أن تحميض المذيبات قد يساعد في حلمهة الجدر الخلوية النباتية ما يزيد من مردود المركبات المستخلصة. لم يلاحظ أثر تحميض المذيب في زيادة مردود الاستخلاص في هذا البحث. قد يعود السبب

وراء ذلك إلى اختلاف النبات المدروس، حيث تتميز الجُدر الخلوية لِقشور الرمان بُبنية قاسية وأكثر تعقيداً من مثيلاتها في قشور العنب وأزهار الكركدية ما يزيد من صعوبة حلمهتها [18,17].

2.3. تعيين بعض مضادات التأكسد في قشور الرمان:

عُينت تراكيز كلٍ من الفينولات الكلية والفلافونويدات الكلية والتانينات الكلية والأنثوسيانينات الكلية في مستخلصات قشور الرمان الناتجة بالاستخلاص بطريقتي الأمواج فوق الصوتية والحاضنة الهزازة (200 دورة / دقيقة) عند درجة الحرارة 40 °C لمدة 15 دقيقة. سُجلت النتائج في الجدول (1).

الجدول (1): قيم تراكيز الفينولات الكلية والفلافونويدات الكلية والتانينات الكلية والأنثوسيانينات الكلية في مُستخلصات قشور الرمان الناتجة بطريقتي الأمواج فوق الصوتية (أ) والحاضنة الهزازة (200 دورة / دقيقة) (ب) عند درجة الحرارة 40 °C لمدة 15 دقيقة.

(أ) الاستخلاص بطريقة الأمواج فوق الصوتية				
المذيب	الفينولات الكلية غ/100غ	الفلافونويدات الكلية غ/100غ	التانينات الكلية غ/100غ	الأنثوسيانينات الكلية مغ/100غ
ماء مقطر	$^{A}0.34 \pm 12.28^{a}$	$^{A}0.34 \pm 5.88^{a}$	$^{A}0.29 \pm 10.51^{a,b}$	$^{A}1.33 \pm 38.68^{a}$
ماء مقطر محمض بحمض الليمون 2%	$^{A}0.67 \pm 12.63^{a}$	$^{A}0.61 \pm 3.56^{b}$	$^{A}0.74 \pm 10.37^{b}$	$^{A}2.92 \pm 33.10^{a}$
ماء مقطر محمض بحمض الليمون 4%	$^{A}0.49 \pm 12.98^{a}$	$^{A}0.23 \pm 3.56^{b}$	$^{A}0.51 \pm 9.36^{c,b}$	$^{A}1.43 \pm 33.52^{a}$
إيتانول 70%	$^{A}0.70 \pm 15.33^{b}$	$^{A}0.62 \pm 7.57^{c}$	$^{A}0.67 \pm 12.35^{e,d}$	$^{A}0.74 \pm 64.16^{b}$
إيتانول 70% محمض بحمض الليمون 2%	$^{A}0.72 \pm 16.43^{b}$	$^{A}0.12 \pm 3.26^{b}$	$^{A}0.73 \pm 13.38^{d}$	$^{A}1.27 \pm 64.57^{b}$
إيتانول 70% محمض بحمض الليمون 4%	$^{A}0.31 \pm 15.74^{b}$	$^{A}0.23 \pm 3.31^{b}$	$^{A}0.38 \pm 11.7^{e}$	$^{A}4.86 \pm 51.80^{c}$

