الجمهورية العربية السورية

جامعة حلب

كلية الصيدلة

" تحديد الشروط المثلى لاستخلاص البروأنتوسيانيدينات من مصادرها الطبيعية وتحضيرها على شكل محافظ دقيقة لاستعمالها في الأغذية الوظيفية "

بحث أعد لنيل درجة الدكتوراه في مراقبة الأغذية

إعداد الطالبة

وسام زم

2014

1435

الجمهورية العربية السورية

جامعة حلب

كلية الصيدلة

" تحديد الشروط المثلى لاستخلاص البروأنتوسيانيدينات من مصادرها الطبيعية وتحضيرها على شكل محافظ دقيقة لاستعمالها في الأغذية الوظيفية "

بحث أعد لنيل درجة الدكتوراه في مراقبة الأغذية

إعداد الطالبة

وسام زم

إشراف: أ.د. وريد خياطة

أستاذ الكيمياء الفيزيائية

كلية الصيدلة–جامعة حلب

مشاركة: أ.د. غادة بشور

أستاذة الكيمياء الغذائية

كلية الصيدلة–جامعة حلب

بالتعاون مع: د. وسيم عبد الواحد

مدرس الصيدلانيات وتكنولوجيا الصيدلة

كلية الصيدلة–جامعة حلب

كلمة شكر

لأننا في معظم الأحيان لا نملك إلا الكلمات .....

- أردت أن أنتقي أصدق كلمات الشكر لتكون خير بداية لهذه الرسالة .... أقدمها مع أخلص الاحترام والتقدير للأستاذ الدكتور وريد خياطة والأستاذة الدكتورة غادة بشور والدكتور وسيم عبد الواحد اللذين أشرفوا على هذا العمل منذ الدقائق الأولى وحتى طباعة صفحاته الأخيرة ..... و أتمنى أن أكون فيما قدمته عند حسن ظنهم.
- شكراً للجنة الحكم الممثلة بالأستاذ الدكتور جورج جانجي والأستاذة الدكتورة نظيرة سركيس والأستاذ الدكتور أمير الحاج صكر والأستاذ الدكتور عبد الله قطاع لما قدموه من ملاحظات قيمة.
- أتوجه بالشكر العميق لإدارة كلية الصيدلة وكافة أساتذتها وبشكل خاص أساتذة قسم الكيمياء التحليلية والغذائية.
- شكراً للأستاذ الدكتور علي علي عميد كلية الهندسة التقنية بطرطوس للتسهيلات المقدمة لإتمام جزء من هذا البحث في مخابر الكلية.
- شكراً للدكتور نور الدين يوسف وجميع العاملين في المخبر الكيميائي لإدارة الموارد المائية بطرطوس للتسهيلات المقدمة لإتمام جزء من هذا البحث في مخابر المديرية.
- شكراً من أعماق قلبي لرئيسة شعبة الدراسات العليا الآنسة رفاه الفرا وللأستاذ عيسى ابراهيم.
- أتوجه بالشكر لكافة القائمين على مخبر الأبحاث ومخبر الكيمياء الغذائية وأخص الآنسة إيمان الحسن والأستاذ محمد صابسن.

Dedicated

to

my father, my husband and my children

Thank you for supporting me throughout my whole life

Thank you for giving me the strength to continue

Thank you for being always by my side

I love you Abbas, Samer, Sara & Sami

جامعة حلب

كلية الصيدلة

تصريح

أصرح بأن هذا البحث بعنوان (تحديد الشروط المثلى لاستخلاص البروأنتوسيانيدينات من مصادرها الطبيعية وتحضيرها على شكل محافظ دقيقة لاستعمالها في الأغذية الوظيفية) لم يسبق أن قبل للحصول على أية شهادة، ولا هو مقدم حالياً للحصول على شهادة أخرى.

المرشح

وسام زم

Declaration

I hereby certify that this work has not been accepted for any degree or it is not submitted to any other degree

Candidate

Wissam Zam

جامعة حلب

كلية الصيدلة

شهادة

نشهد بأن العمل المقدم في هذه الرسالة هو نتيجة بحث علمي قامت به المرشحة وسام زم بإشراف الدكتور وريد خياطة أستاذ الكيمياء الفيزيائية في قسم الكيمياء التحليلية والغذائية من كلية الصيدلة جامعة حلب والدكتورة غادة بشور أستاذة الكيمياء الغذائية في قسم الكيمياء التحليلية والغذائية من كلية الصيدلة جامعة حلب بالتعاون مع الدكتور وسيم عبد الواحد المدرس في قسم الصيدلانيات وتكنولوجيا الصيدلة من كلية الصيدلة جامعة حلب.

إن أية مراجع أخرى ذكرت في هذا العمل موثقة في نص الرسالة وحسب ورودها في النص.

المرشح	بالتعاون مع	المشرف المشارك	المشرف الرئيس
وسام زم	**الدكتور وسيم عبد الواحد**	**الأستاذة غادة بشور**	**الأستاذ وريد خياطة**

Testimony

We witness that the described work in this treatise is the result of scientific search conducted by the candidate Wissam Zam under the supervision of doctor Warid Khayata, professor at the department of analytical and food chemistry, Faculty of pharmacy, University of Aleppo, and doctor Ghada Bashour, professor at the department of analytical and food chemistry, Faculty of pharmacy, University of Aleppo, with the collaboration of doctor Wassim Abdelwahed, doctor at the Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of pharmacy, University of Aleppo.

