إستخلاص الكارنوسينات من سمك الخشني *Liza abu* L. وتشخيصها بتقنيات مختلفة

روضة محمود علي العلي ، أم البشر حميد جابر الموسوي ، لينا سمير محمد

قسم علوم الأغذية/ كلية الزراعة/ جامعة البصرة/ البصرة، العراق

E-mail: rawdahmalali@gmail.com

الخلاصة

تم إستخلاص الكارنوسينات كحوليا ومائيا من سمك الخشني، ثم شُخصت بعدة طرائق منها التشخيص الطيفي بإستعمال الأشعة فوق البنفسجية-المرئية-UV Spectroscopy Identificated using visible وتقنية مطياف الأشعة تحت الحمراء Fourier Transform.Infrared.Spectroscopy. وكروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة (HPLC) High Performance Liquid.Chromatography. أظهر التشخيص الطيفي بإستعمال الأشعة فوق البنفسجية–المرئية للكارنوسينات قمة واحدة عند الطول الموجي 215 نانومتر، وعند التشخيص بكروماتوكرافيا السائل عالي الكفاءة HPLC بلغ وقت الإحتجاز للكارنوسين القياسي 2.532 دقيقة وللكارنوسينات الكحولية المفصولة2.614 دقيقة وللكارنوسين المائي 2.625 دقيقة، وبعد إجراء كشف السُمية ثُبت عدم وجود أي سُمية للكارنوسينات المُحضرة على محلول دم الإنسان ولم تحدث أية تغيرات في شكله ومظهره.

كلمات مفتاحية: سمك الخشني، الكارنوسينات، HPLC، الأشعة فوق البنفسجية المرئية، مطياف الأشعة تحت الحمراء.

المقدمة

توجد الببتيدات الثنائية المسماة بالكارنوسينات في الأسماك ومنها سمك السلمون والدولفين والحفش والسلمون المرقط وكذلك توجد في اللافقريات ومنها السرطان البحري والروبيان والحبار والمحار العملاق إذ تختلف نسبها بإختلاف هذه الحيوانات، ويكون تركيزها أقل في أسماك التونة والرنجة والسردين وسمك الشبوط، ففي الحوت الأزرق تراوحت نسبة الكارنوسينات 50–60 ملي مول/ كغم

وفي الروبيان كانت 338.6 ملي مول/ كغم وفي سمك التونة كانت النسبة 142.1 ملي مول/ كغم (Aristoy.&.Toldra, Jones.*et.al.,* 2011;.Boldryev.*et.al.,* 2013 ;2004).

وجدت الكارنوسينات بشكل واسع في أسماك التونة والسلمون المرقط، إذ لها دورا حيويا في منع عمليات الأكسدة داخل خلايا الجسم خصوصا الدماغ والعضلات ويُعتقد أنها تكون بمثابة دوارئ للجدار الخلوي ضد أنواع الأوكسجين الفعال ذات الأثر التفاعلي داخل خلايا الجسم (Manhiani,.2011)، كما أن لها تأثير مضاد للتعب والإرهاق الذي يحدث للجسم بين آونة وأخرى ولذلك فقد يوصى بإستعماله للتعافي من حالات الإرهاق البدني (.Wu,*et.al.,*,2003;.Boldyrev.*et.al.,* 2004;.Kishi *et.al.,* 013).

وصفت الكارنوسينات بأنها عوامل مساعدة في إنقباض العضلات وتُسهم في عمل المحلول المنظم في الهيكل العظمي والعضلات وفي تنظيم بروتينات عضلة القلب وكعامل ضد الشيخوخة بالاضافة إلى الأهمية التي إمتازت بها في منع عمليات الأكسدة من خلال ربط الجذور الحرة وإزالة الأوكسجين النشط وفي تحليل البيروكسيدات وربط المعادن الثقيلة (Manhiani.*et,al.,* 2013).

