استخلاص وتوصيف بعض المركبات الفعالة حيوياً من قشور ثمار الرمان

سحر نزال الحريري

قسم الكيمياء - كلية العلوم جامعة دمشق - سورية

تاريخ الإيداع 2010/03/28

قبل للنشر في 2010/08/09

الملخص

يشمل هذا البحث وصفاً تفصيلياً للطرائق المستخدمة في استخلاص بعض المركبات الفعالة حيوياً من قشور ثمار الرمان كالتانينات وتحديدها كمياً، واستخلاص بعض الأصبغة الأخرى وقد أجريت تجارب لاختيار المذيبات العضوية المناسبة للاستخلاص. أعطى استعمال الايتر البترولي نتائج جيدة في استخلاص أنواع من الكسانتوفيلات ولم يعطِ نتائج جيدة في استخلاص كلٍ من الكلوروفيل وغيره من البلاستيدات. وقد أدى استعمال الايتر الايتيليّ بعد الايتر البترولي إلى استخلاص المركبات الفينولية البسيطة. فصلت المركبات الفينولية البسيطة بطريقة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة وشخصت بناها باستعمال الأجهزة المطيافية التقليدية.

استخلص حمض التانيك بطريقتين مختلفتين وقد جرت معايرته كمياً باستعمال طريقة قياس الامتصاص الضوئي. تدل نتائج تحاليل حمض التانيك المستخلص بالطرائق المطيافية (IR وUV-vis) أن بنية أحد المستخلصين تتوافق مع بنية حمض التانيك المعياري. في المرحلة الأخيرة، استخلصت المواد الدباغية (التانينات) وحددت كمياً باستعمال مقياس الطيف الضوئي.

الكلمات المفتاحية: فينولات الرمان المركبات الفينولية، التانينات، حمض التانيك الأصبغة الطبيعية.

Extraction and characterization of some bioactive compounds of pomegranate peel

Sahar Nazzal Al Hariri
Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria

Received 28/03/2010
Accepted 09/08/2010

ABSTRACT

This paper includes a detailed description of the methods used to extract some bioactive compounds like Tannins and some dyes from pomegranate peel. Experiments were carried out also to select the appropriate organic solvent extraction. The utilization of petroleum ether gave good results in the extraction of xanthophylls and it did not give good results in the extraction of chlorophyll and other plastid pigments. We used ethyl ether after petroleum ether to extract simple phenolic compounds. They were separated in a thin-layer chromatography and characterized.

Tannic acid is extracted in two different ways and quantified using the measurement of optical absorption method. The analysis indicates that the structure of one extract is compatible with the structure of standard tannic acid. In the last stage, tannins are extracted and identified using a quantitative measure of the spectrum.

Keywords: Pomegranate phenols, Phenolic compounds, Tannins, Tannic acid, natural pigments.

المقدمة

تعرف التانينات (المواد الدباغية النباتية) بأنها من البوليمرات الفينولية Phenol Polymers وهي مركبات يتراوح وزنها الجزيئي مابين 500 - 3000، والتي تقوم بتشكيل روابط متصالبة بين التانينات والبروتينات (ألياف الكولاجين في الجلد) وغيرها من الجزيئات الضخمة [مالو، أحمد.2008].

إن المركبات الفينولية ذات الوزن الجزيئي الأقل من الأرقام المذكورة تكون صغيرة الحجم بحيث لا تستطيع تحقيق روابط متصالبة، وهي تمتز ضمن الجزيئات البروتينية وغيرها من البوليميرات، وتكون المعقدات المتشكلة في هذه الحالة قليلة الثبات [Temple, A.S. 1982, Hagerman, A.E. et al 1978].

أما المركبات الفينولية ذات الوزن الجزيئي الأعلى مما ذكر أعلاه فهي قد لا تكون فعالة كعامل دباغة، وذلك لأنها أكبر من أن تعبر خلال ألياف الكولاجين. كما يمكن أن يكون من الصعب على الروابط الكيميائية والفيزيائية أن تتشكل بفاعلية وذلك لصعوبة تحرير هذه التانينات من البوليميرات المرتبطة معها على شكل معقدات سواء in vivo أو في أثناء مراحل الاستخلاص (مالو، أحمد.2008).

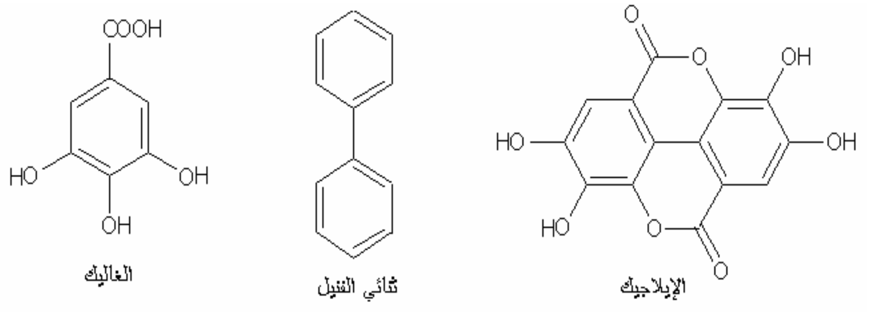
أكدت البحوث قدرة التانينات على تثبيط الأنزيمات التي تسهم في الفعاليات الحيوية للخلايا. إذ تسهم هذه التانينات في تشكيل روابط متصالبة مع البروتينات الانزيمية والبنيوية وغيرها من البوليميرات بحيث تعدل من وظائفها الحيوية. وعلى سبيل المثال تأثيرها القابض في الفم - فهي تسبب الجفاف في مخاطية الفم نتيجة التأثير المعاكس للفعالية المزلقة المميزة لغليكوبروتينات اللعاب[G kmen,V. *et al.* 2009,Settheetham, W. *et al.* 1995].

