دراسة تأثير الماء والإيتانول المحمضين بحمض الليمون في استخلاص ملونات والمركبات الفعالة حيويا من نبات الكركدية

صفاء محمد العامر[*] إيمان مصطفى البكري[**] فادي خضر[***]

الملخص

عين محتوى كل من متعددات الفينول والفلافونويدات والأنثوسيانينات والبروأنثوسيانيدات، ودرس القدرة على تثبيط جذر الـ DPPH والقدرة على إرجاع أيونات الحديد (FRAP) للمستخلصات الملونة من سبلات الكركدية بطريقة الهزاز المحوري وباستعمال أربعة مذيبات (الماء المقطر– الماء مقطر المحمض بحمض الليمون 2% (وزن/ حجم) – إيتانول 70% محمض بحمض الليمون 1% (وزن/ حجم) – إيتانول 70% محمض بحمض الليمون 2% (وزن/ حجم). حسبت النسب المئوية للمستخلصات الملونة، وسجل أعلى مردود لمستخلص الماء المقطر المحمض بحمض الليمون 2% حيث بلغ 66%. تميز مستخلص الإيتانول 70% المحمض بحمض الليمون 2% باحتوائه على أكبر تركيز من متعددات الفينول (22.84±2021) مغ مكافئ حمض الغاليك/100غ نبات جاف. لوحظ أكبر تركيز للفلافونويدات الكلية لمستخلص الإيتانول 70% المحمض بحمض الليمون 1% (70.80±3178) مغ مكافئ كيرستين/100غ نبات جاف. لم يلاحظ وجود فروق معنوية بين قيم تراكيز الأنثوسيانينات المستخلصة بالإيتانول 70% المحمض بحمض الليمون1% و2% والتي بلغت على الترتيب (763.3±7.16–772.9±1.239) مغ مكافئ سيانيدين–3– غلوكوزيد /100غ نبات جاف، وكذلك لم تلاحظ فروق معنوية لقيم تراكيز البروأنثوسيانيدات عند الاستخلاص بالإيتانول 70% المحمض بحمض الليمون 1% و2% والتي بلغت على الترتيب (48.71±1.28–50.45±1.64) مغ مكافئ كلور السيانيدين

[*] طالبة ماجستيرقسم الكيمياء، كلية العلوم، جامعة دمشق، سورية.

[**] الأستاذ المشرف قسم الكيمياء، كلية العلوم، جامعة دمشق، سورية.

[***] الأستاذ المشرف المشارك قسم الكيمياء، كلية العلوم، جامعة دمشق، سورية.

/100غ نبات جاف. تشابه كل من مستخلصي الإيتانول 70% المحمض بحمض الليمون 1% والماء المقطر المحمض بحمض الليمون 2% بالقدرة على كبح أكبر للجذور الحرة وفق اختبار الـ DPPH، في حين لم يسجل اختبار الـFRAP أية فروق معنوية عند الاستخلاص بالمذيبات الأربعة.

الكلمـات المفتاحيـة: الكركديـة — البروأنثوسـيانيدات – الأنثوسـيانينات – حمـض الليمـون – الهزاز المحوري.

Study the Effect of Acidified water and ethanol by Citric Acid on of Colorants and Bioactive Compounds Extraction from *Hibiscus Sabdariffs*

Safaa M. Al-Amer* **Dr. Iman M. Al-Bakri****

Dr. Fadi Kheder***

Abstract

The content of polyphenols, flavonoids, anthocyanins and proanthocyanides were determined. Along with that ability to inhibit DPPH radical and the ability to reduce iron ions (FRAP) for colored extracts of *Hibiscus* by axial shaking method and four solvents for extraction were used (distilled water - distilled water acidified with citric acid 2% (w/v)- ethanol 70% acidified with citric acid 1% (w/v) - ethanol 70% acidified with citric acid 2% (w/v)). The percentages of extracted colourants was calculated. The highest colorant yield measured for distilled water acidified with citric acid 2%,reaching 66%. The extract of ethanol 70% acidified with citric acid 2% distinguished having the largest concentration of polyphenols (2021±22.84) mg equivalent gallic acid /100 g dry plant. The highest concentration of total flavonoids was observed ethanol 70% acidified with citric acid 1% (3178 ±70.80) mg equivalent quercetin /100 g dry plant, No significant differences were observed between anthocyanins concentrations extracted with ethanol 70% acidified with 1% and 2% citric acid, whic were (763.3 ±7.16 , 772.9± 1.239) mg equivalent cyanidin-3-glucoside, 100g of dry plant, respectively. No significant differences were observed between proanthocyanides concentrations

* MSC., Student, Department of Chemistry, Facutly of sciences, Damascus

** Superviser, Student, Department of Chemistry, Facutly of sciences, Damascus.

*** Associated superviser, Student, Department of Chemistry, Facutly of sciences,Damascu

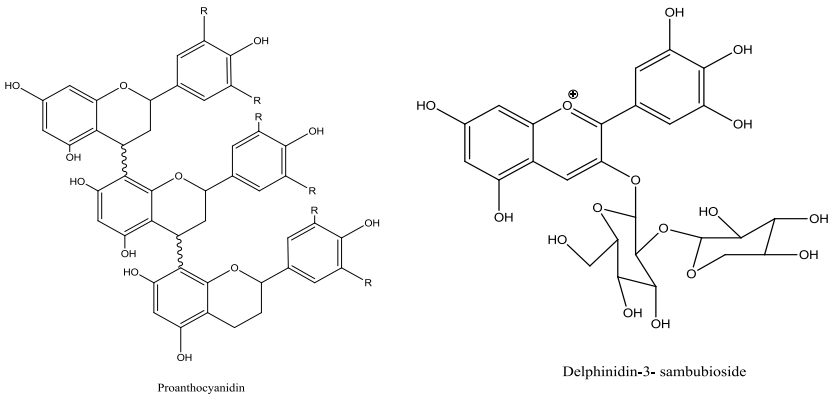
extracted with ethanol 70% acidified with 1% and 2% citric acid, which were (48.71 ± 1.28, 50.45 ± 1.64) mg chlorine cyanidin equivalent / 100 g dry plant, respectively. Both extracts of ethanol 70% acidified with citric acid 1% and distilled water acidified with citric acid 2% were similar in radical- scavenging activity measured by DPPH test, compared to the FRAP test, which did not show any significant differences when extracting four solvent used.