إستعملت الكارنوسينات كمكملات غذائية وفي تنشيط كريات الدم الحمراء وحمايتها من التلف التأكسدي في الدورة الدموية وزيادة كفاءتها ويمكن أن تُعد كأحد مضادات الأكسدة القوية والتي تتميز بانه ليس لها آثار جانبية كونها مركبات طبيعية و ليس لها تأثير سام وتمتلك خصائص الكلوكوز في الدم وكعامل وقائي علاجي لأمراض محتملة في الدم//وفي التئام الجروح ومضاد للإلتهابات وكعامل مؤثر في التقليل من آثار القرحة وفي حماية الأغشية (Aydogan, 2012).

وجد من خلال التجربة بإستعمال مطياف الأشعة فوق البنفسجية أن أعلى امتصاصية للكارنوسين كانت عند طول موجي213 نانومتر. وعند إستعمال الأشعة تحت الحمراء في تشخيص المجاميع الفعالة في الكارنوسين فإنه إحتوى على العديد منها وهي: المجموعة الامينية ومجموعة الامايد Amide كذلك مجاميع (C5=C4) و Stretching.Imidazole و Ƨ(N-H) و $Vs(COO^-)$ و v(C-N) و Imidazolev (NCN) و Imidazole..δ.(N-H) (Khosravi *et al.,* 2012).

المواد وطرق العمل

تم الحصول على سمك الخشني الطازج من السوق المحلية في محافظة البصرة تم تقطيعها إلى قطع صغيرة وعُبئت العينات في أكياس البولي أثيلين ثم حُفظت جميعها بالتجميد −18 ± 2 ° م لحين الاستعمال.

إستخـلاص الكارنوسـينـات Extraction of Carnosins

1- الإستخـلاص بالايثانول Ethanol Extraction

تم الاستخلاص وفقاً للطريقة المتبعة من قبل Auh.*et.al*.(2010) وذلك بوضع العينات في الثلاجة 5 ± 1°م إلى اليوم التالي، وبإذابة 250غم من العينات المجمدة بنسبة 1: 2.4 من المحلول الكحولي ذو تركيز 35% ثم حُضنت بعدها على درجة حرارة 25 °م مع التحريك مدة 1-3 ساعة، نُبذ المزيج مركزيا بسرعة g ×14000 لمدة 30 دقيقة، أُخذ بعدها 300 مل من الراشح وخلط مع 900 مل من كحول الايثانول البارد تركيز 35% حُفظ المزيج في الثلاجة 5 ± 1 °م مدة 30 دقيقة، أجريت له بعدها عملية نبذ مركزي ثم الترشيح باستعمال ورق الترشيح Whatman.No.4 .

2-الاستخـلاص بالمـاء Aqueous Extraction

أتُبعت طريقة Maikhunthod.and.Intarapichet (2005). في إستخلاص الكارنوسينات وذلك بإذابة 250غم من العينات المجمدة وتركها بدرجة حرارة الثلاجة 5 ±1°م إلى اليوم التالي، بعد ذلك تم المزج بخلاط كهربائي مدة دقيقتين على سرعة عالية مع إضافة ماء مقطر المزالة منه الأيونات والمبرد مسبقاً بنسبة 2:1 مع إستمرار المزج مدة دقيقة واحدة، أُجري الفصل بعدها بجهاز النبذ المركزي على سرعةg × 10000 مدة 30 دقيقة ، أُخذ الجزء الرائق وأعيد ترشيحه باستعمال أوراق الترشيح Whatman.No.4، وضع المحلول الرائق بعدها في حمام مائي عند درجات حرارة مختلفة (60 و 80 و 100°م) مدة 10 دقائق، أزيل الراسب بالنبذ المركزي ثم ترشيحه بأوراق الترشيح Whatman.No.4 لإزالة البروتينات المترسبة، حُفظت العينات بعدها بالتجميد.