Any other references mentioned in this work are documented in the text of the treatise.

Candidate	Collaboration	Assistant supervisor	Main supervisor
Wissam Zam	**Wassim Abdelwahed**	**Ghada Bashour**	**Warid Khayata**

الفهرس

العنوان	رقم الصفحة
المقدمة	
الملخص	
I- الفنولات المتعددة:	
I-1- البنية الكيميائية والمصادر الطبيعية	1
I-2- البروأنتوسيانيدينات	2
I-2-1- لمحة تاريخية	2
I-2-2- البنية الكيميائية	2
I-3- المصادر الطبيعية للمركبات الفنولية	4
I-4- اصطناع المركبات الفنولية في النباتات	6
I-5- دور المركبات الفنولية في النباتات	7
I-5-1- الوقاية من الأشعة فوق البنفسجية	7
I-5-2- المركبات الفنولية كمواد صباغية	8
I-5-3- دور المركبات الفنولية في وقاية النباتات	8
I-6- الفعالية المضادة للأكسدة	8
I-7- العوامل المؤثرة في التوافر الحيوي للمركبات الفنولية	9
I-7-1- العوامل البيئية	10
I-7-2- العوامل المتعلقة بالهضم والامتصاص	10
I-7-3- العمليات التصنيعية التي يتعرض لها الطعام	11
I-7-4- التركيب الكيميائي للمادة الغذائية	12
I-7-5- التداخل مع بعض مركبات أخرى	12
I-7-6- التركيب الكيميائي للمركبات الفنولية	12
I-8- التأثيرات الفيزيولوجية في العضوية الحية	13
I-9- الجرعة ودراسات السمية	16
I-10- طرائق الاستخلاص المتبعة	16
I-11- المراحل المتممة لعملية الاستخلاص	18
I-11-1- فصل الخلاصة السائلة عن الثفالة الصلبة	18

I-11-2- التخلص من المحل العضوي 18
I-11-3- تنقية الخلاصة 18
I-11-4- فصل البروأنتوسيانيدينات 19
I-12- طرائق اختبار المركبات الفنولية
I–12–1– التحديد الكمي للفنولات المتعددة 19
I–12–1–1– اختبار الفولين–سيوكالتو 19
I–12–2– التحديد الكمي للبروأنتوسيانيدينات 21
I–12–2–1– اختبار البوتانول الحمضي للبروأنتوسيانيدينات 21
I–12–2–2– اختبار الفانيلين 21
I–12–2–3– اختبار الفانيلين المعدل 21
I–12–2–4– تحديد درجة التماثر النسبي من خلال النسبة بين اختبار الفانيلين 22
I–12–3– تحديد القدرة المضادة للأكسدة 22
I–12–3–1– معايرة الدي فنيل بكريل هيدرازيل 22

II- التمحفظ الدقيق:

II-1- مقدمة 24
II-2- مواصفات المواد المستعملة في التلبيس 25
II-3- العوامل المؤثرة في فعالية التمحفظ 25
II-4- التمحفظ الدقيق للفنولات المتعددة 26
II-4-1- تقنية التجفيف بالإرذاذ 31
II-4-2- تقنية فصل الأطوار 32
II-4-3- الجسيمات الدسمة (الليبوزومات) 33
II-4-4- التضمين (تشكيل معقدات انضمامية مع مشتقات السيكلودكسترين) 35
II-4-5- التبلور باستعمال مواد مساعدة 35
II-4-6- الجزيئات النانوية 36
II-4-7- التجفيد 36
II-4-8- التمحفظ باستعمال الخمائر 37
II-4-9- الاستحلاب 37
II-5- فحص المحافظ الدقيقة 38
II-5-1- فحص المناخل 38
II-5-2- شكل المحافظ 38
II-5-3- دراسات التحرر في الزجاج 39

II-5-4- قياس الكمون زيتا 39
II-5-5- مجهر القوة الذرية 40
II-5-6- فعالية التمحفظ 40
III- الأغذية الوظيفية:
III-1- المقدمة 41
III-2- المدعمات الغذائية 42
III-2-1- الفيتامينات والمعادن 42
III-2-2- الحموض الدسمة الوظيفية 42
III-2-3- البروبايوتيك 42
III-2-4- المركبات الكيميائية النباتية 42
III-2-5- البروتينات والحموض الأمينية و الببتيدات والإنزيمات 43
III-2-6- الألياف 43
III-3- أنواع الأغذية الرئيسة 43
III-3-1- مشتقات الحليب 43
III-3-2- منتجات الحبوب 43
III-3-3- المشروبات 44
III-3-4- المواد الدسمة والزيوت 44
III-3-5- المعجنات 44
الهدف من البحث 45
القسم الأول: 47
1- الكواشف والمواد الكيميائية 48
2- الأجهزة 48
3- الاختبارات المطبقة 49
3-1- التحديد الكمي للفنولات المتعددة 49
3-2- التحديد الكمي للبروأنتوسيانيدينات 50
3-3- تحديد القدرة المضادة للأكسدة 51
3-4- تحديد درجة التماثر النسبي للبروأنتوسيانيدينات 52
3-4-1- اختبار الفانيلين المعدل 52
3-4-2- تحديد درجة التماثر النسبي من خلال النسبة بين اختبار الفانيلين 53
4- تحديد السلسلة المعيارية لاختبار الفولين-سيوكالتو 53
5- تحديد طول الموجة الأعظمي لتفاعل البوتانول الحمضي 54
6- تحديد طول الموجة الأعظمي وزمن تفاعل الدي فنيل بكريل هيدرازيل 55