Key words: *Hibiscus sabdariffa L.* - Proanthocyanides - Anthocyanins - Citric Acid - Axial shaking.

المقدمة:

يُعدُّ الكركدية (*Hibiscus sabdariffa L*) من النباتات الموسمية الذي ينتمي إلى عائلة (Malvaceas)، ينمو في المناطق الإستوائية وشبه الإستوائية ويزرع على نطاق واسع في وسط وغرب أفريقيا وجنوب شرق آسيا حيث يتوفر المناخ الدافئ والرطب الذي يساعد على زراعته[1]. يستغرق الكركدية حتى ينضج حوالي ستة أشهر، ولاينصح بزراعته في المناطق الباردة المعرضة للصقيع [2]. أُستعمل الكركدية منذ القدم أساساً في تحضير المشروبات الساخنة والباردة [1]. استعملت أجزاء مختلفة من الكركدية في الطب التقليدي للوقاية من أمراض القلب والأوعية الدموية والكبد والحمى [2]، كما أُستعملت كمضادٍ للالتهاب ومضاد للجراثيم [3]. أظهرت الدراسات قدرة الكركدية على خفض ضغط الدم وتحسين أداء الجهاز الهضمي، كما يُعدُّ علاجاً فعالاً لمرضى حصى الكلى [2].

يتميز المستخلص المائي للكركدية بلون أحمر لامع ومذاق حمضي لطيف، يعود هذا المذاق لاحتوائه على العديد من الحموض العضوية كحمض الليمون [4]. يُعدُّ الكركدية مصدراً غنياً بالألياف الغذائية والفيتامينات والمعادن [4]، فضلاً عن دوره المهم كمضادٍ للتأكسد بسبب احتوائه على المركبات الفينولية والفلافونويدات كالأنثوسيانينات والتانينات وغيرها من المركبات الفعالة حيوياً [5].



الشكل (1): الصيغة العامة للبروأنثوسيانيدات واحدى مركبات الأنثوسيانينات في سبلات الكركدية

تُعد الأنثوسيانينات مسؤولة عن اللون الأحمر والأرجواني والأزرق الذي يظهر في الأزهار والفواكه وأجزاء أخرى من النبات [3]. تتمتع الأنثوسيانينات بطابع قطبي يجعلها قابله للذوبان في العديد من المذيبات القطبية كـ الماء والإيتانول والميتانول والأستون والمذيبات القطبية المحمضة [4].

ازداد الاهتمام مؤخراً باستخلاص الملونات من المصادر الطبيعية كبديلٍ هامٍ للملونات الغذائية الصناعية التي تم حظرها في الأطعمة، حيث تتميز هذه الملونات الطبيعية بكونها مركبات حيوية يمكن الاستفادة منها كمكملات غذائية ويمكن استخدامها في منتجات الأدوية ومستحضرات التجميل [6]. يعتمد استخلاص المركبات الفعالة حيوياً من المصادر الطبيعية على عدة عوامل، كالتقانة المستعملة بالاستخلاص ونوع المذيب المستعمل وسرعة التحريك ونسبة المذيب إلى المذاب وزمن الاستخلاص ودرجة الحرارة [6]، وتُعدُّ طريقة استخلاص سائل – صلب الطريقة الأكثر شيوعًا [3].

عينAbou-Ara وزملاؤه [5] تركيز كل من الأنثوسيانينات ومضادات التأكسد في مستخلصات الكركدية المحضرة بالطريقة التقليدية بالنقع عند درجة الحرارة 4°C طوال الليل باستعمال أربعة مذيبات (الماء المقطر– الماء المقطر المحمض بحمض الليمون

2%- إيتانول محمض بحمض الليمون 1%- إيتانول محمض بحمض كلور الماء 1.5 مول/ل)، أجر Paraı´so وزملاؤه [7] استمثالا لطريقة استخلاص الأنثوسيانينات والفينولات الكلية من الكركدية باستعمال الأمواج فوق الصوتية بتغيير تركيز الإيتانول ودرجة الحرارة والزمن. طبق Cassol وزملاؤه [8] طريقة الاستخلاص بالمايكرويف باستعمال الماء المقطر والماء المقطر المحمض بحمض الليمون 2% كمذيبات، واستعمل Méndez Camelo- وزملاؤه [9] طريقة الهزاز المحوري (200 دورة/ دقيقة) في استخلاص الأنثوسيانينات لمدة 24 ساعة في الظلام باستعمال الماء المقطر والإيتانول المحمض بحمض كلور الماء 0.1 مول/ل.

اعتمدت العديد من الدراسات على تحميض المذيبات من أجل زيادة كفاءة عملية استخلاص المركبات الفعالة حيوياً من الكركدية [5،7-9]. يعد حمض الليمون من أحد الحموض المفضلة كونه مادة حافظة طبيعية وآمنة تدخل في الصناعات الغذائية، وله دور مهم في استخلاص المركبات الفعالة (الأنثوسيانينات – متعددات الفينول – البروأنثوسانيدات) من الجُدر الخلوية للكركدية [10].

تهدف هذه الدراسة إلى استخلاص الملونات من الكركدية (استخلاص لمرة واحدة) باستعمال الهزاز المحوري، ودراسة تأثير إضافة حمض الليمون إلى الماء المقطر- الإيتانول 70% كمذيبين في عملية الاستخلاص، بالإضافة إلى تعيين بعض المركبات الفعالة حيوياً (الأنثوسيانينات الكلية Total anthocyanins(TA)- متعددات الفينول Total phenolics(TP)-الفلافونويدات الكلية Total(TF) Flavonoids – البروأنثوسيانيدات Proanthocyandin(Pro))، القدرة على تثبيط جذر الـ DPPH والقدرة على إرجاع أيونات الحديد (FRAP) للمستخلصات الملونة.