3-الفصل بالترشيح الفائق Seperation with Ultrafiltration

أجري الفصل باستعمال جهاز الترشيح الفائق Ultrafiltration وذلك بتمرير الرواشح المستخلصة من الخطوة السابقة عبر أغشية حجم مساماتها (5، 10، 30) كيلو دالتون وتحت ضغط 70.Pis أي ما يعادل 4.7 كغم /سم² وباستعمال غاز النتروجين

وذلك لمنع حدوث الأكسدة، جُمع الراشح الجديد ورُكز باستعمال المُبخر الفراغي الدوار على درجة 40 °م، ثم جُفد الراشح المركز بجهاز التجفيد.

تشخيص الكارنوسينات Identification of Carnosins

1- التشخيص الطيفي بإستعمال الأشعة فوق البنفسجية . المرئية .

إتُبعت الطريقة التي أجرتها الحاجي (2006) في تشخيص الكارنوسينات بإستعمال مدى من الأطوال الموجية تراوح بين (200-400) نانومتر.

2- التشخيص باستعمال جهاز كروموتوغرافيا السائل عالي الكفاءة

شُخصت مركبات الكارنوسينات حسب طريقة Antoine.*et.al.* (1999) والموصوفة من قبل Maikhunthod and.Intarapichet (2005) بتقنية كروموتوغرافيا السائل عالي الكفاءة (HPLC) العائد الى قسم الكيمياء/ مركز علوم البحار/ جامعة البصرة.

3- التشخيص بتقنية مطياف الأشعة تحت الحمراء

أخذت العينات المفصولة من خطوة الترشيح الفائق ومُزجت كلا على حدة مع KBr وعُملت بهيئة أقراص جافة وسُجل طيف الأشعة تحت الحمراء لها بجهاز FT-IR العائد إلى قسم الكيمياء/ كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة البصرة.

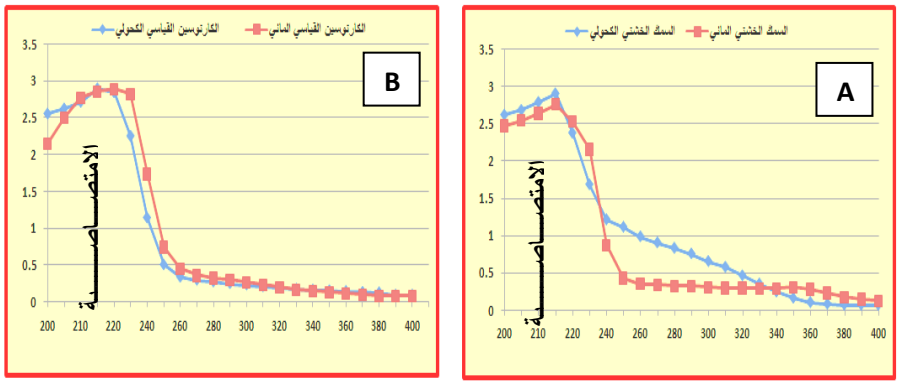
. كشف وتحديد السمية الخلوية للكارنوسينات المستخلصة على محلول دم الانسان

أجري كشف وتحديد سمية الكارنوسينات وفقا للطريقة التي أجراها Nair.*et.al.* (1989). .

النتائج والمناقشة

التشخيص الطيفي بإستعمال الاشعة فوق البنفسجية-المرئية

من نتائج فحص الكارنوسينات المنقاة من سمك الخشني بتقنية الترشيح الفائق والمُشخصة بإستعمال الأشعة فوق البنفسجية والمرئية (200-400) نانومتر والموضحة في الشكل (1) أظهرت قمة واحدة عند الطول الموجي (215) نانومتر وبقيم إمتصاصية مختلفة، فكانت أعلى إمتصاصية 2.899 للمستخلص الكحولي، أما للمستخلص المائي فكانت 2.754، بينما لمركب الكارنوسين القياسي الكحولي فإن أعلى إمتصاصية له كانت2.894، أما الكارنوسين القياسي المائي فكانت 2.889.