7- تحديد السلسلة المعيارية لاختبار الفانيلين المعدل 55

القسم الثاني: 57

1- انتقاء المصدر الطبيعي اللازم لإتمام الدراسة 58

1-1- الرمان Pomegranate 58

1-2- التركيب الكيميائي لقشور الرمان 58

2- تحديد الشروط المثلى للاستخلاص

2-1- المقدمة 59

2-2- طريقة العمل والنتائج 59

2-2-1- استخلاص الفنولات المتعددة من قشور الرمان 59

2-2-1-1- تجفيف وطحن قشور الرمان 59

2-2-1-2- تحديد الوزن الجاف للعينة 60

2-2-1-3- استخلاص الفنولات المتعددة والبروأنتوسيانيدينات من مسحوق قشور 60

2-2-2- دراسة بعض الشروط المؤثرة في فعالية الاستخلاص 60

2-2-2-1- تأثير درجة الحرارة 60

2-2-2-2- تأثير زمن الاستخلاص 61

2-2-2-3- المحلات 63

2-2-2-4- درجة الحموضة pH 63

2-2-2-5- عدد مرات الاستخلاص 65

2-2-2-6- تأثير النسبة صلب:سائل 65

2-2-2-7- تأثير نوع قشور الرمان 66

2-2-2-8- درجة حرارة الحفظ 66

2-3- المناقشة 68

2-3-1- تأثير درجة الحرارة 68

2-3-2- تأثير زمن الاستخلاص 70

2-3-3- المحلات 75

2-3-4- درجة الحموضة pH 78

2-3-5- عدد مرات الاستخلاص 80

2-3-6- تأثير النسبة صلب:سائل 80

2-3-7- تأثير نوع قشور الرمان 81

2-3-8- درجة حرارة الحفظ 83

3- الاستنتاج 85

<u>القسم الثالث:</u> 86

1- المقدمة 87

2- الأجهزة 87

3- طريقة العمل والنتائج 88

3-1- طرائق الاختبارات المتبعة 88

3-2- الألفة 88

3-3- تحضير خلاصة قشور الرمان 89

3-4- التنقية

3-4-1- التثبت على خراطيش الاستخلاص الصلبة 89

3-4-2- الطور الصلب Hypersep C18 90

3-4-3- الطور الصلب Hypersep NH2 90

3-5- التجفيد 91

4- المناقشة 92

4-1- الألفة 92

4-2 التنقية

4-2-1- التثبت على خراطيش الاستخلاص الصلبة 93

4-2-2- الطور الصلب Hypersep C18 93

4-2-3- الطور الصلب Hypersep NH2 94

4-3- التجفيد 97

4-4- القدرة الكابحة للجذور الحرة 98

5- الاستنتاج 98

<u>القسم الرابع:</u> 99

1- المقدمة 100

2- الكواشف والمواد الكيميائية 101

3- الأجهزة 101

4- طريقة العمل والنتائج 101

4-1- تحديد الشروط المثلى للتمحفظ 101

4-2- تحضير المحافظ الدقيقة 102

4-3- فعالية التمحفظ 102

4-4- دراسة بعض الشروط المؤثرة في فعالية التمحفظ:

4-4-1- تأثير تركيز محلول ألجينات الصويوم 102

4-4-2- تأثير تركيز محلول كلوريد الكالسيوم 103
4-4-3- تأثير طريقة الإضافة 104
4-4-4- تأثير زمن التماس مع محلول كلوريد الكالسيوم 105
4-4-5- تأثير زمن التبريد في الحمام الثلجي 106
4-4-6- تأثير إضافة كلوريد الصوديوم 106
4-4-7- تأثير تركيز المادة الفعالة 108
5- المناقشة 109
5-1- تأثير تركيز محلول ألجينات الصوديوم 109
5-2- تأثير تركيز محلول كلوريد الكالسيوم 110
5-3- تأثير طريقة الإضافة 113
5-4- تأثير زمن التماس مع محلول كلوريد الكالسيوم 114
5-5- تأثير زمن التبريد في الحمام الثلجي 115
5-6- تأثير إضافة كلوريد الصوديوم 116
5-7- تأثير تركيز المادة الفعالة 117
6- الاستنتاج 119
7- المشاركة بين ألجينات الصوديوم والبكتين لتغليف المحافظ الدقيقة 120
7-1- المقدمة 120
7-2- الكواشف والمواد الكيميائية 121
7-3- طريقة العمل والنتائج 121
7-3-1- تحضير المحافظ الدقيقة 121
7-4- المناقشة 122
8- القدرة الكابحة للجذور الحرة للمحافظ الدقيقة المحضرة 124
8-1- المقدمة 124
8-2- الكواشف والمواد الكيميائية 124
8-3- طريقة العمل والنتائج 125
8-4- المناقشة 126

القسم الخامس: 127
1- المقدمة 128
2- الكواشف والمواد الكيميائية 128
3- الأجهزة 128
4- طريقة العمل 128