تشير البحوث [Ben Nasr, C. 1996] إلى وجود نسبة عالية من التانينات تتراوح بين 15 -28% في قشور ثمار الرمان، وتتغير هذه النسبة حسب نوع النبتة ومكان نموها، حيث تقل هذه النسبة في أثناء نضوج الثمرة نتيجة استخدامها كمصدر للطاقة، وتتحول النسبة المتبقية بعد النضج إلى أحماض، معطية الثمرة طعمها الحامض، أو يستخدمها النبات نفسه في أثناء دورة حياته كوسائل حماية بفضل وجود مركبات فينولية مطهرة.

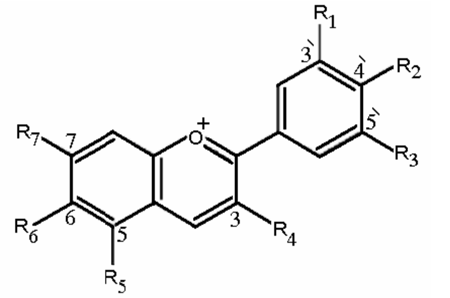
تقسم التانينات النباتية بنيوياً إلى صنفين رئيسين اعتماداً على نوع النوى الفينولية المساهمة في بنيتها وعلى طريقة ارتباطها مع بعضها لتشكيل الحجم الجزيئي المطلوب والفعالية الحيوية.

الصنف الأول وهو التانينات القابلة للحلمهة (hydrolyzable tannins) [مالو، أحمد.2008] يتميز باحتوائه على لب مؤلف من مركب غولي متعدد الهيدروكسيل، كالغلوكوز مثلاً، حيث تكون الزمرة الهيدروكسيلية مؤسترة كلياً أو جزئياً بحمض الغاليك أو مشابهاته كحمض هكسا هيدروكسي ثنائي الفينيل، أو حمض الايلاجيك

(Ellagic acid) الذي يتشكل نتيجة الأكسدة الذاتية لحمض الغاليك (Gallic acid). في حين يتميز الصنف الثاني، التانينات غير القابلة للحلمهة (nonhydrolyzable tannins) باحتوائه على نوى فينيولية فقط ويمكن للبروتينات والكربوهيدرات أن تنضم إليها إما in vivo أو في أثناء عمليات الاستخلاص [G kmen,V.*et al.*2009,Ferreira,E.C.*et al.* 2004].



أشارت البحوث العلمية أن هناك مجموعة من الأصبغة تتركز في الفجوات الخلوية النباتية، مختلفة بذلك عن الكلوروفيل والكسانتوفيل (أصبغة بلاستيدية)، وهي تسود عادة في الأنسجة النباتية على شكل غليكوزيدات. تسمى هذه الأصبغة بالأنثوسيانينات (anthocyanins) وهي مركبات من طبيعة فينولية. تشكل هذه المركبات أملاحاً بسهولة نتيجة تشكل شاردة الأوكسونيوم في الوسط [Mousavinejad, G. *et al.*, 2009]:



Anthocyannins

تدخل غليكوزيدات الانثوسيانينات في بنية الأصبغة التي تلون عصير الرمان وكذلك خلاصة القشور عندما تستخلص بمذيب عالي القطبية. تكون جميع المجموعات R هي مجموعات هيدروكسيلية باستثناء R_6.

يتبين من الدراسات السابقة الأهمية التي تتميز بها قشور الرمان نظراً لما تحتويه من المواد الدباغية (التانينات) وإمكانية استعمال حمض التانيك المتوافر في الرمان، بعد استخلاصه، كعلاج لمرض القرحة المعدية بسبب تأثيره القابض في جدران المعدة، فضلاً

عن إمكانية الاستفادة من الأصبغة النباتية الموجودة في القشور صناعياً. ونظراً إلى ندرة الدراسات المحلية المتعلقة بقشور ثمار الرمان فقد رأينا، من المناسب، إجراء مجموعة من التجارب لاختيار المذيبات العضوية المناسبة لاستخلاص بعض الأصبغة البلاستيدية والمركبات الفينولية البسيطة، واستخلاص بعض المركبات الفعالة حيوياً والمهمة صناعياً من قشور ثمار الرمان، ونظراً إلى الأهمية المميزة لكل من التانينات وحمض التانيك فقد تم تحديد النسب الكمية لكل منهما ومقارنتها بنسبها في المراجع.

مواد البحث وطرائقه

تحضير عينة قشر الرمان

جففت العينات في الظل وفي جو الغرفة، وطحنت بشكل جيد باستعمال مطحنة كهربائية قبل الاستخلاص مباشرة.

الكواشف والمواد الكيميائية

وردّت الكواشف التالية من Merck:

-كاشف ماير (Mayer) $K[BiI_4]$

-كاشف دراجندروف (Dragendroff) $K_2[HgI_4]$

-كاشف فولين (Folin) مزيج من حمض فوسفوموليبدات وحمض فوسفوتنغستات

والمواد الكيميائية التالية من (BDH):

كلور الحديد، حديدي سيان البوتاسيوم، محلول بروم اليود، خلات الرصاص، الجيلاتين، البيروغالول

توصيف البنى المستخلصة

شخصت المركبات المفصولة بطرائق المطيافية العادية، وتوافقت نتائج التحليل لحمض التانيك المفصول مع المركب المعياري: استعمل لهذه الغاية جهاز مطيافية ما تحت الأحمر(FTIR Spectroscopy) (نموذج Jasco-300E) ومقياس الطيف الضوئي في المجال فوق البنفسجي والمرئي (UV-vis) (نموذج Jasco-7800) المتوفران في قسم الكيمياء بكلية العلوم من جامعة دمشق.

استخلاص الأصبغة النباتية من قشر الرمان

تُستخلص الأصبغة النباتية وفق المراحل الآتية:

1 - يوضع 100غ من مسحوق قشر ثمار الرمان الجاف في بيشر سعة 600 مل.

2 - يضاف إليه 200 مل من الايتر البترولي لاستخلاص الكسانتوفيلات. يحرك الخليط بواسطة خلاط مغناطيسي مدة 120 دقيقة ثم يترك البيشر في مكان مظلم مدة 24 ساعة.

3 - تفصل الرشاحة بالإبانة ويجرى عليها اختبارات للتأكد من عدم وجود الفينولات والقلويدات.