مواد البحث وطرائقه

1- المواد والأدوات والأجهزة المستعملة:

تم شراء سبلات الكركدية المجففة من السوق المحلي في مدينة دمشق. طحنت في مطحنة كهربائية وحفظت في عبوة عاتمة عند درجة حرارة 4°C.

- **المواد الكيميائية:**

إيتانول (95%) وخلات الصوديوم (99%) من شركة panreac، حمض الغاليك (99%) و 2،2- ثنائي فينيل بيكريل هيدرازيل DPPH و معياري كيرستين (98%) من شركة Sigma Aldrich، كاشف فولين سيوكالتو من شركة Fluka، كربونات الصوديوم اللامائية (99%) وكبريتات الحديد الثنائي والأمونيوم وكلوريد الألمنيوم (99%) وحمض الأسكوربيك (99.7%) من شركة deHaen-Riedel، حمض الليمون أحادي الماء (99.5%) من شركة Shamlab، فري سيانيد البوتاسيوم(99%) من شركةPince، نتريت الصوديوم (99%) وكلوريد الحديد وفوسفات الصوديوم الحامضية من شركة Merck، ثلاثي كلور حمض الخل من شركة BDH.

- **الأجهزة:**

جهاز قياس pH نوع (Bench Meter). ميزان حساس (Precisa-240A)، مجفف كهربائي،

هزاز محوري (SCILOGEX, SK-L330-Pro)، جهاز الطيف الضوئي المرئي وفوق البنفسجي (Optizen3320 UV-VIS)، مطحنة كهربائية (Kenwood,220-240V,50/60HZ,170 W).

مازج رجاج (velp scientifica:code F202A0173,V:12v,W:15) Vortex.

2- طريقة الاستخلاص:

أجري استخلاص الملونات من سبلات الكركدية باستعمال الهزاز المحوري (250 دورة/ دقيقة) لمدة 20 ساعة عند درجة حرارة الغرفة. وضع 4 غ من سبلات الكركدية المطحونة في عبوة زجاجية عاتمة سعة 250 مل وأضيف إليه 100 مل من أحد المذيبات التالية:

- إيتانول 70% محمض بحمض الليمون 2%.
- إيتانول 70% محمض بحمض الليمون 1%.

- ماء مقطر محمض بحمض الليمون 2%.
- ماء مقطر.

3- مردود الملونات الجافة:

عين مردود المستخلصات الملونة وذلك بأخذ 1 مل من كل مستخلص وتجفيفه بالمجفف الكهربائي حتى ثبات الوزن عند درجة الحرارة 40 (لم تطبق درجات حرارة أكبر خوفا من تدرك الأنثوسيانينات المسؤولة عن اللون).

4- الكشف الكيفي عن الفلافونويدات والتانينات في المستخلصات الملونة:

4-1 الكشف عن الفلافونويدات:

يضاف للمستخلص الملون معدن المغنزيوم ويتبعه الايتانول المحمض بحمض كلور الماء والكحول الإيميلي يظهر اللون البرتقالي في حال وجود الفلافونويدات [12].

4-2 الكشف عن التانينات:

يضاف للمستخلص الملون محلول كلوريد الحديد 1%، يظهر اللون الأخضر في حالة وجود التانينات [12].

5- تعيين المحتوى الكلي للأنثوسيانينات:

عينت الأنثوسيانينات وفق طريقة تغير الـ pH [11]، باستعمال محلوليين موقيين الأول: pH=1 (بمزج 125 مل من 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 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 0.2 مل من كل مستخلص مع 3.8 مل من أحد المحلولين الموقيين وقيست الامتصاصية عند طول الموجة 510 نانومتر، أعيدت التجربة باستخدام المحلول الموقي الآخر ثمّ حسبت الامتصاصية A وفق العلاقة (1).

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

حسب تركيز الأنثوسيانينات الكلية(مغ/ل) من العلاقة (2) كمكافئات من السيانيدين-3-غلوكوزيد

$$\text{Total}_{\text{Anthocyanins}} = (A \times M_W \times Df \times 1000) / \varepsilon_0 \quad (2)$$

حيث: A: الامتصاصية (العلاقة (1))

Df : معامل التمديد

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

ε_0: الامتصاصية المولية لسيانيدين-3- غلوكوزيد وقدرها 26900 لتر/مول.سم

6- تعيين المحتوى الكلي لمتعددات الفينول(TP):

عُينت متعددات الفينول الكلية باستعمال طريقة الفولين، وهي طريقة لونية تستعمل كاشف فولين سيكالتو الذي يتألف من مزيج حمض فوسفوتنغستن وحمض فوسفومولبيدن ($H_3PM_{12}O_{40}+H_3PW_{12}O_{40}$). يتفاعل الكاشف المذكور مع مجموعات الهيدروكسيل الفينولية مشكلاً معقداً أزرق اللون تُقاس امتصاصيته عند 765 nm [13].

طريقة العمل:

أخذ 1 مل من كل مستخلص بعد التمديد بالإيتانول 70% عشر مرات، ومزج مع 1 مل من الماء المقطر و5 مل من كاشف فولين (10%). أضيف بعد 8 دقائق 4 مل من كربونات الصوديوم (7.5غ/100مل ماء مقطر) ومزجت العينة بالمازج الرجاج ثم تركت 90 دقيقة عند درجة حرارة الغرفة [1]. قيست بعد ذلك امتصاصية العينة باستعمال جهاز الطيف (UV-VIS) عند طول الموجة 765 نانومتر. استقرئت قيم التراكيز بالاستفادة من سلسلة معيارية محضرة بالطريقة نفسها بتراكيز من حمض الغاليك في الإيتانول 70%(10-100مغ/ل). تم التعبير عن تراكيز الفينولات مغ مكافئ حمض الغاليك /100 غ نبات جاف، حيث المعادلة الخطية للسلسة المعيارية $y=0.0093x$ و $R^2=0.9995$.