الاستخلاص بطريقة الحاضنة الهزازة (ب)				
ماء مقطر	$^{B}0.52 \pm 13.64^{a}$	$^{B}0.09 \pm 5.19^{a}$	$^{B}0.52 \pm 11.7^{a,c}$	$^{B}3.31 \pm 31.72^{a}$
ماء مقطر محمض بحمض الليمون 2%	$^{B}0.04 \pm 13.43^{a}$	$^{B}0.19 \pm 5.18^{a}$	$^{B}0.06 \pm 11.29^{a}$	$^{A}1.80 \pm 31.14^{a}$
ماء مقطر محمض بحمض الليمون 4%	$^{B}0.37 \pm 14.15^{a}$	$^{B}0.17 \pm 5.08^{a}$	$^{B}0.34 \pm 10.83^{a}$	$^{B}3.07 \pm 23.25^{b}$
إيتانول 70%	$^{B}0.68 \pm 15.27^{b}$	$^{B}0.13 \pm 6.90^{b}$	$^{A}0.68 \pm 12.72^{b,c}$	$^{B}3.66 \pm 93.84^{c}$
إيتانول 70% محمض بحمض الليمون 2%	$^{B}0.58 \pm 15.87^{b}$	$^{B}0.16 \pm 7.11^{b}$	$^{A}1.18 \pm 13.30^{b}$	$^{B}4.49 \pm 48.09^{d}$
إيتانول 70% محمض بحمض الليمون 4%	$^{B}0.00 \pm 16.13^{b}$	$^{B}0.12 \pm 6.62^{b}$	$^{B}0.03 \pm 13.43^{b}$	$^{B}2.1 \pm 34.40^{a}$

يدل اختلاف الحروف الصغيرة عن بعضها البعض c,b,a,... ضمن, العمود الواحد، في القسم (أ) أو (ب)، من الجدول إلى وجود فروق معنوية بين قيم تراكيز كل نوع من المركبات المدروسة بتغيير المذيب، كما يدل اختلاف الحرفان A وB, إلى وجود فروق معنوية بين قيم تراكيز كل نوع من المركبات المدروسة بتغيير طريقة الاستخلاص عند مقارنة القسمين (أ) و(ب)، استناداً إلى برنامج الـ.SPSS.

سُجل أعلى تركيز لكلٍ من الفينولات الكلية والفلافونويدات الكلية والتانينات الكلية والأنثوسيانينات الكلية في المستخلصات الإيتانولية مقارنةً بالمستخلصات المائية في كلتا طريقتي الاستخلاص بالأمواج فوق الصوتية والحاضنة الهزازة (الجدول (1)). وجد، عموماً، أن استعمال الحاضنة الهزازة أفضل قليلاً من الأمواج فوق الصوتية في استخلاص كلٍ من الفينولات الكلية والفلافونويدات الكلية والتانينات الكلية (الجدول (1)). يمكن أن يعزى سبب ذلك إلى تفكك بعض المركبات عند تعرضها إلى شروط الاستخلاص بطريقة الأمواج فوق الصوتية [10]. لوحظ، من جهةٍ أخرى، أن قيم تراكيز الأنثوسيانينات الكلية المستخلصة كانت الأعلى وفق طريقة الأمواج فوق الصوتية مقارنة بالحاضنة الهزازة باستثناء القيم الناتجة عند الاستخلاص بالإيتانول 70% (لجدول (1)). لم يلاحظ وجود فروق معنوية بين قيم تراكيز الفينولات الكلية والتانينات الكلية عند تحميض كل من الماء المقطر والإيتانول 70% بحمض الليمون 2% أو 4% وذلك بتطبيق كلتا طريقتي الاستخلاص (الجدول (1)). سُجل تناقص في قيم تراكيز الفلافونويدات الكلية عند تحميض الماء المقطر أو الإيتانول 70% في طريقة الاستخلاص بالأمواج فوق الصوتية (الجدول(1)، القسم (أ)) مقارنةً بطريقة الاستخلاص بالحاضنة الهزازة التي لم يلاحظ فيها أي تغيّر معنوي في قيم تراكيز الفلافونويدات المستخلصة عند التحميض (الجدول(1)، القسم (ب)).