5- النتائج والمناقشة 129
6- الاستنتاج 133

القسم السادس: 134
1- المقدمة 135
2- الأغذية والكواشف 135
3- طريقة العمل والنتائج 136
3-1- المحتوى الكمي من الفنولات المتعددة 136
3-1-2- الحليب 137
3-2- ثبات المحافظ في وقاءات مختلفة 139
3-3- القدرة الكابحة للجذور الحرة 140
4- المناقشة 141
4-1- المحتوى الكمي من الفنولات المتعددة 141
4-1-2- الحليب 144
4-2- ثبات المحافظ في وقاءات مختلفة 147
4-3- القدرة الكابحة للجذور الحرة 149

القسم السابع: 152
1- المقدمة 153
2- ثمار الخرنوب 153
2-1- الوصف النباتي 153
2-2- استعمالات وفوائد شجرة الخرنوب 154
2-3- الاستعمالات الطبية لشجرة الخرنوب 154
2-4- ثمار الخرنوب الجافة 155
2-4-1- فعالية الاستخلاص 155
2-4-2- القدرة الكابحة للجذور الحرة 156
2-4-3- فصل البروأنتوسيانيدينات 157
2-5- ثمار الخرنوب الخضراء 158
2-5-1- فعالية الاستخلاص 158
3- قشور الفستق الحلبي (نوع عاشوري) 160
3-1- الوصف النباتي 160
3-2- الفوائد الصحية للفستق الحلبي 160

3-3- فعالية الاستخلاص 161
3-4- القدرة الكابحة للجذور الحرة 162
4- الاستنتاج 162
استنتاجات عامة 164
التوصيات والمقترحات 168
المقالات المنشورة 170
المراجع 176
Abstract

المقدمة

Preface

تُلقى يومياً كميات ضخمة من المخلفات الزراعية والغذائية في النفايات على الرغم من أنها تختزن كميات كبيرة من المركبات التي يمكن إعادة تدويرها للاستفادة منها في الصناعتين الغذائية والصيدلانية. غالباً لا يتم التخلص من هذه النفايات بطرائق سليمة بيئياً وصحياً، وبالتالي تتحول إلى مصدر أذى للصحة العامة، ناهيك عن فقدانها لقيمتها، كمصدر عضوي هام، بإمكاننا إعادة استخدامه. لا تتطلب عمليات إعادة التدوير استثمارات مالية ضخمة أو مجهوداً كبيراً، كما تتميز بأنها ذات عائد اقتصادي هام وتفيد في التخفيف من التلوث البيئي. إن إعادة تدوير المخلفات يعتبر ذو جدوى بيئية وصحية واقتصادية، ويشكل ضمانة أقوى للاستقرار الاقتصادي والاستقلال الغذائي والصناعي.

تتوفر المركبات الفنولية بتراكيز مرتفعة في أوراق وثمار وبذور ولحاء وأزهار وقشور العديد من النباتات. كما أن بعض أهم مصادرها الرئيسة غير مستهلكة غذائياً مثل بذور العنب ولحاء الصنوبر والأجزاء الخارجية من ثمار الفاكهة.

تتميز المركبات الفنولية بأنها مستقلبات ثانوية تتشكل في النباتات قبل الإصابة بالعامل الممرض وتعرف باسم Performed antimicrobial and insecticidal metabolites، لذلك فهي جزء من الآلية الدفاعية غير الفاعلة Passive resistance mechanism. تتميز بقدرة سامة ضعيفة واسعة الطيف تشمل العديد من الفطور والجراثيم.

تستخدم المركبات الفنولية في الصناعة الغذائية كملونات طبيعية أو مواد حافظة أو مضادات أكسدة أو كمضافات ذات قيمة غذائية. ولقد ازداد الاهتمام بها في الآونة الأخيرة نظراً لفوائدها الصحية في العضوية الحية والتي تعود بشكل رئيس لقدرتها الكابحة للجذور الحرة Free radical scavenging capability فهي تلعب دوراً وقائياً في العديد من الأمراض المزمنة مثل الأمراض القلبية الوعائية والإنتانات الجرثومية والسرطان. تستخدم حالياً الخلاصات النباتية الحاوية على المركبات الفنولية كمتممات غذائية وفي الصناعة الصيدلانية التجميلية.

الملخص

تحتوي القشور الخارجية للعديد من الفواكه على كميات لا بأس بها من المركبات الفنولية المتعددة التي تتميز بفعاليتها الفيزولوجية نظراً لخواصها الكابحة للجذور الحرة. يفوق إنتاج سورية من ثمار الرمان 50 ألف طن سنوياً، وتشكل قشور الرمان حوالي 50% من وزن الفاكهة. ترمى هذه القشور في النفايات على الرغم من احتوائها على كميات لا بأس بها من الفنولات المتعددة، التي تتميز بطعمها القابض وبحساسيتها الشديدة للضوء ولأكسجين الهواء مما لا يسمح بالاستفادة منها واستهلاكها بشكل مباشر.

تم خلال هذه الدراسة، تطوير طريقة سهلة وسريعة لاستخلاص الفنولات المتعددة من قشور الرمان وتنقيتها. ثم حُضرت محافظ دقيقة حاوية على هذه المركبات تسمح بتقنيع الطعم القابض بالإضافة إلى حماية هذه المركبات من الأكسدة والتداخل مع مكونات الغذاء، مع الحفاظ على قدرتها الكابحة للجذور الحرة وبالتالي على فعاليتها الحيوية. أضيفت المحافظ المحضرة إلى العصير والحليب من أجل تحضير أغذية وظيفية مدعمة بمضادات الأكسدة ودرس ثبات مكونات هذه الأغذية.