4 - للتأكد من تمام الاستخلاص، يضاف إلى العينة بعد فصل الرشاحة 100مل من الايتر البترولي وتترك في الظلام مدة 24 ساعة.

5 - تُركز الرشاحتان المستخلصتان بعد 24 و48 ساعة بالمبخر الدوار إلى أقل من نصف حجمها الأصلي.

استخلاص الفينولات البسيطة وحمض التانيك

1 - تجفف العينة السابقة نفسها من آثار الايتر البترولي وتوضع في وعاء محكم الإغلاق.

2 - ثم يضاف إليها 200 مل من الايتر الايتيلي لاستخلاص بعض الحموض الفينولية البسيطة. يحرك الخليط على محرك مغناطيسي مدة من الزمن ثم يترك الوعاء في مكان مظلم مدة 24 ساعة. تفصل الرشاحة بالإبانة ويجرى عليها اختبارات للتأكد من وجود الحموض الفينولية البسيطة.

3 - للتأكد من تمام الاستخلاص يضاف إلى العينة بعد فصل الرشاحة 200 مل من الايتر الايتيلي وتترك في الظلام مدة 72 ساعة.

4 - تُركز الرشاحتان المستخلصتان بعد 24 و 72 ساعة بالمبخر الدوار إلى أقل من نصف حجمها الأصلي. وتستخدم العينات الناتجة لاستخلاص حمض التانيك وذلك وفق إحدى الطريقتين التاليتين بهدف المقارنة بين طيوف الإمتصاص وعلاقتها بطرائق الاستخلاص:

الطريقة الأولى [زابروميتنوف، م.هـ.1971، درويش، محمود.2003]

تعتمد على الاستخلاص المتدرج من القشور المدروسة وذلك بنزع كل من الأصبغة النباتية وغيرهما من المركبات التربينية إضافة إلى نزع المركبات الفينولية البسيطة.

1 - تجفف العينة السابقة من آثار الايتر الايتيلي توضع في بيشر، ويضاف إليها 200 مل من خلات الايتيل لاستخلاص حمض التانيك، يحرك الخليط على محرك مغناطيسي مدة 120 دقيقة ويترك مدة 24 ساعة.

2 - تفصل الرشاحة بالإبانة وتقسم إلى قسمين :

أ- يُركز القسم الأول من الرشاحة بطرد المذيب بواسطة المبخر الدوار ويجفف الراسب المتبقي، على شكل مسحوق أصفر اللون، ويحفظ لتشخيصه البنيوي بطرائق المطيافية.

ب - بينما يتم معايرة حمض التانيك في القسم الثاني من الرشاحة.

الطريقة الثانية [المنجد، حسان.1997]

1- بنقع قشور ثمار الرمان في مزيج من الإيتر الإيتيلي والإيتانول والماء بنسبة 10/6/3 ويترك المزيج بعد التحريك الجيد ليتشكل طوران منفصلان ثم يُرشح للتخلص من البقايا الصلبة وينقل السائل إلى قمع الفصل ويترك ليهدأ.

2- تُفصل الطبقة الكحولية المحتوية على حمض التانيك وتُبخر حتى الجفاف وتَترسب مادة على شكل مسحوق أصفر اللون عديم الشكل.

التحديد الكمي لحمض التانيك

يُرسب حمض التانيك من رشاحة خلات الايتيل السابقة بواسطة محلول خلات الرصاص. يفصل الراسب ثم يذاب بحمض الكبريت. يعتمد تحديد نسبة حمض التانيك على تفاعله (25 مل من محلوله) مع كاشف فولين -دينس (مزيج من فسفوموليبدات وحمض فوسفو تنغستات) (0.5 مل)، بوجود طرطرات وكربونات الصوديوم (5 مل) والتي تضاف بعد ثلاث دقائق من إضافة الكاشف. يقاس الامتصاص الضوئي بعد ساعة من التفاعل عند طول الموجة (744 nm).

يحسب تركيز حمض التانيك المستخلص بالإسقاط على سلسلة معيارية لحمض التانيك (بتركيز أولي 100 ppm). [المنجد، حسان.1997]. بتطبيق العلاقة :

$$Y = \frac{C \times V}{W} \times 10^{-1}$$

إذ: C تركيز حمض التانيك المستخلص

V حجم محلول حمض التانيك المستخلص مقدراً بالمل

W وزن عينة قشور ثمار الرمان مقرة بال gr

استخلاص التانينات

تجفف العينة السابقة من آثارخلات الايتيل وفق الطريقة الأولى دون ترسيب حمض التانيك، وتوضع في بيشر ويضاف إليها 200 مل من الميتانول، يحرك الخليط تحريكاً مغناطيسياً مدة من الزمن ويترك عدة أيلم للتأكد من تمام الاستخلاص. تفصل الرشاحة بالإبانة ثم تركز باستعمال المبخر الدوار. [المنجد، حسان. وآخرين1997].

تحديد التانينات كمياً

المرحلة الأولى (استخلاص المواد الدباغية): يوضع 1غ من مسحوق عينة قشر ثمار الرمان في أرلينة ويضاف إليه 150 مل من الماء المقطر ويسخن المزيج مدة 30 دقيقة حتى الغليان على حمام مائي ثم يبرد. يترك المزيج ليهدأ مدة ساعتين ومن ثم يرشح إلى بالون معايرة سعة 250 مل ويتمم الحجم بالماء المقطر (محلول I). يوضع 5 مل من المحلول I في بالون معايرة سعة 25 مل ويتمم الحجم بالماء المقطر (محلول II).

المرحلة الثانية (تشكيل معقد فوسفوتنغستين): يؤخذ 5 مل من المحلول II ويضاف إليه 1.5 مل من كاشف حمض الفوسفوتنغستين ويتمم الحجم إلى 50 مل بمحلول كربونات الصوديوم.

يقاس الامتصاص الضوئي للمحلول II بعد دقيقتين من آخر إضافة عند طول الموجة 715nm ليعطي الامتصاص A_1.