يوضح الجدول (2) مقارنة بين بعض قيم تراكيز الفينولات والفلافونويدات المرجعية مع القيم االناتجة في الدراسة الحالية. يلاحظ أن قيم تراكيز الفينولات الكلية والفلافونويدات الكلية المستخلصة في هذا البحث أكبر من مثيلاتها الواردة في المرجعين [10] و[11]، ما يؤكد أن اختلاف طريقة وشروط الاستخلاص يؤثر في مردود استخلاص المركبات الفعالة حيوياً من قشور الرمان. تقاربت، من جهة أخرى، نتائج هذا البحث مع نتائج الدراسة التي جرت في جامعة دمشق [10]، والتي أظهرت تغيّر قيم تراكيز الفينولات خلال مراحل نضج الثمرة، الأمر الذي يشير إلى أن المرحلة العمرية التي يتم فيها قطف الثمرة تلعب أيضاً دوراً مهما في تحديد محتوى المركبات الفعالة حيوياً المستخلصة. لم يُسلط الضوء من قِبل الدراسات المرجعية كثيراً حول الكمية الكلية للتانينات في قشور الرمان، ولكن عُينت تراكيز التانينات القابلة للحلمهة كالإيلاجيتانينات (Ellagitannins) والبونيكالاجينات (Punicalagins) وكذلك محتوى التانينات المتكاثفة والتي تعد جميعها من التانينات الكلية [20,19,10].

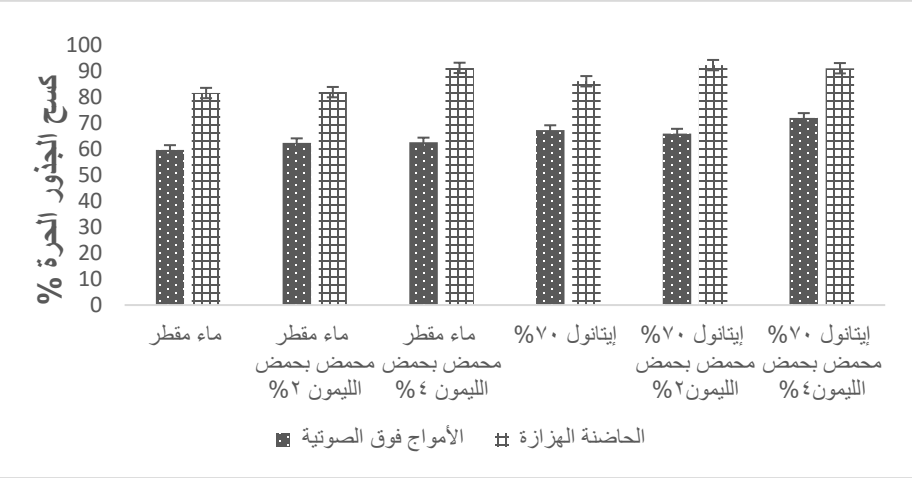
الجدول (2): قيم تراكيز الفينولات الكلية والفلافونويدات الكلية الواردة في بعض المرجعيات مقارنةً مع الدراسة الحالية.

طريقة الاستخلاص والشروط المطبقة	المذيبات المستعملة	الفينولات الكلية غ/100غ	الفلافونويدات الكلية غ/100غ	المرجع
الأمواج فوق الصوتية عند درجة حرارة 60 °C لمدة 30 دقيقة (بتردد 35 كيلوهرتز، 140 واط)	الإيتانول 70%	6.989	0.698	[9]
الاستخلاص باستعمال حمام مائي عند درجة حرارة 40 °C لمدة 3 ساعات	الماء المقطر	4.04	0.332	[9]
الاستخلاص بالتحريك المغناطيسي عند درجة حرارة 40 °C لمدة ساعة	الإيتانول	0.86	1.87	[8]
	الماء المقطر	0.84	0.65	
الأمواج فوق الصوتية عند درجة حرارة الغرفة لمدة ساعة (53 كيلوهرتز، 100 واط)	الإيتانول 70%	14.67	4.57	[10]
الأمواج فوق الصوتية عند درجة حرارة 40°C لمدة 15 دقيقة (53 كيلوهرتز، 100 واط)	الإيتانول 70%	15.33	7.57	الدراسة الحالية
	الماء المقطر	12.28	5.88	
الحاضنة الهزازة عند درجة حرارة 40°C لمدة15 دقيقة (200 دورة / دقيقة)	الإيتانول 70%	15.27	6.90	الدراسة الحالية
	الماء المقطر	13.64	5.19	

3.3. الفعالية المضادة للتأكسد (اختبار الـDPPH):

تحوي قشور الرمان العديد من المركبات الفينولية التي تعتبر مضادات تأكسد مهمة كحمض الإيلاجيك وحمض الغاليك والبونيكالاجين وغيرها من المركبات.