تم أيضاً خلال هذه الدراسة، البحث عن مصادر أخرى غير مستهلكة غذائياً وحاوية على المركبات الفنولية المتعددة، حيث تم التوصل إلى شروط الاستخلاص المثلى لهذه المركبات من القشور الخارجية للفستق الحلبي ومن ثمار الخرنوب الخضراء والجافة.

يقسم البحث من الناحية العملية إلى سبعة أقسام رئيسة:

<u>القسم الأول: تحديد شروط تطبيق طرائق اختبار الفنولات المتعددة والبروأنتوسيانيدينات:</u>

تم خلال هذا القسم تحديد شروط تطبيق اختبار الفولين–سيوكالتو والسلسلة المعيارية لحمض الغاليك التي تستعمل للتعبير عن كمية الفنولات المتعددة، كما تم تحديد شروط تطبيق اختبار البوتانول الحمضي والسلسلة المعيارية للكاتشين التي تسمح بحساب المردود الكمي للبروأنتوسيانيدينات، تم أيضاً تحديد الشروط المثلى لاختبار القدرة الكابحة للجذور الحرة DPPH assay.

<u>القسم الثاني: تحديد الشروط المثلى لاستخلاص البروأنتوسيانيدينات من قشور الرمان:</u>

تعتبر عملية الاستخلاص هي المرحلة الأولى والأهم في الحصول على المركبات الفنولية من المصادر النباتية المختلفة. يتأثر المردود الكمي للمركبات الفنولية بالعديد من شروط الاستخلاص مثل محل الاستخلاص ودرجة قطبيته، ودرجة حرارة وزمن الاستخلاص، والخواص الكيميائية والفيزيائية للعينة. بينت النتائج أن إطالة زمن الاستخلاص أكثر تأثيراً في تخرب المركبات الفنولية في الخلاصة بالمقارنة مع ارتفاع درجة الحرارة، حيث يمكن الحصول على أعلى مردود الكمي للفنولات المتعددة والبروأنتوسيانيدينات باستعمال الماء المقطر كمحل للاستخلاص بدرجة الحرارة 50°م لمدة 20 دقيقة. ترافق المردود الكمي العالي من الفنولات المتعددة مع أعلى

قدرة كابحة للجذور الحرة لخلاصة قشور الرمان، حيث تبين النتائج وجود علاقة طردية بين المحتوى الكمي من الفنولات المتعددة في الخلاصة وبين القدرة الكابحة للجذور الحرة.

دُرس أيضاً ثبات الخلاصة المائية الناتجة وقدرتها الكابحة للجذور الحرة في درجات حرارة حفظ مختلفة فتبين أن الخلاصة المائية لقشور الرمان تبقى ثابتة لدى حفظها بدرجة حرارة المجمدة (-18°م) لمدة تتجاوز 15 يوماً.

القسم الثالث: تنقية البروأنتوسيانيدينات المستخلصة ودراسة قدرتها المضادة للأكسدة:

إن استعمال الماء المقطر كمحل للاستخلاص يؤدي إلى احتواء الخلاصة على العديد من المركبات الفنولية وغير الفنولية مما يستدعي إيجاد طريقة فعالة لتنقية الخلاصة. كما بينت التجارب المطبقة أن حوالي ثلث القدرة الكابحة للجذور الحرة في خلاصة قشور الرمان الأحمر تعود لمحتواها من البروأنتوسيانيدينات. لذا كان من المهم تطوير طريقة لعزل هذه المركبات عن بقية المركبات الفنولية في الخلاصة المائية.

بينت النتائج أن استعمال خراطيش استخلاص الأمينوبروبيل يسمح بعزل وتنقية البروأنتوسيانيدينات المستخلصة بفعالية أكبر من خراطيش استخلاص السيليكا، وذلك باستعمال الأسيتون المائي المقلون بدرجة حموضة 9.5 كسائل للتمليص. تتميز الآلية المقترحة بأنها اقتصادية، بسيطة وسهلة التطبيق، تسمح بتنقية حوالي 90% من البروأنتوسيانيدينات المستخلصة كما تسمح بفصلها عن بقية المركبات الفنولية وغير الفنولية.

القسم الرابع: تحضير محافظ دقيقة من المركبات الفنولية لاستعمالها في الأغذية الوظيفية:

تم الاعتماد في هذا القسم من البحث على تقنية التقوصر Coacervation لمحفظة الفنولات المتعددة المستخلصة من قشور الرمان الأحمر. بينت النتائج التي تم الحصول عليها أنه يمكن الحصول على أفضل فعالية للتمحفظ باستعمال ألجينات الصوديوم بتريكز 3%، وكلوريد الكالسيوم بتركيز 0.05 مول/لتر وذلك بفترة نقع لا تتجاوز 20 دقيقة وفترة تبريد لا تتجاوز 15 دقيقة من أجل الصيغة الحاوية على خلاصة 1 غرام من قشور الرمان في 100 مل من الماء المقطر. بلغت فعالية التمحفظ في هذه الشروط 43.90% ± 2.918 بالنسبة لمجموع الفنولات المتعددة المستخلصة و 46.34% ± 1.722 لمجموع البروأنتوسيانيدينات.

تم أيضاً استعمال المشاركة بين ألجينات الصوديوم والبكتين لتغليف الفنولات المتعددة في الخلاصة المائية لقشور الرمان فتبين أن استعمال كلا المركبين بنسبة 1:2 أدت إلى أفضل فعالية لتمحفظ كل من الفنولات المتعددة والبروأنتوسيانيدينات، حيث بلغت نسب تمحفظ كلا المركبين 1.7±50.2% و 1.7±51.8% على التوالي. تسمح المحافظ المحضرة بحماية الفنولات المتعددة من تأثير العوامل الخارجية وتحافظ على قدرتها الكابحة للجذور الحرة.