A- كارنوسين سمك الخشني الكحولي والمائي B-الكارنوسين القياسي الكحولي والمائي

شكل (1): الطول الموجي الأمثل للكارنوسينات

إتفقت النتائج مع ما توصل إليه Branham.*et.al.* (2011) فقد ذكروا بأن أعلى إمتصاصية للكارنوسين كانت بحدود 2.9 عند الطول الموجي 214 نانومتر، بينما كانت أعلى إمتصاصية للكارنوسين بحدود 2.99 عند الطول الموجي 213 نانومتر (Khosravi.*et.al.*, 2014).

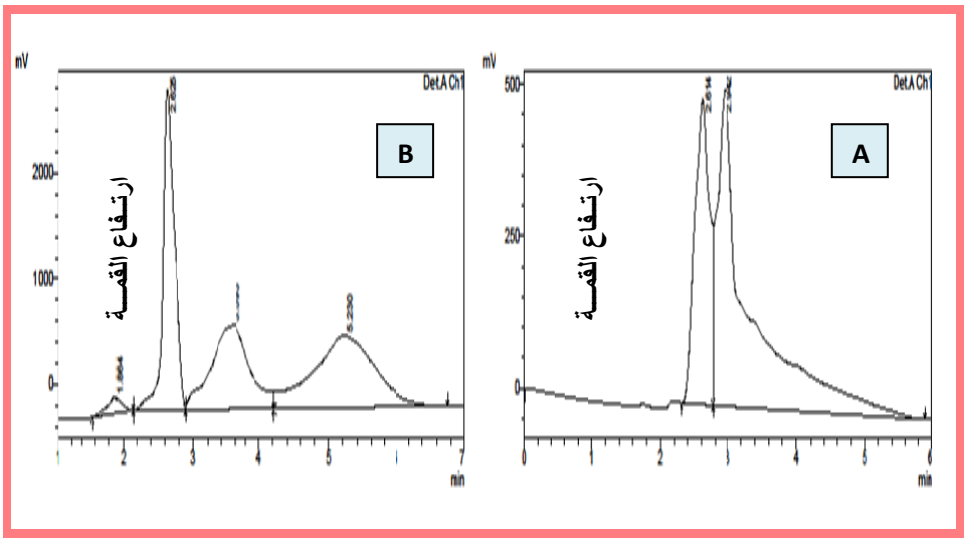
التشخيص بكروماتوغرافيازالسائل..عالي..الكفاءة.ز (HPLC)

أظهرت نتائج فحص الكارنوسينات الكحولية والمائية لسمك الخشني المشُخصة بتقنية كروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة (HPLC) وجود قمة بأوقات إحتجاز مختلفة وبتراكيز متباينة فيما بينها، فبالنسبة للمستخلص الكحولي بلغ وقت إحتجاز الكارنوسين2.614 دقيقة وبتركيز 180.75خحمايكروغرام/غرام، بينما للمستخلص المائي بلغ وقت الاحتجاز 2.625 دقيقة وبتركيز 904.72 مايكروغرام/غرام (شكل 2).

التشخيص بمطياف الأشعة تحت الحمراء للكارنوسينات الكحولية والمائية والمجاميع التابعة لها:

يوضح الجدول (1) أهم مواقع حزم الأشعة تحت الحمراء المفصولة من الكارنوسينات الكحولية والمائية للسمك الخشني وللكارنوسين القياسي، يوضح الشكلان (3) و (5) طيف الأشعة تحت الحمراء لمستخلص السمك والكارنوسين القياسي الكحولي، إذ أعطت حزم