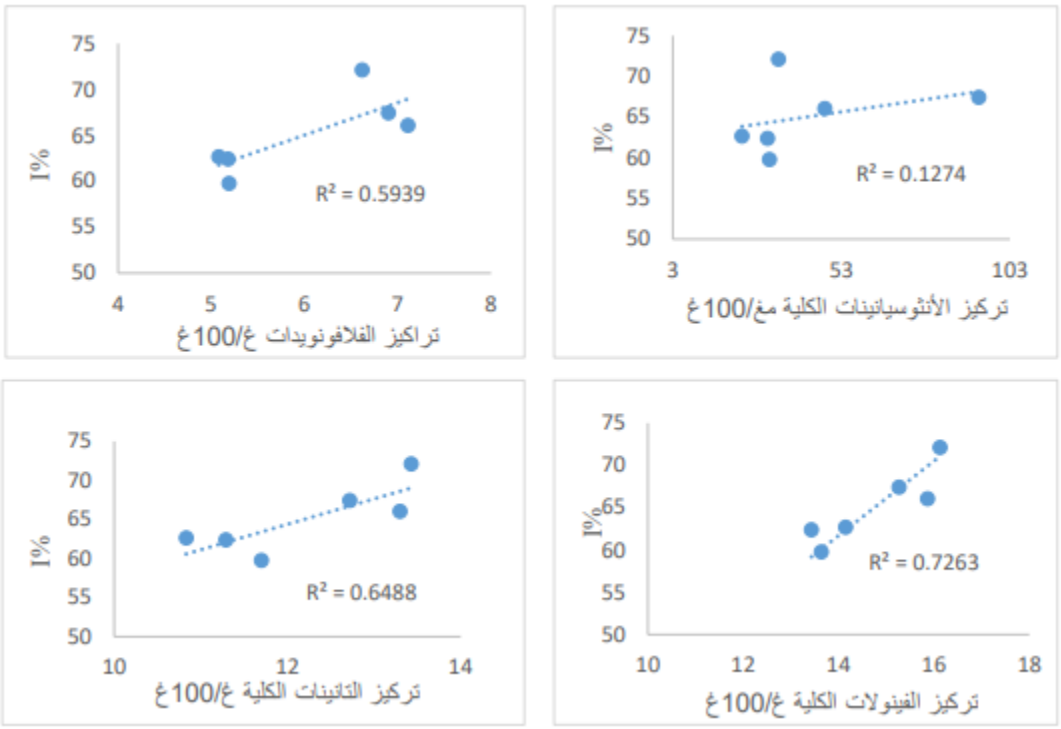
قيست القدرة المضادة للتأكسد، وفق اختبار الـDPPH، لمستخلصات قشور الرمان الناتجة عند الاستخلاص بطريقتي الأمواج فوق الصوتية والحاضنة الهزازة. يظهر الشكل (3) نتائج هذا الاختبار.



الشكل (3): فعالية مستخلصات قشور الرمان في كسح جذر الـDPPH عند إجراء الاستخلاص بطريقتي الأمواج فوق الصوتية والحاضنة الهزازة (200 دورة / دقيقة) عند درجة حرارة 40°C خلال 15 دقيقة.

بلغت نسبة كسح جذور الـ DPPH 90% و60%، تقريباً، لمستخلصات قشور الرمان الناتجة عند الاستخلاص بالحاضنة الهزازة والأمواج فوق الصوتية، على الترتيب (الشكل (3)). تؤكد هذه النتيجة أن قيم تراكيز المركبات المضادة للتأكسد المستخلصة بالحاضنة الهزازة أكبر من مثيلاتها المستخلصة، بطريقة الأمواج فوق الصوتية، وهذا ما لوحظ سابقاً (الجدولين (1)). بلغت نسبة كسح الجذور الحرة في Pooja وزملائه [9] و Wang وزملائه [2] حوالي 65% لمستخلصات قشور الرمان باستعمال الإيتانول 70% والميتانول على الترتيب.