القسم الخامس: دراسة تحرر محافظ المركبات الفنولية في الزجاج في الوسطين المعدي والمعوي:

سمحت كلا طريقتي التغليف بالحفاظ على القدرة الكابحة للفنولات المتعددة المحتبسة ضمن الغلاف، ولكن للوصول إلى الفعالية الفيزيولوجية لابد من انتشار هذه المركبات من أغلفتها في العضوية الحية. لذا أجريت دراسات التحرر في الزجاج في كلا الوسطين المعدي والمعوي، حيث بينت النتائج أن الفنولات المتعددة قادرة على التحرر من المحافظ المحضرة وأن استعمال المشاركة بين ألجينات الصوديوم والبكتين تطيل من زمن التحرر حيث تحررت نسبة 64.87% و 48.81% من الفنولات المتعددة في الوسط الشبيه بالمعدة من المحافظ المحضرة باستعمال ألجينات الصوديوم والمشاركة بين ألجينات الصوديوم والبكتين على التوالي. كما تحررت نسبة 88.37% و 70.48% من الفنولات المتعددة في الوسط الشبيه بالأمعاء من المحافظ المحضرة باستعمال ألجينات الصوديوم والمشاركة بين ألجينات الصوديوم والبكتين على التوالي.

القسم السادس: دراسة ثبات محافظ المركبات الفنولية في الأغذية:

من أجل الاستفادة من الفنولات المتعددة المستخلصة من قشور الرمان، تمت دراسة إضافة الخلاصة المائية أو المحافظ المحضرة إلى العصير والحليب السائل. بينت دراسات الثبات في درجة الحفظ بالبراد أن الخلاصة المائية للفنولات المتعددة أكثر ثباتاً في العصير بينما كانت المحافظ المحضرة بالمشاركة بين ألجينات الصوديوم والبكيتن أكثر ثباتاً في الحليب السائل.

كما بينت النتائج التي تم الحصول عليها خلال هذا القسم من الدراسة أن إضافة الخلاصة المائية للفنولات المتعددة إلى العصير لا تؤثر على قدرتها الكابحة للجذور الحرة ضمن شروط الحفظ المتبعة بالمقارنة مع الخلاصة المائية الممددة بنفس الحجم والمحفوظة بنفس الشروط. أما لدى إضافة هذه الخلاصة إلى الحليب فقد انخفضت القدرة الكابحة للجذور الحرة مباشرة فور الإضافة والمزج بنسبة حوالي 50% بالمقارنة مع الخلاصة الممددة بنفس الحجم من الماء المقطر والمعرضة لنفس شروط الحفظ. يعود هذا الانخفاض في القدرة الكابحة للجذور الحرة لارتباط الفنولات المتعددة مع بروتينات الحليب، حيث بينت التجربة أن وضع مزيج الحليب مع الخلاصة المائية في وسط من حمض كلور الماء بدرجة حموضة 1.2 وبدرجة حرارة 37°م لمدة ساعتين يؤدي إلى ارتفاع في القدرة الكابحة للجذور الحرة، أي أنه يمكن التنبؤ بأن الحموضة المعدية قادرة على إحداث انفكاك جزئي للارتباط بين الفنولات المتعددة وبروتينات الحليب.

القسم السابع: تطبيقات الاستخلاص على بعض العينات النباتية:

تم خلال هذا القسم، البحث عن نباتات أو أجزاء من نباتات غير مستهلكة غذائياً ومنتشرة في سوريا كمصادر طبيعية للفنولات المتعددة. تم اختيار القشور الخارجية للفستق الحلبي وثمار الخرنوب، حيث أجريت مقارنة بين ثمار الخرنوب الجافة والخضراء من أجل تحديد تأثير زمن النضج في المحتوى الكمي من الفنولات المتعددة.

إن استعمال مزيج الإيتانول مع الماء المقطر (25% ح/ح) يسمح بالحصول على أعلى مردود كمي من الفنولات المتعددة من القشور الخارجية للفستق الحلبي، حيث بلغت كمية الفنولات المتعددة والبروأنتوسيانيديدينات في القشور المدروسة (11.69±0.205 (g/100 g GAE و (0.64±0.014 (g/100 g على التوالي.

بلغ المردود الكمية من الفنولات المتعددة في ثمار الخرنوب الأخضر (20.056±0.980 (g GAE/100g بينما لم يتجاوز مردودها في ثمار الخرنوب الجافة (4.969±0.119 (g GAE/100g أي أن حوالي ثلاثة أرباع كمية الفنولات المتعددة قد تخربت خلال نضج الثمار. أيضاً فإن كمية البروأنتوسيانيدينات في ثمار الخرنوب الأخضر كانت حوالي 8 أضعاف كميتها في ثمار الخرنوب الجافة.