عريضة عند العدد الموجي 3466.08 سم$^{-1}$ لسمك الخشني و 3435.22 سم$^{-1}$ للكارنوسين القياسي وهي من أنواع الإهتزاز التمددي التي تعود الى مجموعة+(NH3) وتفسير ذلك يرجع إلى ذرة الهيدروجين التابعة إلى حلقة الاميدازول Imidazole-ring حيث أن هذه الذرة تشترك كذرة مانحة، كما ظهر الطيف عند العدد الموجي 1631.78 سم$^{-1}$ في سمك الخشني وهو يعود للمجموعة Amide1، و 1072.42 سم$^{-1}$ لسمك الخشني وبالنسبة للكارنوسين القياسي كان 1083.99 سم$^{-1}$ وتعود حزمة الطيف لمجموعة δ(C-H) الموجود في حلقة الاميدازول Imidazole-ring الموجودة في ذرة الكربون رقم 7، كما ظهر طيف الحزمة عند العدد الموجي 972.12 سم$^{-1}$ لكل من سمك الخشني و 972.12 سم$^{-1}$ للكارنوسين القياسي والعائدة لمجموعة δ(C-H) الموجود في حلقة الاميدازول الموجودة في ذرتي الكربون رقم 2 و 4 كما ظهر طيف الحزمة عند العدد الموجي 804.32 سم$^{-1}$ لسمك الخشني وللكارنوسين القياسي وهي عائدة لمجموعة deformation+(NH3)، وجاءت هذه النتائج متقاربة مع ما توصل اليه Branham *et al.*(2011)



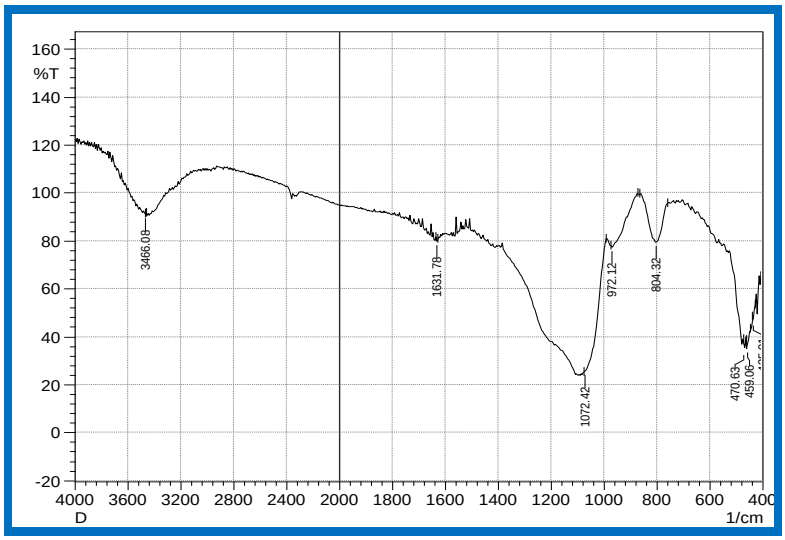
زمن الإحتجاز (دقيقة) A الكحولي زمن الإحتجاز (دقيقة) B-المائي