المرحلة الثالثة (تفاعل البوليمرات الفينولية مع الجيلاتين): يؤخذ 15 مل من المحلول I ويضاف إليه 0.5 غ من مسحوق الجيلاتين ويحرك بواسطة محرك مغناطيسي مدة ساعة ثم يرشح.

يؤخذ 5 مل من الرشاحة وتوضع في بالون معايرة سعة 25 مل ويتمم الحجم بالماء المقطر. يتابع العمل كما في المرحلة الثانية ويحدد الامتصاص A_2. [المنجد، حسان. وآخرين1997]

يحضر السائل المرجعي بإذابة 50 مغ من البيروغالول في 100 مل من الماء المقطر، يؤخذ 5 مل من المحلول الناتج ويمدد حتى 100 مل من الماء المقطر، ويتابع العمل كما في المرحلة الثانية ويحدد الامتصاص A_3

يمكن حساب نسبة المواد الدباغية بحسب العلاقة:

$$X = \frac{A_1 - A_2}{b \times A_3} \times 13.125$$

النتائج والمناقشة

تستخلص الأصبغة النباتية وبعض المركبات الفينولية البسيطة وتدرس كيفياً كخطوة أولية لفصل حمض التانيك والتانينات من العينات المدروسة باستعمال مذيبات عضوية مع الأخذ بالحسبان التدرج في قطبية منظومة الاستخلاص

1. استخلاص بعض الأصبغة النباتية

لمّا كانت المراجع لم تشر إلى استخلاص الأصبغة البلاستيدية من قشور ثمار الرمان فقد اختيرت بعض طرائق استخلاصها المطبقة على بذور نباتات أخرى [زابروميتنوف، م.هـ.1971، درويش، محمود.2003 2008 Bulda,O. V. *et al,*].

تبين بعد إجراء عدة تجارب لاختيار المذيب المناسب لاستخلاص الصبغ البلاستيدي من قشور ثمار الرمان أن الايتر البترولي هو الأفضل لهذا الاستخلاص. يبين الجدول (1) عدم وجود القلويدات والفينولات في الرشاحة بإجراء اختباري وجود القلويدات [حسن، طاهر.2007] باستخدام كاشفي ماير ودراجندوف، ووجود الفينولات، باستخدام كاشفي فولين وكلور الحديد [.Deshpande *et al.* 1986].

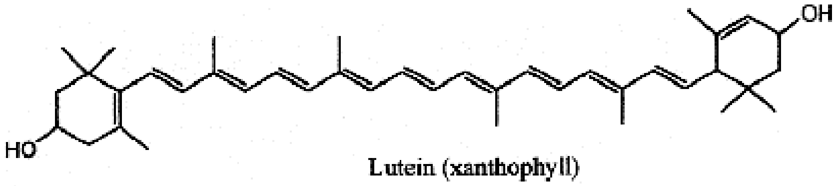
الجدول (1) نتائج اختبارات وجود القلويدات والفينولات في رشاحة الايتر البترولي

اختبار وجود القلويدات (Alkaloids)		اختبار وجود الفينولات (phenols)	
كاشف ماير	-	كاشف فولين	-
كاشف دراجندوف	-	كلور الحديد	-

يشير [Merck-index] إلى أن الكسانتوفيل يبدي عصابات امتصاص عند الأطوال الموجية المشار إليها في الجدول (2) باستعمال الايتر البترولي كمذيب، يلاحظ في طيف UV-vis (الشكل2) لخلاصة الايتر البترولي بعد 24 ساعة عصابات امتصاص في المجال 230-320 nm وفي طيف UV-vis (الشكل3) لخلاصة الايتر البترولي بعد 48 ساعة عصابات امتصاص في المجال 230-500 nm. يمكن، من خلال ملاحظة الشكلين(2) و(3)، احتمال وجود لبعض أشكال اللكسانتوفيل (أحد أنواع الكاروتينات) نظراً إلى ظهور عصابات امتصاص في المجال بين 230-320 nm الذي يدل على ترافق ما في البنية (الشكل 1). يلاحظ بمقارنة الشكل (2) مع الشكل (3) انخفاض ملحوظ لشدة الامتصاص عند طول الموجة 239 nm وظهور عصابات صغيرة في المجال 350-500 nm مما يعني أن زيادة زمن النقع قد يؤدي إلى خفض نسبة أحد المكونات التربينية المستخلصة.

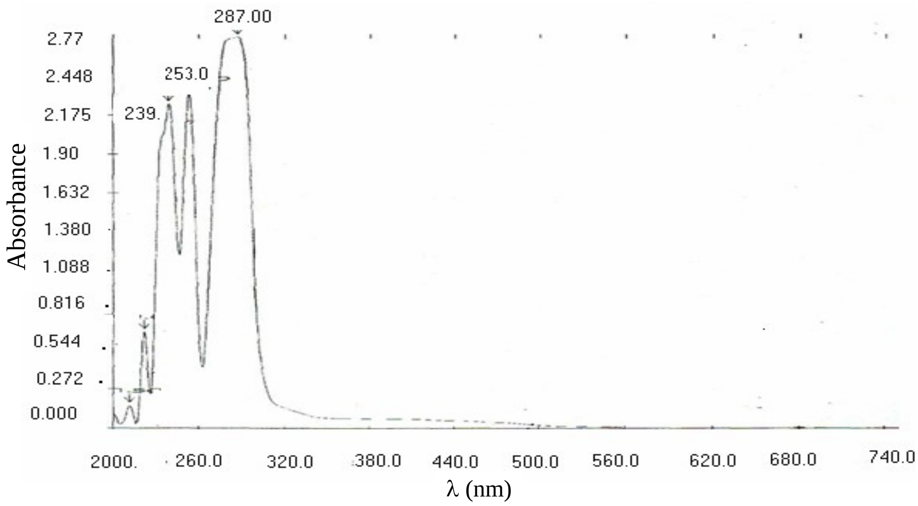
الجدول (2) الأطوال الموجية للكسانتوفيل في الايتر البترولي حسب Merck-index