بالإضافة إلى الاختلاف في المردود الكمي للفنولات المتعددة، نلاحظ اختلافاً في المحل الأمثل للاستخلاص، حيث يؤدي استعمال الإيتانول 10% إلى الحصول أعلى مردود كمي من الفنولات المتعددة من ثمار الخرنوب الجافة بينما يجب استعمال الإيتانول 25% للحصول على أعلى مردود كمي من الفنولات المتعددة من ثمار الخرنوب الخضراء، مما يدل على اختلاف في البنية الكيميائية للمركبات الفنولية بين ثمار الخرنوب الخضراء وثمار الخرنوب الجافة. أما بالنسبة للبروأنتوسيانيدينات فيعتبر الأسيتون 70% هو المحل الأمثل لاستخلاصها من كلا نوعي ثمار الخرنوب.

تم خلال هذا القسم أيضاً تطوير طريقة سهلة وسريعة لفصل البروأنتوسيانيدينات عن بقية المركبات الفنولية من ثمار الخرنوب، تعتمد هذه الطريقة على إجراء استخلاص متتالي لمسحوق ثمار الخرنوب باستعمال الإيتانول المطلق ثلاث مرات متتالية ومن ثم استعمال الأسيتون 70% مرتين متتاليتين. تحتاج هذه الطريقة إلى عمليات تنقية إضافية للتخلص من المركبات الدسمة والمركبات السكرية والحموض العضوية التي قد تتواجد في العينة.

Abstract

Polyphenols are broadly distributed in the plant kingdom and are increasingly recognized as having beneficial effects on human health because of their potent antioxidant capacity. Syrian production of pomegranate fruits (Punica granatum) exceeds 50 thousand tons per year, and pomegranate peel constitute about 50% of the fruit's weight. Those peels are usually discarded as waste even a significant portion of polyphenols are often present in high concentrations in the outer parts of fruits. Polyphenols are characterized by their astringency and extreme sensitivity to light and oxygen, which does not allow to consum them directly.

During this study, a quick and easy method for the extraction and purification polyphenols from pomegranate peels was developed. Then microcapsules were prepared in order to mask the astringent taste as well as to protect these compounds from external oxidation and interaction with food components, while maintaining their ability of scavenging free radicals and therefore their physiological efficiency. Prepared microcapsules were added to juice and milk for the preparation of functional foods and their stability was studied.

Also during this study, other natural sources of polyphenols were studied. Optimal extraction procedure was developed for both carob pods and external pistachio shell.

This study is practically divided into seven parts:

<u>First part: Determination of polyphenols and proanthocyanidins quantification method's conditions:</u>

During this part, we determine the conditions of application of folin-Ciocalteu assay and the standard curve of gallic acid which expresse the amount of phenolic compounds. Also, the conditions of application of acid-butanol assay and the standard curve of catechin were studied in order to calculate the yield of proanthocyanidins. Finally, the conditions of the DPPH assay were determined to examine the free radical scavenging properties.

<u>Second part: Optimal conditions for Proanthocyanidins' extraction from pomegranate peels':</u>

The extraction process is the first and most important stage in getting phenolic compounds from different plant sources. It is generally known that the yield of chemical extraction depends on the type of solvents with varying polarities, extraction time and temperature, as well as on the chemical composition and physical characteristics of the samples. Results showed that long extraction time had more impact on the degradation of phenolic compounds compared with high temperature. The recovery of polyphenols and proanthocyanidins was the highest when water was used as solvent of extraction at 50°C for 20 min. Highest quantitative yield of phenolic compouds was accompanied with highest free radicals scavenging capacity

of pomegranate peel extract. In conclusion, the DPPH radical scavenging activity of extracts has a linear relationship with the polyphenols yield.

The stability and the free radical scavenging activity of the aqueous extract was studied at different storage temperatures. The aqueous extract remained stable when stored at frozen temperature (-18° C) for more than 15 days.

Third part: Purification of extracted proanthocyanidins and determination of its antioxidant capacity:

The final aqueous extract contains many phenolic and non-phenolic compounds, so it's required to find an effective procedure for its purification. Results also showed that about one-third of the inhibiting ability of free radicals in the red pomegranate peel extract is due to its contents of proanthocyanidins, so it was important to develop a way to separate these compounds from other polyphenols.

A comparison of two SPE cartridges, including silica-based C18 and aminopropyl for the isolation and purification of proanthocyanidins extracted from pomegranate's peel, showed that the proposed SPE method with aminopropyl cartridge using alkalized aqueous acetone at pH 9.5 as eluent was more effective for the purification and the separation of 90% extractable proanthocyanidins.

Fourth part: Microencapsulation of extracted polyphenols to prepare functional foods:

Coacervation method was used in this study to encapsulate the extacted polyphenols. The formulation containing an extract of 1g pomegranate peels in 100 ml distilled water encapsulated with 3% of sodium alginate cured in 0.05M calcium chloride for 20 min and kept in a gelling bath for 15 min was chosen as the best formula regarding the loading efficiency. This optimized conditions allowed the encapsulation of 43.90 ± 2.918% of total extracted polyphenols and 46.34 ± 1.722% of total extracted proanthocyanidins.

A combination of sodium alginate and pectin was also used for the encapsulation of the extracted polyphenols, a ratio of these two polymers (2:1) was responsible for the maximum polyphenol content. The microencapsulated particles provided to polyphenols an effective protection against the degradation phenomenon, whereas antioxidant activity remained identical.

Fifth part: Studying the In-vitro release of the microcapsules in simulated gastric and intestinal fluids:

The results obtained showed that microbeads presented only slight variations around their original antioxidant activity measured by DPPH assay. But in order to evaluate their probable physiological activity, in vitro release studies of gel beads were conducted in both simulated gastric fluid (SGF) and simulated intestinal fluid (SIF).