7- تعيين الفلافونويدات الكلية (TF):

تتفاعل الفلافونويدات الكلية مع أيون الألمنيوم في وسط قلوي مشكلة معقدا أحمر اللون تقاس امتصاصيته عند طول الموجة nm510، وعينت وفق لطريقة Martos وزملائه مع بعض التعديلات [14].

طريقة العمل:

أخذ 1 مل من كل مستخلص بعد تمديده بالإيتانول 70% عشر مرات ومزج مع 0.3 مل من نتريت الصوديوم (5%)، ثم وضعت العينات في الظلام مدة 5 دقائق. أضيف لها بعد ذلك 0.3 مل من كلوريد الألمنيوم (10%)، ثم أضيف بعد 6 دقائق 0.5 مل من هيدروكسيد الصوديوم(1مول/ل) تركت العينات في الظلام مدة 15 دقيقة ثم قيست امتصاصيتها عند 510 نانومتر. استقرئت قيم التراكيز بالاستفادة من سلسلة معيارية محضرة بالطريقة نفسها باستعمال تراكيز من الكيرستين في الإيتانول 70%(10–250 مغ/ل). تم التعبير عن تراكيز الفلافونويدات مغ مكافئ كيرستين /100غ نبات جاف، حيث المعادلة الخطية للسلسة المعيارية $y=0.0032x$ و $R^2=0.9977$.

8- تعيين محتوى البروأنثوسيانيدات:

تعتمد طريقة تعيين البروأنثوسيانيدات على الإنشطار المؤكسد، حيث يتم تفكيك بوليمير البروأنثوسيانيدين وتحوله إلى مونوميرات بعملية إزالة البلمرة المؤكسدة لتعطي الأنثوسيانيدات[16].

طريقة العمل:

وضع في أنبوب زجاجي مزود بغطاء 0.5 مل من كل مستخلص ممدد بالإيتانول 70% عشر مرات ومزج مع 3 مل من محلول البوتانول المحمض بحمض كلور الماء المركز (95:5 حمض كلور الماء المركز: بوتانول). أضيف إلى المزيج 0.1 مل من كبريتات الحديد الثنائي والأمونيوم*.

وضع الأنبوب بعد تحريكه واغلاقه في حمام مائي درجة حرارته 85°C لمدة 60 دقيقة. بردت العينة وقيست امتصاصيتها عند طول الموجة 550 nm. حسب تركيز البروأنثوسيانيدات (مغ/ل) من العلاقة (3) كمكافئات من كلور السيانيدين.

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

حيث: A: الامتصاصية

Df : معامل التمديد

M_w: الكتلة المولية لكلور السيانيدين وقدرها 287.24 غ/مول

ε_0: الامتصاصية المولية لكلور السيانيدين وقدرها 34700 لتر/مول. سم

***(حضرت كبريتات الحديد الثنائي والأمونيوم بإضافة 2 غ منه إلى 100 مل من حمض كلور الماء(2 مول/ل))**

9- تعيين الفعالية الكاسحة للجذور الحرة (اختبار الـ DPPH)

يعتمد مبدأ الاختبار على التغير اللوني لجذر الـ DPPH، حيث يتحول من اللون البنفسجي إلى اللون الأصفر الفاتح عند ارتباطه بجذر هيدروجين تمنحه المركبات المضادة للتأكسد. تقاس امتصاصية العينات المدروسة عند الطول الموجي 517 نانومتر [17].

طريقة العمل:

مزج 0.1 مل من العينة مع 3.9 مل من محلول الـ DPPH (50 مغ/ل محضر في إيتانول 99%)، تركت العينة في الظلام مدة 30 دقيقة، حسبت قدرة المستخلصات على كسح الجذور الحرة $I\%$ بالاعتماد على العلاقة (4) [18].

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

حيث : A_{Contro} : امتصاصية الشاهد ، A_{sample} : امتصاصية العينة.

حضر الشاهد بمزج 0.1 مل من الإيتانول 70% مع 3.9 مل من محلول الـ DPPH.

10- تعيين القدرة الإرجاعية (اختبار FRAP):

تعتمد هذه الطريقة على تشكل معقد أزرق بروسيا حيث يقيس هذا الاختبار قدرة المركبات المضادة للتأكسد على إرجاع الحديد الثلاثي إلى حديد ثنائي [19]. قيست القدرة الإرجاعية للعينات وفقا للطريقة التي اتبعها Maksimovic مع بعض التعديلات [15].

طريقة العمل:

أضيف إلى 0.5 مل من كل مستخلص ممدد بالإيتانول 70% عشر مرات مقدار 1.25 مل من محلول موقي فوسفاتي (pH=6.6). مزجت العينات جيدا ثم أضيف إلى كل منهما 1.25 مل من محلول فري سيانيد البوتاسيوم (1%) وحضنت عند الدرجة 50°C لمدة 20 دقيقة. أضيف بعد ذلك 1.25 مل من ثلاثي كلور حمض الخل(10%) ومزجت العينات جيدا. سحب 1.25 مل من كل عينة وأضيف إليها 1.25 مل من الماء المقطر و0.25 مل من محلول كلوريد الحديد الثلاثي (0.1%) ومزجت جيدا. قيست امتصاصية المحلول عند طول الموجة 700 نانومتر. استقرئت قيم التراكيز بالاستفادة من سلسلة معيارية محضرة بالطريقة نفسها بتراكيز من حمض الأسكوربيك (0–120مغ/ل). تم التعبير عن القدرة الإرجاعية مغ مكافئ حمض اسكوربيك /100غ نبات جاف، حيث المعادلة الخطية للسلسة المعيارية $y=0.0066\ x$ و $R^2=0.997$.

11- التحليل الإحصائي:

استعمل برنامج IBM SPSS Statistic23 لمعالجة النتائج، وهي حزمة برمجية للتحليل الإحصائي وإدارة البيانات. كُررت كل تجربة 5 مرات (n=5) لجميع النتائج باستثناء النشاط المضاد للتأكسد (DPPH) والمردود المئوي للمستخلصات الملونة حيث n=3. حُسبت المتوسطات الحسابية والانحرافات المعيارية والفروق المعنوية بين المتوسطات بمجال ثقة 95% (P=0.05).