		UV-vis (λ nm)				
كسانتوفيل	268	333	429	453	481	

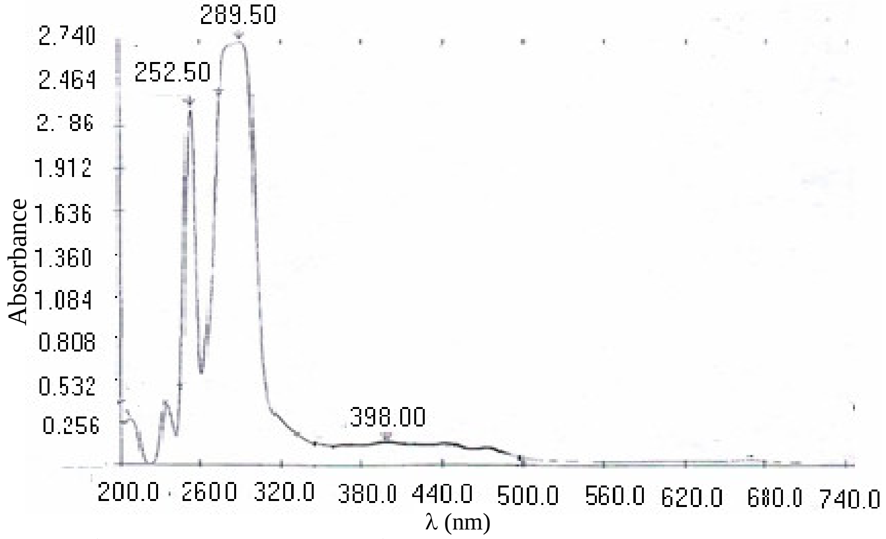


Lutein (xanthophyll)

الشكل (1) إحدى بنى الكسانتوفيل II



الشكل (2) طيف الامتصاص UV-vis لخلاصة الايتر البترولي بعد 24 ساعة



الشكل (3) طيف الامتصاص UV-vis لخلاصة الايتر البترولي بعد 48 ساعة

2. استخلاص الفينولات البسيطة

كخطوة ثانية، بعد عزل بعض أشكال الكسانتوفيل، عزلت الفينولات البسيطة وكشف عنها كيفياً. يتضمن الجدول (2) الاختبارات التي أجريت على خلاصة الايتر الايتيلي بعد 24 و 72 ساعة للتأكد من وجود الفينولات والقلويدات.

الجدول (2) نتائج اختبارات وجود القلويدات والفينولات في رشاحة الايتر الايتيلي

اختبار وجود القلويدات		اختبار وجود الفينولات	
كاشف ماير	-	كاشف فولين	+
كاشف دراجندوف	-	كلور الحديد	+
محلول اليود	-	حديدي سيانات البوتاسيوم	-

يلاحظ من الجدول السابق عدم وجود القلويدات في الرشاحة ووجود الفينولات البسيطة لتفاعلها مع كاشف فولين وكلور الحديد [Deshpande *et al.*, 1986].

أُنجز تحليل كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) لرشاحة الايتر الايتيلي بعد تركيزها لمعرفة نوع المركبات الفينولية البسيطة وكان الطور المتحرك المؤلف من مزيج كلورفورم وحمض الخل (2/5) هو الأفضل بعد تجريب عدة أطوار متحركة وبنسب مختلفة. وبيّن الفصل أن المنتج يتكون من خليط لمكونين.

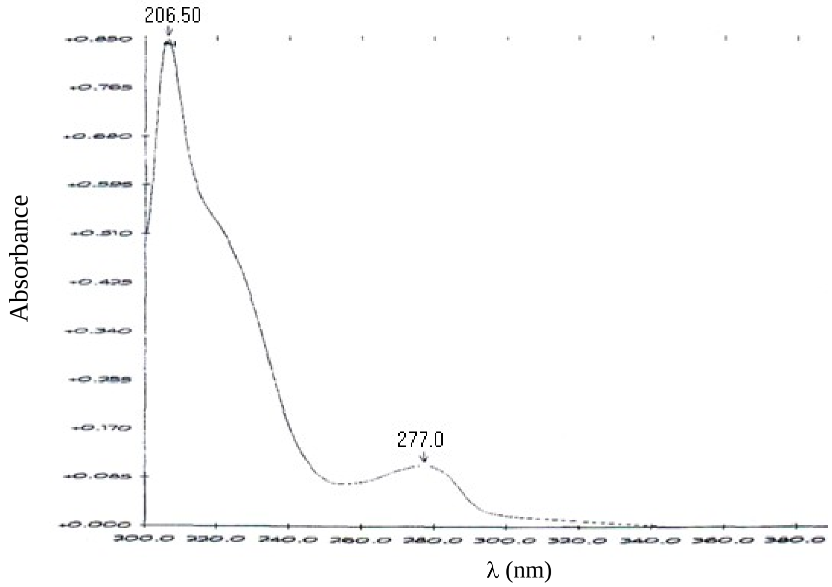
يلاحظ لدى تحليل المكونين الناتجين عن استعمال الايتر الايتيلي كمذيب، بطريقة مطيافية (UV-vis) (الشكل 4) و(الشكل 5) عصابة امتصاص شدتها ضعيفة عند طول الموجة 279 nm للمكون الأول وعصابة امتصاص واضحة عند طول موجة أعظمي λ_{max} = 248 nm للمكون الثاني.

يشير المرجع [Dibbern, H.W. 2005, Hasemann, P. *et al.*, 2007] أن حمض الغاليك يبدي عصابة امتصاص عند طول الموجة 280 nm وأن بارا هيدروكسي حمض البزوئيك يبدي عصابة امتصاص عند طول موجة أعظمي λ_{max} = 252 nm باستعمال الميتانول كمذيب مما يعني أن خلاصة الايتر الايتيلي قد تحتوي على كل من حمض الغاليك وبارا هيدروكسي حمض البزوئيك.