The release pattern of polyphenol from microbeads prepared with combination of polymers (sodium alginate and pectin) was entirely different from that prepared

with single polymer (sodium alginate). The release of polyphenol from calcium alginate microbeads was found to be 64.87 ± 0.05 % in pH 1.2 within 2 h. When pectin was added to sodium alginate, only 48.81 ± 0.06 % of polyphenol was released in pH 1.2 within 2 h. 88.37% and 70.48% of polyphenols were released within 3 h in the dissolution medium SIF (pH 6.8) from alginate microbeads and pectin alginate combination microbeads respectively.

Sixth part: Studying the stability of the microcapsules in food:

Functional foods were prepared by adding aqueous pomegranate peels extract or polyphenol microbeads to orange juice and bovine milk. Stability studies in refrigerator showed that aqueous extract was more stable in juice, while pectin alginate microbeads were more stable in milk.

The results also showed that the addition of aqueous extract to juice didn't affect its radical scavenging activity compared with diluted extract saved under the same conditions. While the scavenging activity was decreased immediately by about 50% when the extract was added to milk. It may be due to the formation of polyphenol-milk protein complexes. To study the degradation of these complexes in gastro intestinal tract, a mixture of aqueous extract with milk was kept in HCl medium at pH 1.2 and temperature of 37º C. Results showed that after 2 hours, radical scavenging activity of the mixture increased, so it can be predicted that the acidic gastric medium can cause a partial degradation of the polyphenol-milk protein complexes.

Seventh part: Application of extraction method on some plant samples:

During this part, we search for natural polyphenols sources. We focused in our research on plants or part of plants widely distributed in Syria and which could not be consumed directly in food dietry. External pistachio shell and carob pods were selected. Comparison between green and dry carob pods was made in order to determine the effect of maturity on the quantitative content of phenolic compounds.

The recovery of polyphenols and proanthocyanidins was the highest in external pistachio shell when ethanol and water mixture (25% v/v) was used as solvent of extraction. The yield of polyphenols and proanthocyanidins was 11.69±0.205 (g/100 g GAE) and 0.64±0.014 (g/100 g) respectively.

The yield of polyphenols in green carob pods was 20.056±0.980 (g GAE/100g), while its yield in dry carob pods was only (g GAE/100g) 4.969±0.119. and proanthocyanidins was 11.69±0.205 (g/100 g GAE) and 0.64±0.014 (g/100 g) respectively. Also the amount of proanthocyanidins in the green carob pods was about 8 times its quantity in dry pods.

In addition to the difference in quantitative yield, there is a difference in the optimal solvent of extraction. The use of ethanol 10% gave the highest quantitative yield in dry carob pods while the use ethanol 25% was better for the extraction of polyphenols from green pods, which shows the probable difference in the chemical structure of the compounds during maturity. As for proanthocyanidins, 70% acetone is the best solvent for both types of carob pods.

During this part also, a quick and easy method for the separatation of proanthocyanidins was developed. This method is based on a sequential extraction of the fruits using absolute ethanol three times and then 70% acetone for twice. This method needs additional purification processes to get rid of fat and sugar compounds and organic acids that may be present in the sample.

Syrian Arab Republic

University of Aleppo

Faculty of Pharmacy

"Optimal Extraction Conditions of Proanthocyanidins from Natural Sources and their Microencapsulation in Functional Foods"

Research prepared for Ph.D degree in food control

By

Wissam Zam

Supervision

Prof. Warid Khayata

Professor in physical chemistry

Faculty of pharmacy-Aleppo

Co-supervision

Prof. Ghada Bashour

Professor in food chemistry

Faculty of pharmacy-Aleppo

Participation

Dr. Wassim Abdelwahed

Doctor in pharmaceutical technology
Faculty of pharmacy-Aleppo

Syrian Arab Republic

University of Aleppo

Faculty of Pharmacy

"Optimal Extraction Conditions of Proanthocyanidins from Natural Sources and their Microencapsulation in Functional Foods"

Research prepared for Ph.D degree in food control

By

Wissam Zam

2014/1435

جامعة حلب - كلية الصيدلة "تحديد الشروط المثلى لاستخلاص البروأنتوسيانيدينات من مصادرها الطبيعية وتحضيرها على شكل محافظ دقيقة لاستعمالها في الأغذية الوظيفية" **إعداد: وسام زم**

جامعة حلب - كلية الصيدلة "تحديد الشروط المثلى لاستخلاص البروأنتوسيانيدينات من مصادرها الطبيعية وتحضيرها على شكل محافظ دقيقة لاستعمالها في الأغذية الوظيفية" إعداد: وسام زم

جامعة حلب - كلية الصيدلة "تحديد الشروط المثلى لاستخلاص البروأنتوسيانيدينات من مصادرها الطبيعية وتحضيرها على شكل محافظ دقيقة لاستعمالها في الأغذية الوظيفية" إعداد: وسام زم

جامعة حلب - كلية الصيدلة "تحديد الشروط المثلى لاستخلاص البروأنتوسيانيدينات من مصادرها الطبيعية وتحضيرها على شكل محافظ دقيقة لاستعمالها في الأغذية الوظيفية" إعداد: وسام زم

جامعة حلب - كلية الصيدلة "تحديد الشروط المثلى لاستخلاص البروأنتوسيانيدينات من مصادرها الطبيعية وتحضيرها على شكل محافظ دقيقة لاستعمالها في الأغذية الوظيفية" إعداد: وسام زم