النتائج والمناقشة

1- تعيين نسبة المستخلص الملون الجاف وتركيز كل من الأنثوسيانينات والبروأنثوسيانيدات:

تحوي الملونات المستخلصة من سبلات الكركدية على الأنثوسيانينات التي تتميز بانحلاليتها في الماء وفعاليتها المضادة للتأكسد كما تتميز البروأنثوسيانيدات بأهميتها كمضاد للتأكسد [3].

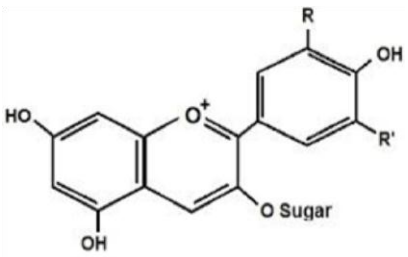
قيست النسب المئوية للملونات الجافة الناتجة عن الاستخلاص باستخدام المذيبات الأربعة (الماء مقطر – الماء مقطر المحمض بحمض الليمون 2%–إيتانول 70% محمض بحمض الليمون 1%–إيتانول 70% محمض بحمض الليمون 2%)، بطريقة الهزاز المحوري 250 دورة / دقيقة، t=20 ساعة،T 25= ℃ وكذلك عين تراكيز كل من الأنثوسيانينات والبروأنثوسيانيدات في 100غ نبات جاف.

الجدول (1): تعيين النسب المئوية للمستخلص الملون الجاف (%) وتركيز الأنثوسيانينات والبروأنثوسيانيدات في المستخلصات (المتوسط الحسابي ± الانحراف المعياري ((5=n،0.05=P)

المذيب	النسبة المئوية للمستخلص الملون (غ/100غ)	تركيز الأنثوسيانينات (مغ مكافئ سيانيدين-3-غلوكوزيد/100غ نبات جاف)	تركيز البروأنثوسيانيدات (مغ مكافئ كلوريد السيانيدين/100غ نبات جاف)
ماء مقطر	2.51 ± 59.1^{a}	6.01 ± 518.6^{a}	2.08 ± 26.8^{a}
ماء مقطر محمض بحمض ليمون 2%	$4.07\pm66.3^{b,a}$	7.04 ± 578.1^{b}	1.85 ± 33.4^{b}
إيتانول 70 % محمض بحمض الليمون 1%	3.36 ± 45.0^{c}	7.16 ± 763.3^{c}	1.28 ± 48.7^{c}
إيتانول 70%محمض بحمض الليمون 2%	$2.55\pm55.4^{d,a}$	1.23 ± 772.9^{c}	1.64 ± 50.4^{c}

يدل اختلاف الحروف d,c,b,a عن بعضها البعض ضمن العمود الواحد إلى وجود فروق معنوية بين القيم، ويدل اجتماع حرفين a,b وa,d في العمود الأول إلى تشابه كل منهما مع الحرف a لكن عدم تشابههما مع بعضهما البعض،استنادا إلى برنامج الـ SPSS.

يلاحظ من نتائج الجدول (1) أن أكبر نسبة للمستخلص الملون الجاف سجلت عند استعمال الماء المقطر المحمض بحمض الليمون 2% كمذيب للاستخلاص (66.31%) تليها القيم الناتجة عن استعمال الماء المقطر فالإيتانول المحمض بحمض الليمون 2% ثم الإيتانول المحمض بحمض الليمون1%. يظهر الجدول (1) أيضا أن أكبر قيمة لتركيز الأنثوسيانينات والبروأنثوسيانيدات سجلت لمستخلص الإيتانول 70% المحمض بحمض الليمون 2%حيث بلغت 772.9 (مغ/100غ) و50.45 (مغ/100غ) على الترتيب. لم يلاحظ فروق معنوية بين هذه القيم والقيم الناتجة عن الاستخلاص بالإيتانول 70% المحمض بحمض الليمون 1%. سجل المستخلصان المائيان (ماء مقطر – ماء مقطر محمض بحمض الليمون 2%) تراكيز أقل من الأنثوسيانينات والبروأنثوسيانيدات مع نسبة أكبر في المستخلص المائي المحمض بحمض الليمون 2% مقارنة بمستخلص الماء المقطر. أفادت الدراسات أن قطبية المذيبات تؤثر بشدة على زيادة مردود الاستخلاص للمركبات الفعالة حيويا من الكركدية، حيث تؤثر المذيبات القطبية في طبيعة وكمية المركبات الكيميائية المستخلصة [20]. أكدت نتائج الجدول (1) أن لحمض الليمون دورا مهما في زيادة تركيز كل من الأنثوسيانينات والبروأنثوسيانيدات، يتوافق ذلك مع نتائج الدراسة التي أجراهاPutnik وزملاؤه التي أظهرت أن زيادة نسبة الحمض المضاف إلى المذيب يزيد من تركيز البروأنثوسيانيدات[21]، وقد يعود السبب في ذلك إلى أن الحمض له دور في حلمهه الجدر الخلوية لسبلات الكركدية ما يزيد من فرصة تحرر المركبات المدروسة من أماكن وجودها في الخلية [5,4]، ويساعد الحمض من جهة أخرى على إذابة الأنثوسيانينات وتثبيتها وفق الشكل الأكثر استقرارا لها وهو أيون الفلافيليوم [21,5,4].



الشكل (2): أيون الفلافيليوم (الشكل الأكثر استقرارا للأنثوسيانينات)

تؤكد مقارنة هذه الدراسة مع الدراسات المرجعية أن عملية استخلاص الأنثوسيانينات والبروأنثوسيانيدات تتوقف على التقانة المستعملة للاستخلاص وعلى طبيعة المذيب المستعمل وزمن الاستخلاص ودرجة الحرارة [1]. تعتمد العديد من الدراسات التي تهدف الى استخلاص ملونات طبيعية لاستعمالها في الصناعات الغذائية والدوائية على استعمال مذيبات آمنة بيئيا كالماء والإيتانول.