درست معاملات الارتباط (العلاقة بين تراكيز المركبات المستخلصة مع الفعالية المضادة للتأكسد) من أجل معرفة ماهي المركبات المسؤولة مباشرةً عن الفعالية الكبيرة في كسح الجذور الحرة، ورسمت المنحنيات البيانية الموافقة (الشكل (4)).



الشكل (4): المنحنيات البيانية لتغير نسبة تثبيط الجذور الحرة (I%) تغير تراكيز كلٍ من الفينولات الكلية أو التانينات الكلية أو الأنثوسيانينات الكلية أو الفلافونويدات الكلية المستخلصة بطريقة الحاضنة الهزازة باستخدام 6 مذيبات (إيتانول 70%، إيتانول 70% محمض بحمض الليمون 2%، إيتانول 70% محمض بحمض الليمون 4%، ماء مقطر، ماء مقطر محمض بحمض الليمون 2%، ماء مقطر محمض بحمض الليمون 4%).

توضح المنحنيات البيانية أن أكبر قيمة لمعامل الارتباط لوحظت من أجل الفينولات الكلية (R^2=0.7263) وأن وأصغر قيمة له سُجلت من أجل الأنثوسيانينات الكلية (R^2=0.1274) تشير هذه النتائج إلى أن الفعالية الكبيرة المضادة للتأكسد لمستخلصات قشور الرمان يمكن أن تعود إلى التانينات الكلية التي تمثل الجزء الأكبر من متعددات الفينول في قشور الرمان.

الاستنتاجات:

لوحظ، عموماً، أن طريقة الحاضنة الهزازة أفضل قليلاً من طريقة الأمواج الصوتية في استخلاص المركبات الفعالة حيوياً من قشور الرمان، سُجلت أكبر قيم لِتراكيز الفينولات الكلية والتانينات الكلية والفلافونويدات الكلية والأنثوسيانينات الكلية في المستخلصات الإيتانولية مقارنةً بالمستخلصات المائية عند الاستخلاص بكلتا الطريقتين، لم يلاحظ وجود فروق معنوية عند تحميض كلٍ من الماء المقطر والإيتانول 70% بحمض الليمون بين نتائج مردود الاستخلاص وتراكيز معظم المركبات الفعالة حيوياً المستخلصة. أبدت مستخلصات قشور الرمان فعالية كبيرة في كسح جذور الـ DPPH، بلغت ما يقارب 90% عند الاستخلاص بالحاضنة الهزازة.

المراجع

[1] A. KENNAS and H. AMELLAL- CHIBANE, "Comparison of five solvents in the extraction of phenolic antioxidants from pomegranate (Punica granatum L.) peel.," *The North African Journal of Food and Nutrition Research, 3(5), 140-147,* 2019.

[2] Z. Wang, Z. Pan and M. Haile, "Extract of Phenolics From Pomegranate Peels," *The Open Food Science Jour nal, 5, 17-25,* 2011.

[3] O. Panza, A. Conte and . M. Alessandr, "Pomegranate By-Products as Natural Preservative to Prolong the Shelf Life of Breaded Cod Stick," *Molecules , 26, 2385,* 2021.

[4] E. S ieniawska and T. Baj, "," in *Tannins*, Poland, Academic Press, 2017, pp. 199-232.

[5] A. S ingh and S. Kumar, "Applications of Tannins in Industry," in *Tannins - Structural Properties, Biological Pro perties and Current Knowledge*, 2020.

[6] G. M. Athanasia , K. Kaderides and A. G. Konstantinos , "A process for turning pomegranate peels into a val uable food ingredient using ultrasound-assisted extraction and encapsulation," *Innovative Food Science & Eme rging Technologies,31, 204-215.,* 2015.