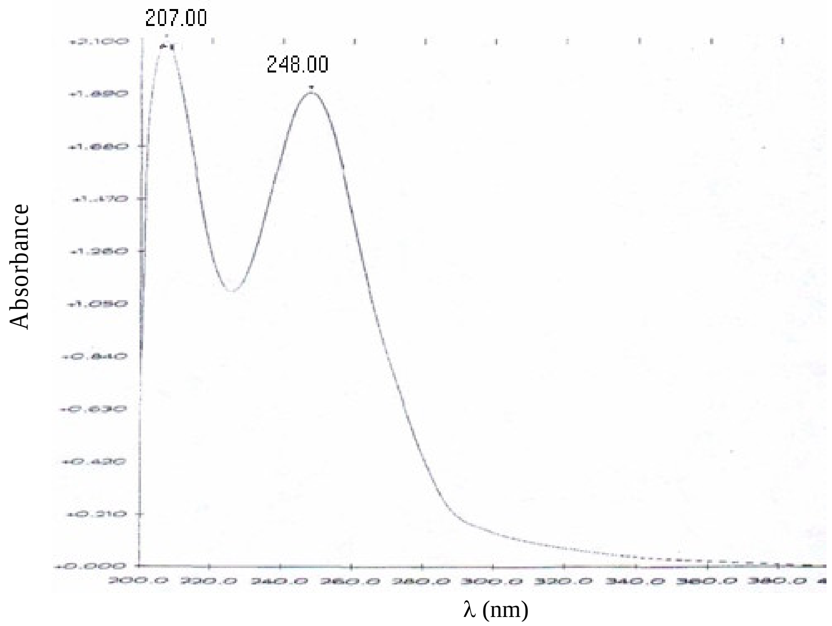
يلخص الجدول (3) أهم عصابات الامتصاص المميزة للمكونين الأول والثاني المسجلة بطريقة مطيافية ما تحت الأحمر (IR) إذ إن المكونين لهما الزمر الوظيفية نفسها.

الجدول(3) عصابات الامتصاص المميزة في طيف ما تحت الأحمر للمكونين الأول والثاني

IR (cm^{-1})	
المكون (2)	المكون (1)
υ(OH) = 3400	υ(OH) = 3443
υ(C=O) = 1700	υ(C=O) = 1730
υ(CH=CH) =1630, 932 (trans)	υ(CH=CH) =1640, 938 (trans)
υ(C-O) = 1088	υ(C-O) = 1100
υ(C-H)= 790,490 عطري الانحنائي	υ(C-H)= 800,500 عطري الانحنائي



الشكل (4) طيف الامتصاص UV-vis للمكون الأول باستعمال الايتر الايتيلي



الشكل (5) طيف الامتصاص UV-vis للمكون الثاني باستعمال الايتر الايتيلي

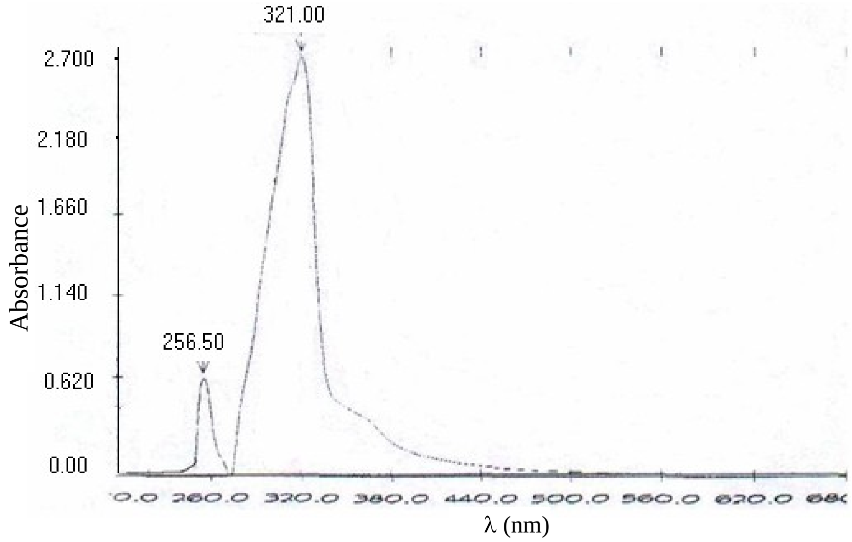
3. استخلاص حمض التانيك وتحديده كمياً

أجري اختبار وجود القلويدات على رشاحة خلات الايتيل المحتوية على حمض التانيك (المستخلص وفقاً للطريقة الأولى) فكانت النتائج سلبية، في حين تلونت الرشاحة بلون أزرق داكن مع كاشف فولين مما يدل على وجود الفينولات.

يلخص الجدول (4) المعطيات الطيفية الرئيسة لحمض التانيك المستخلص بطريقتين مختلفتين وحمض التانيك المعياري. ويوضح الشكلان (6) و(7) من خلال ملاحظة التشابه بين عصابات الامتصاص المميزة، التقارب الكبير بين طيفي UV-vis لحمض التانيك المعياري والمستخلص وفقاً للطريقة الأولى (الاستخلاص المتدرج من قشور ثمار الرمان). يلاحظ في الشكل (7) ظهور عصابة امتصاص عند طول الموجة 364 nm ويوجد عند طول الموجة نفسها في الشكل (6) عصابة امتصاص عريضة وشدتها ضعيفة. يمكن تفسير ذلك أن حمض التانيك المستخلص بالطريقة الأولى غير نقي تماماً قد يحتوي على بقايا من الفينولات البسيطة. يتبين من الجدول (4) أن عصابات الامتصاص للمستخلص بالطريقة الثانية لا تلتقي مع عصابات الامتصاص المميزة والعائدة لحمض التانيك المعياري مما يدل على عدم فعالية الطريقة الثانية لاستخلاص حمض التانيك.