الجدول (2): مقارنة بين نتائج تركيز الأنثوسيانينات للدراسة الحالية مع بعض الدراسات المرجعية

المرجع	المذيبات	طريقة الاستخلاص	تركيز الأنثوسيانينات (مغ/100غ نبات جاف)
[6]	ماء مقطر	النقع طوال الليل عند درجة حرارة 4 °C بتكرار عملية الاستخلاص 4 مرات	545
	إيتانول محمض بحمض الليمون 1%		693
	ماء مقطر محمض بحمض الليمون 2%		1063
	إيتانول محمض بحمض كلور الماء (N 1.5)		1386
[9]	ماء مقطر	الهزاز المحوري في الظلام 200 دورة / دقيقة مدة 24 ساعة عند درجة حرارة الغرفة	1730
	إيتانول محمض بحمض كلور الماء (M 0.1)		3220
الدراسة الحالية	ماء مقطر	الهزاز المحوري 250 دورة / دقيقة، مدة 20ساعة عند درجة حرارة الغرفة	518.6
	ماء مقطر محمض بحمض الليمون 2%		578.1
	إيتانول 70% محمض بحمض الليمون 1%		763.3
	إيتانول 70% محمض بحمض الليمون 2%		772.9

يوضح الجدول (2) مقارنة بين قيم تراكيز الأنثوسيانينات الواردة في بعض الدراسات المرجعية وبين مثيلتها في هذا البحث، قام Camelo–Mendez وفريق عمله باستخلاص الأنثوسيانينات من الكركدية باستعمال طريقة الهزاز المحوري (200 دورة/ دقيقة) في الظلام مدة 24 ساعة عند درجة حرارة الغرفة [9] تتوافق نتائج الدراسة تلك مع نتائج هذا البحث حيث لوحظ زيادة تركيز الأنثوسيانينات عند استعمال الإيتانول المحمض كمذيب مقارنة بالماء المقطر (الجدول 2). يجدر الإشارة إلى أن تركيز الأنثوسيانينات المقاس وفق طريقة Camelo–Mendez يزيد على القيمة الناتجة في هذا البحث سواء باستعمال الماء المقطر أو الإيتانول المحمض كمذيب حيث يمكن أن يكون السبب وراء ذلك إلى أن عملية الاستخلاص التي اعتمدها Camelo–Mendez جرت في الظلام من جهة، بالإضافة إلى استعمال حمض كلور الماء (0.1 مول/ل) لتحميض الإيتانول ومن جهة أخرى. الأمر الذي ساعد في تعزيز تحرر الأنثوسيانينات من الجدر الخلوية. تشير أبحاث عدة إلى أن استعمال الحموض القوية للاستخلاص قد تسبب تدرك للأنثوسيانينات وغيرها من المركبات الفعالة حيويا [4،5].

2- تعيين متعددات الفينول(TP) والفلافونويدات الكلية (TF) في المستخلصات الملونة:

تقسم متعددات الفينول إلى عدة مجموعات ومنها الفلافونويدات والتي تعد من أهم مضادات التأكسد الموجودة في كثير من النباتات. قيست كميا متعددات الفينول والفلافونيدات الكلية.

الجدول (3): تعيين محتوى متعددات الفينول(TP) (مغ /100غ نبات جاف) والفلافونويدات الكلية (TF)(مغ/100غ نبات جاف) في مستخلصات الكركدية الأربعة

المذيب	TP مغ مكافئ حمض الغاليك/100غ نبات جاف	TF مغ مكافئ الكيرستين /100غ نبات جاف
ماء مقطر	24.25 ± 1452^{a}	48.19 ± 2756^{a}
الماء المقطر المحمض بحمض ليمون 2%	23.48 ± 1658^{b}	72.71 ± 2086^{b}
إيتانول70% محمض بحمض الليمون 1%	35.31 ± 1922^{c}	70.80 ± 3178^{c}
إيتانول70% محمض بحمض الليمون 2%	22.84 ± 2021^{d}	76.46 ± 2971^{d}

يدل اختلاف الحروف d,c,b,a عن بعضها البعض ضمن العمود الواحد إلى وجود فروق معنوية بين القيم، استنادا إلى برنامج الـ SPSS.

يلاحظ في الجدول (3) ازدياد قيم الـTP في المستخلصات الملونة: إيتانول70% محمض بحمض ليمون 2% > إيتانول70% محمض بحمض ليمون 1%> ماء محمض بحمض ليمون 2% > ماء مقطر. تعزى هذه الزيادة في TP إلى اختلاف خصائص المذيبات المستعملة واختلاف قطبيتها[1].

تشير الدراسات المرجعية إلى أن تركيز متعددات الفينول يزداد عادة في الوسط الحمضي [22]، حيث غالبا ماترتبط الفينولات مع البروتينات أو السكريات أو مركبات عضوية أخرى، فيعمل الوسط الحمضي على حلمهه الرابطة وتحرير الفينولات عن هذه المركبات، ما يزيد من تركيز متعددات الفينول في وسط الاستخلاص [1،22]. تتوافق هذه النتائج من حيث ازدياد تركيز الفينولات بوجود الوسط الحمضي مع النتائج التي توصل إليها Abo–Arab وزملاؤه [5]، وكذلك مع بحث Putnik وفريق عمله الذي درس تأثير المذيبات المحمضة على قشور العنب حيث وجد أن حموضة المذيبات تسهل من انتقال المركبات الفعالة حيويا إلى وسط الاستخلاص [21].