[7] T. T. Moe, . Z. C. . S. Mon, H. H. Shwe and A. A. Myint, "Characterization and Application of Natural Dye Extracted from Rinds of Pomegranate (Punica granatum L)," *IEEE-SEM, Volume 7, Issue 8,* 2019.

[8] M. Çam and Y. Hısıl, "Pressurised water extraction of polyphenols from pomegranate peels," *Food Chemistry 123, 878–885,* 2010.

[9] P. . . Motikara, P. R. More and S. . S. Arya, "A novel, green environment-friendly cloud point extraction of poly phenols fromomegranate peels: a comparative assessment with ultrasound and microwaveeassisted extraction," *SEPARATION SCIENCE AND TECHNOLOGY*, 2020.

[10] ر. الحلبي، م. الجبة و إ. البكري، "دراسة تغير نسبة مركبات الفينول خلال مراحل نمو ثمرة الرمان السوري،" دمشق ، جامعة دمشق، 2014.

[11] J. Pinelaa, E. Pereira, . I. Jabeur and M. F. Barreiro, "Optimization of heat- and ultrasound-assisted extraction of ant hocyaninsrom Hibiscus sabdariffa calyces for natural food colorants," *Food Chemistry 275 (309-321),*2019.

[12] G. I. Peredo Pozos, M. A. Ruiz-López and J. F. Zamora Nátera, "Antioxidant Capacity and Antigenotoxic Effect ofHi biscus sabdariffa L. Extracts Obtained with Ultrasound-Assisted Extraction Process," *Applied Sciences, 0(2), 560,* 12 January 2020.

[13] A. M ekonnen and W. Desta, "Comparative study of the antioxidant and antibacterial activities of Rumex abys sinicus and Curcuma longa in Bahir Dar city, Ethiopia," *Chem. Biol. Technol. Agric. 8:2,* 2021.

[14] E. L. Amorim, J. E. Nascimento, J. M. Monteiro, T. J. S. Peixoto Sobrinho, T. A. S. Araújo and U. P. Albuquerque, "A Simple and Accurate Procedure for the Determination of Tannin and Flavonoid Levels and Some Applications in Ethnobotany and Ethnopharmacology," *Functional Ecosystems and Communities 2(1),* no. 2, pp. 88-9 4, 27 October 2008.

[15] M. Türkyılmaz, ""Anthocyanin and organic acid profiles of pomegranate (Punica granatum L.) juices from registered varieties in Turkey. ".*International journal of food science & technology 48.10 (2013): 2086-2095.*.

[16] M. Z. Koncic, A. Kremer and K. Karlovic, "Evaluation of antioxidant activities and phenolic content of Berberis vulgaris L. and Berberis croatica Horvat.," *Food and Chemical Toxicology 48(8-9),* pp. 2176-2180, 2010.

[17] A. A. Abou-Arab, F. M. Abu-Salem and E. A. Abou-Arab, "Physico- chemical properties of natural pigments (ant hocyanin) extracted from Roselle calyces (Hibiscus subdariffa)," *Journal of American Science 7(7),* pp. 445-456, 2011.

[18] P. Putnik, D. Bursać Kovačević, M. Radojčin and V. Dragović-Uzelac, "Influence of Acidity and Extraction Time on the Recovery of Flavonoids from Grape Skin Pomace Optimized by Response Surface Methodology," *Ch emi cal and Biochemical Engineering Quarterly, 30(4),* pp. 455-464, 5 December 2016.

[19] O. Gonultas and M. B. Ucar, "Chemical Composition of Some Commercial Tannins Produced in Turkey," *Inter national Convention of Society of Wood Science and Technology,* pp. 1-9, August 2012.

[20] A. Masci, A. Coccia, E. Lendaro, L. Mosca and P. Paolicelli, "Evaluation of different extraction methods from po megranate wholefruit or peels and the antioxidant and antiproliferative activity of thepolyphenolic fract ion," *Food Chemistry 202,59–69,* (2016).