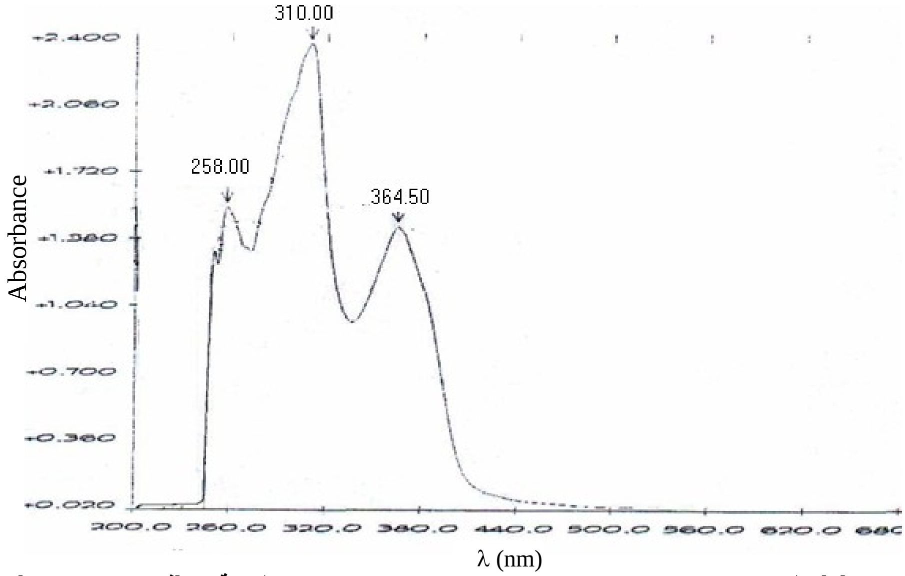
الجدول(4) المعطيات الطيفية الرئيسة لحمض التانيك المعياري والمستخلص

IR (cm^{-1}) لحمض التانيك		
مستخلص بالطريقة (2)	مستخلص بالطريقة (1)	عياري
υ(OH) = 3380	υ(OH) = 3427	υ(OH) = 3390
υ(C=O) = 1710	υ(C=O) = 1730	υ(C=O) = 1730
υ(C=C) = 1615	υ(C=C) = 1600	υ(C=C) = 1625
υ(C-O) = 1030	υ(C-O) = 1050	υ(C-O) = 1040
UV-vis (nm) لحمض التانيك		
مستخلص بالطريقة (2)	مستخلص بالطريقة (1)	عياري
362	λ_{max} = 320	λ_{max} = 321
λ_{max} = 263	258	256

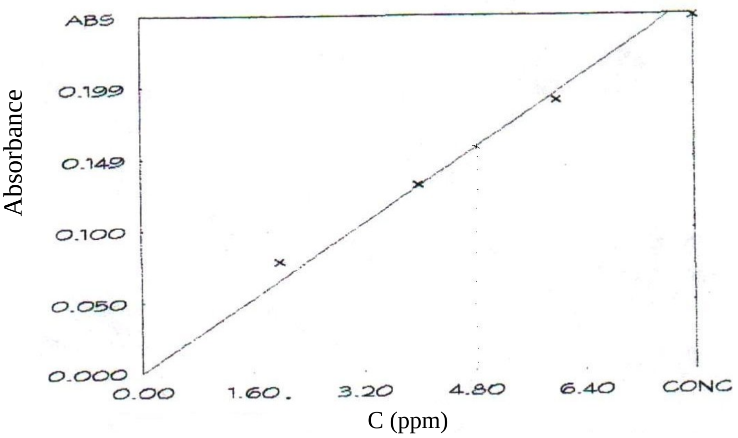


الشكل (6) طيف الامتصاص UV-vis لحمض التانيك المعياري (في خلات الايتيل)

يحسب تركيز حمض التانيك بـــ ppm المستخلص بالطريقة الأولى بالإســـقاط علـــى سلسلة معيارية لحمض التانيك (بتركيز أولي 100 ppm) (الشكل 8).



الشكل (7) طيف الامتصاصUV-vis لحمض التانيك المستخلص بالطريقة 1 (في خلات الايتيل)



الشكل (8) السلسلة المعيارية لحمض التانيك المعياري

وجد بعد الحساب أن النسبة الوزنية لحمض التانيك في العينة تبلغ 1.02% في حين تشير المراجع إلى وجوده بنسبة 0.6% [Ben Nasr, C. 1996] :

$$Y = \frac{C \times V}{W} \times 10^{-1}$$

إذ: C =4.98 ppm تركيز حمض التانيك المستخلص. القيمة مستقرأة من الشكل (8)
V حجم محلول حمض التانيك المستخلص مقدراً بالمل W = 10 g وزن عينة قشور ثمار الرمان.

أما الاختلاف بين نسبة حمض التانيك في عينة قشور الرمان المدروس مقارنة بنسبته في المراجع فيمكن أن ينسب إلى عدم نقاوته بشكل تام، بسبب وجود بقايا من الفينولات البسيطة.

4. استخلاص التانينات وتحديدها كمياً

يدرج في الجدول (5) الاختبارات التي أجريت على خلاصة الميتانول للتأكد من وجود التانينات والقلويدات.

الجدول (5) نتائج اختبارات وجود القلويدات والفينولات في خلاصة الميتانول

اختبار وجود القلويدات		اختبار وجود التانينات	
كاشف ماير	-	كاشف فولين	+
كاشف دراجندوف	-	كلور الحديد	+
اختبار اليود	-	حديدي سيان البوتاسيوم	+

بينت النتائج عدم وجود القلويدات في رشاحة الميتانول، بينما استخلصت أغلب المواد الدباغية (التانينات) في المرحلة النهائية من الاستخلاص المتدرج كما هو مبين في الجدول (5). ونظراً إلى أن للتانينات نوعين أساسيين وهما التانينات القابلة للحلمهة (البيروغالول) والتانينات غير القابلة للحلمهة (الكاتيكول)، فقد استعمل ماء البروم للتمييز بين هذين النوعين

[المنجد، حسان. وآخرون 1997]. حيث يعطي مع النوع الأول نتيجة سلبية ومع النوع الثاني راسباً أصفرَ برتقالياً. وعند إضافة عدة قطرات من ماء البروم إلى خلاصة الميتانول لم يتشكل الراسب الأصفر، مما يعني وجود التانينات القابلة للحلمهة.