بلغت من جهة أخرى أكبر قيمة لتركيز الفلافونويدات الكلية (3178) مغ/100غ وذلك في مستخلص الإيتانول 70% المحمض بحمض ليمون 1%، بينما سجلت قيمة أقل لها عند زيادة تركيز الحمض إلى 2% (الجدول3)، يلاحظ الأثر السلبي للحمض على تركيز الفلافونويدات في مستخلص الماء المقطر أيضا حيث نقصت قيمته من 2756 مغ/100غ إلى 2086 مغ/100غ لمستخلص الماء المقطر والماء المقطر المحمض بحمض الليمون 2% على الترتيب. ويبقى مع ذلك استخلاص الفلافونويدات أفضل بوجود الإيتانول 70% مقارنة بالماء المقطر، تشير دراسات عديدة إلى ازدياد تركيز الفلافونويدات في المذيبات المحمضة وهذا يعاكس ماتوصلنا إليه في هذا البحث وقد يعزى ذلك إلى اختلاف طريقة تعيين الفلافونويدات، حيث اتبع Putnik وفريق عمله الطريقة التي تعتمد على منظومة ($AlCl_3$–CH_3COOK)، بينما اتبع في هذا البحث الطريقة التي تعتمد على منظومة ($AlCl_3$–$NaNO_2$–OH^-)، ويجدر الإشارة إلى أن طريقة Putnik وفريق عمله المطبقة على قشور العنب لم تنجح مع مستخلصات الكركدية بسبب تداخل أدى إلى تعقيد كلوريد الألمنيوم مع الأنثوسيانينات [23].

3- دراسة القدرة المضادة للتأكسد للمستخلصات الملونة وفق اختباري الـ FRAP والـ DPPH:

تعتمد القدرة المضادة للتأكسد على كمية ونوع الفينولات وعلى الفلافونويدات التي تعد من مضادات التأكسد الرئيسة وأهمها المركبات المسؤولة عن اللون (الأنثوسيانينات)، إلى جانب التانينات والحموض الفينولية والتي تعد جميعها مسؤولة عن الفعل المضاد للتأكسد [1]

الجدول (4): دراسة القدرة المضادة للتأكسد للمستخلصات الملونة وفق اختباري الـ DPPH والـFRAP

المذيب	كبح الجذور الحرة (% *I*) DPPH	القدرة الإرجاعية FRAP (مغ مكافئ حمض الأسكوربيك/100غ نبات جاف)
ماء مقطر	1.96 ± 65.44^{a}	27.26 ± 2153^{a}
ماء مقطر محمض بحمض ليمون 2%	0.86 ± 82.09^{b}	37.30 ± 2159^{a}
إيتانول 70% محمض بحمض الليمون 1%	1.43 ± 80.75^{b}	60.82 ± 2240^{a}
إيتانول 70% محمض بحمض الليمون 2%	2.74 ± 70.47^{c}	67.25 ± 2215^{a}

يدل اختلاف الحروف c,b,a عن بعضها البعض ضمن العمود الواحد في الجدول إلى وجود فروق معنوية بين القيم، استنادا إلى برنامج الـ SPSS.

يعد اختبار الـ DPPH من الاختبارات المهمة التي تعبر عن قدرة المستخلصات النباتية على كبح الجذور الحرة. يوضح الجدول (4) نتائج فعالية المستخلصات في كبح الجذور الحرة باختلاف المذيب المستعمل للاستخلاص، يلاحظ أن مستخلص الماء المقطر المحمض يساعد في زيادة كسح جذور الـ DPPH بنسبة أكبر من مستخلص الماء المقطر غير المحمض (الجدول 4). يمكن أن يعزز وجود حمض الليمون في المستخلص المائي من استخلاص حمض الأسكوربيك الموجود في الكركدية والذي يعد مضاد تأكسد طبيعي يساهم في زيادة كبح الجذور الحرة [5]. لم تلاحظ هذه النتيجة في المستخلص الإيتانولي حيث أدت زيادة نسبة الحمض إلى إنقاص قدرة هذا المستخلص على كسح جذور الـ DPPH.

درست القدرة الإرجاعية للمستخلصات وفق اختبار الـ FRAP، تقاربت نتائج القدرة الإرجاعية لجميع المستخلصات، ولم تسجل فروق معنوية بين القيم عند الاستخلاص بالمذيبات الأربعة.

الاستنتاجات

طبقت طريقة الاستخلاص باستعمال الهزاز المحوري في هذا البحث ضمن الشروط التالية (درجة حرارة الغرفة، 20 ساعة، 250 دورة / دقيقة) وباستعمال نوعين من المذيبات الآمنة بيئيا (ماء– إيتانول 70%) بهدف استخلاص ملونات طبيعية من الكركدية(الأنثوسيانينات – التانينات) تتميز بغناها بالمركبات المضادة للتأكسد (الفينولات –الفلافونويدات) سجلت أكبر قيمة لمردود المستخلصات الملونة باستعمال الماء المقطر المحمض بحمض الليمون 2% كمذيب حيث بلغت 66%، ولوحظ أكبر قيمة لتركيز الأنثوسيانينات والبروأنثوسيانيدات في مستخلصي الإيتانول 70% المحمضين بحمض الليمون 1% و2% مقارنة بمستخلصي الماء المقطر والماء المقطر المحمض بحمض الليمون 2%. أدت إضافة حمض الليمون في طريقة الاستخلاص المتبعة إلى زيادة في تراكيز متعددات الفينول بنسبة أكبر في المستخلص الإيتانولي مقارنة مع المستخلص المائي. بعكس تأثير التحميض على الفلافونويدات الكلية حيث خفض حمض الليمون من تركيز الفلافونويدات الكلية، لكن مع بقاء نسبة المستخلص الإيتانولي أفضل مقارنة مع المستخلص المائي، بالمجمل نستطيع القول أن الإيتانول 70% أفضل من الماء المقطر في استخلاص المركبات الفعالة حيويا من الكركدية مع اختلاف تأثير حمض الليمون في استخلاص الفينولات والفلافونويدات، أبدت المستخلصات الملونة المحمضة فعالية في كسح أكبر لجذر الـ DPPH.

المراجع

[1] Peredo Pozos, G. I., Ruiz-López, M. A., Zamora Nátera, J. F., Moya, C. A., Ramírez, L.B., Silva, M. R., Antioxidant Capacity and Antigenotoxic Effect of Hibiscus sabdariffa L. Extracts Obtained with Ultrasound-Assisted Extraction Process, (2020). Appl. Sci, Vol.10, No.560, pp.1-13.

[2] William, C., Study on Extraction and Stability of Natural red Colorant from Hibiscus Sabdariffa L, (2014).Faculty of Chemical & Natural Resources Engineering Universty Malaysia Pahang.

[3] Cira Chávez, L. A., Barrientos, L. E., García, R., GarciaM O. D., Estrada Alvarado, L. A., Flavonoids - A Coloring Model for Cheering up Life(Natural vs Synthetic Colors).

[4] Selim, K. A., Khalil, K. E., Abdel-Bary, M. S. & Abdel-Azeim, N. A, Extraction, Encapsulation and Utilization of Red Pigments from Roselle (Hibiscus sabdariffa L). As Natural Food Colourants, (2008) . Alex. J. Fd. Sci. & Technol. Special Volume Conference, pp. 7-20.

[5] Abou-Arab, A. A., Abu-Salem, F. M., Abou-Arab, E. A., Physico- chemical properties of natural pigments (anthocyanin) extracted from Roselle calyces (Hibiscus subdariffa L,(2011). Journal of American Science,Vol.7,No.7,pp.445-456.

[6] Piovesana, A., Zapata Noreña, C. P., Study of Acidified Aqueous Extraction of Phenolic Compounds from Hibiscus sabdariffa L calyces, (2019). Institute of Food Science and Technology, Vol.11, pp.25-34.

[7] Paraı´so, C. M., dos Santos, S. S., Correa, V. G., Magon, T., Peralta, R. M., Visentainer, J. V., Madrona G. S., Ultrasound assisted extraction of Hibiscus (Hibiscus sabdariffa L). Bioactive compounds for application as potential functional ingredient, (2019). J Food Sci Technol.

[8] Cassol, L., Rodrigues, E., Zapata Noreña, C. P., Extracting phenolic compounds from Hibiscus sabdariffa L. calyx using microwave assisted extraction،(2019). Industrial Crops & Products، Vol.133,pp. 168–177.

[9] Camelo-Méndez, G. A., Ragazzo-Sánchez, J. A., Jiménez-Aparicio, A. R., Vanegas-Espinoza, P.E., Paredes-López, O., Del Villar-Martínez, A. A., Comparative Study of Anthocyanin and Volatile Compounds Content of Four Varieties of Mexican

Roselle *(Hibiscus sabdariffa L.)* by Multivariable Analysis،(2013). Plant Foods Hum Nutr.

[10] Hosseini, S., Gharachorloo, M., Ghiassi-Tarzi, B., Ghavami, M., Evaluation of the Organic Acids Ability for Extraction of Anthocyanins and Phenolic Compounds from Different Sources and Their Degradation Kinetics during Cold Storage، (2016). Pol. J. Food Nutr. Sci, Vol. 66, No. 4, pp. 261–269.

[11] Vankar, P. S., Shukla, D., Natural Dyeing with Anthocyanins from *Hibiscus* rosa sinensis Flowers,(2011), Journal of Applied Polymer Science.

[12] Anggraeni، v. j., Ramdanawati, L., Ayuantika, W., Optimization of Total Anthocyanin Extraction from Brown Rice (Oryza nivara)، (2019). Journal of Physics: Conf.

[13] Singleton, V. L., Orthofer,R., Rosa, M., Ravents, L., Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent by Vernonl، (1974). Am. J. EnoL Vitic. 25, 119.

[14] Martos, M. V., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López,J., Sendra, E., Barberá, E. S., Pérez-Álvarez ,J. A., Antioxidant properties of pomegranate (Punica granatum L.)، bagasses obtained as co-product in the juice extraction،. (2011). Food Research International,pp. 1217-1223.

[15] Maksimovic, Z., Malenc,D., Kovacˇevic, N., (2005). Polyphenol contents and antioxidant activity of Maydis stigma extracts. Faculty of Agriculture, Bioresource Technology,vVol. 96, -pp. 873–877.

[16] Portert, L. J., Hastich, L. N., Chan, B.G., The Conversion of Procyanidins and Prodelphinidins to Cyanidin and Delphinidi،(1986). Phytoo chemistry Vol 25. pp 223-230.

[17] Mishra, K., Ojha, H., Chaudhury, N. K., Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results، (2012). Food Chemistry,Vol. 130,pp. 1036–1043.

[18] Koncic, M. Z., . Kremer, A. D., Karlovic, K.B., Kosalec, I. A., Evaluation of antioxidant activities and phenolic content of Berberis vulgaris L. and Berberis croatica Horvat, (2010). Food and Chemical Toxicology pp. 2176-2180.

[19] Kumar, S., Kumar, D., Prakash, O., Evaluation of Antioxidant Potential, phenolic and flavonoid contents of *Hibiscus* tiliaceus Flowers, (2008). EJ EA F Che,pp. 2863-2871.

[20] Nawaz, H., Aslam Shad, M., Rehman, N., Andaleeb, H., Ullah, N., Effect of solvent polarity on extraction yield and antioxidant properties of phytochemicals from bean (Phaseolus vulgaris) seeds, (2020). Braz. J. Pharm. Sci.

[21] Putnik, A. P., Bursać Kovačević, A. D., Radojčin, M. B., Dragović-Uzelac, V., Influence of Acidity and Extraction Time on the Recovery of Flavonoids from Grape Skin Pomace Optimized by Response Surface Methodology, (2016).Chem. Biochem. Eng. Q.,vol. 30, NO. 4, PP. 455–464.

[22] Chaves، J. O., de Souza, M. C., da Silva, L. C., Lachos-Perez, D., Torres-Mayanga, P.C., Machado, A. P., Carneiro, T. F., Espinosa, M. V., González-de-Peredo, A. V., Barbero, G. F., Rostagno, M. A., Extraction of Flavonoids from Natural Sources Using Modern Techniques, (2020). Frontiers in chemistry.

[23] Henry D. S., Andrew H. J., Corinne M. L., Kelly M. M., Judith B. C., Role of aluminum in red-to-blue color changes in Hydrangea macrophylla sepals، (2011), Biometals, vol. 24, pp. 1005-1015.