أجريت محاولات لإنجاز التحليل الكروماتوغرافي (TLC) لرشاحة الميتانول بعد تركيزها، لفصل التانينات وتحديدها كمياً، لكنها باءات بالفشل على الرغم من تجريب عدة أطوار متحركة، لذلك عينت تراكيز التانينات دون فصلها.

تُستخلص المواد الدباغية وغيرها من المواد المنحلة بالماء من مسحوق العينة باستعمال الماء كمذيب. تتفاعل جميع الفينولات مع كاشف حمض فسفوتنغستات مشكلة مواد ملونة يمكن قياس امتصاصها بمقياس الطيف الضوئي، في حين يتم ربط المواد الدباغية بمسحوق الجيلاتين ويحدد الامتصاص بالطريقة نفسها. يمكن حساب نسبة المواد الدباغية بحسب العلاقة:

$$X = \frac{A_1 - A_2}{b \times A_3} \times 13.125 = \frac{2.6 - 2.4}{1 \times 0.4} \times 13.125 = 13.12\%$$

إذ: $A_3=A_0$: الامتصاص النوعي للبيروغالول، و b وزن العينة مقدرة بالغرام.

الاستنتاجات

تناولنا في هذا العمل استخلاص ودراسة كيفية لبعض مكونات قشر ثمار الرمان، ومنها الأصبغة البلاستيدية، وتحليلاً كمياً لكل من حمض التانيك والتانينات وتبين ما يأتي:

1. يؤدي استعمال الايتر البترولي إلى استخلاص بعض الأصبغة النباتية وهي بعض مكونات الكسانتوفيل والموجودة بوفرة في قشور ثمار الرمان.
2. تتميز خلات الايتيل بفعالية كبيرة في الاستخلاص المتدرج لحمض التانيك بشكل شبه نقي، وعدم فعالية مزيج من الايتر الايتيلي والايتانول في استخلاص حمض التانيك مباشرة من عينة قشور ثمار الرمان.
3. تتقارب النتائج التي تم الوصول إليها تجريبياً فيما يتعلق بتركيز حمض التانيك والتانينات مع ما تستعرضه المراجع العلمية.
4. يحتاج البحث إلى متابعة حثيثة للتعمق في المعطيات البنيوية والوظيفية باعتبار أن الاستخلاصات وتنقية المركبات الفعالة حيوياً هي المرحلة الأولى لدراسة فعاليتها الوظيفية والحيوية.

كلمة شكر

أشكر كل من الدكتور أحمد مالو لتزويدي ببعض المراجع الروسية والدكتورة ثناء الحداد لترجمتها من الروسية إلى العربية وطارق العمار لمساعدتي في العمل وعامر حقي لتزويدي بالكواشف

REFERENCES المراجع

Ben Nasr, C. Ayed, N. and Metche, M. 1996. Quantitative Determination of the Polyphenolic Content of Pomegranate peel, *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*,203, No 4, 374-378.

Bulda,O. V. Rassadina, V. V. Alekseichuk, H. N. and Laman, N.A. 2008. Spectrophotometric Measurement of Carotenes, Xanthophylls, and Chlorophylls in Extracts from Plant Seeds, *Russian Journal of Plant Physiology*, 55, No.4, 544-551.

Delgado-Vargas, F. Jimenez, A. R. Paredes-Lopez, O. 2000. Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains — Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability, *Food Science and Nutrition*, 40, 173-289.

Deshpande, S. . Cheryan, M. and Salunkhe, D.K. 1986.Tannin analysis of food products, *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 24:4, 401–449.

Dibbern, H.W. 2005. UV and IR Spectra of Some Important Drugs.

Ferreira, E. C. Nogueira, A. R. A., Souza, G. B., and Batista, L. A. R. 2004. Effect of drying method and length of storage on tannin and total phenol concentrations in Pigeon pea seeds, Food *chemistry*, 86, 1, 17-23.

G kmen, V., Serpen, A., and Fogliano, V. 2009. Direct Measurement of the Total Antioxidant Capacity of Foods: the'QUENCHER' Approach, *Trends in Food Science & Technology*, 20, Issues 6-7, 278-288.

Hagerman, A. E., and Butter, L.G. 1978. Protein Precipitation for the Quantitative Determination of Tannins, *J. Agric. Food Chem.*, 26, No.4, 809.

Hasemann, P. Balk, M. and W tzig, H. 2007. Analysis of Substances to be Used as Internal Standards in MEKC, *Electrophoresis*, 28:11, 1798-1804.

Maryadele, J. O'Neil and Smith, A. 2001. The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals.

Mousavinejad, G., Emam-Djomeh, Z., Rezaei, K., and Haddad Khodaparast, M.H. 2009. Identification and Quantification of Phenolic Compounds and their Effects on Antioxidant Activity in Pomegranate Juices of Eight Iranian Cultivars, *Food Chemistry*, 115, I4, 1274-1278.

Settheetham, W., and Ishida, T. 1995. Study of Genotoxic Effects of Antidiarrheal Medicinal Herbs on Human Cells in vitro., *Asian J. Trop. Med. Public Health*, 26, 306.

Temple, A. S. (1982). Tannins Measuring Techniques, *J. Chem. Ecology*, 8, No. 10 1289.

المنجد، حسان. 1997. كيمياء العقاقير (2)، جامعة دمشق.

المنجد، حسان. حسن آغا، محمد عصام. 1997. كيمياء العقاقير والاستخلاص، الجزء العملي. جامعة دمشق.

زابروميتنوف، م.هـ. 1971. الطرائق البيوكيميائية في الفيزيولوجيا النباتية، المركبات الفينولية وطرائق دراستها، دار العلوم، موسكو، 185 -207 (باللغة الروسية).

حسن، طاهر. ميرزا، جمعة. 2007، كيمياء المنتجات الطبيعية، الجزء العملي، منشورات جامعة البعث.

درويش، محمود.2003. مجلة الجمعية الكيميائية الكويتية، 50.

مالو، أحمد. 2007. المركبات الفينولية، أملية.