شكل (2): مرتسم الكارنوسين بطريقة HPLC لمستخلصي سمك الخشني

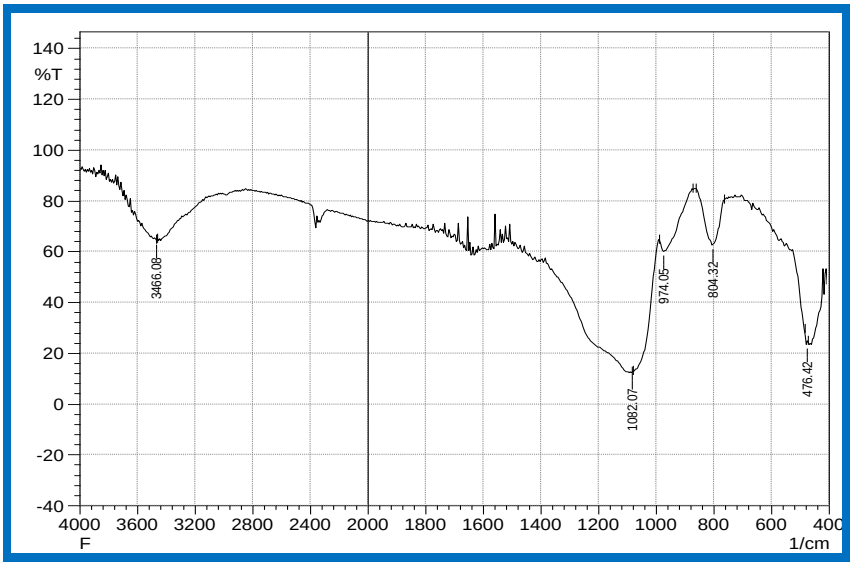
يُبين الشكل (4) كارنوسينات سمك الخشني المائي طيف الأشعة تحت الحمراء، إذ أعطت حزم عريضة عند العدد الموجي 3466.08 سم$^{-1}$ وهي من أنواع الاهتزاز التمددي التي تعود الى مجموعة+(NH3). وظهر الطيف عند العدد الموجي 1082.70 سم $^{-1}$ وتعود حزمة الطيف لمجموعة δ(C-H) الموجودة في حلقة الاميدازول عند ذرة الكربون رقم 7، كما ظهر طيف الحزمة عند العدد الموجي 974.05 سم$^{-1}$، وظهرت حزمة ضيقة عند العدد الموجي 972.12 سم$^{-1}$ كذلك ظهر طيف الحزمة عند العدد الموجي 804.32 سم$^{-1}$.

جدول (1): طيف الأشعة تحت الحمـراء FTIR للكارنوسـينات

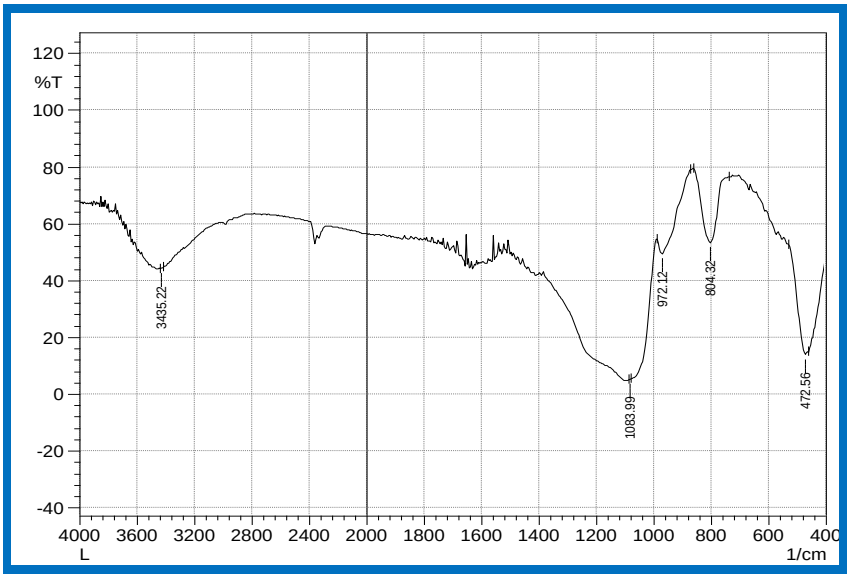
أنواع المستخلصات المجاميع الفعالة	سمك الخشني الكحولي	سمك الخشني المائي	الكارنوسين القياسي
(NH3)+	3466.08	3466.08	3435.22
Amide1	1631.78	—	—
δ(C–H)	1072.42	1082.07	1083.99
δ(C–H)	972.12	974.05	972.12
(NH3)+deformation	804.32	804.32	804.32
مجاميع أخرى	459.06–470.63	—	472.56



شكل (3): مرتسم تشخيـص الكارنوسيـن بتقنية FTIR لكارنوسـين سمك الخشني الكحولي



شكل (4): مرتسم تشخيص الكارنوسين بتقنية FTIR لكارنوسين السمك الخشني المائي

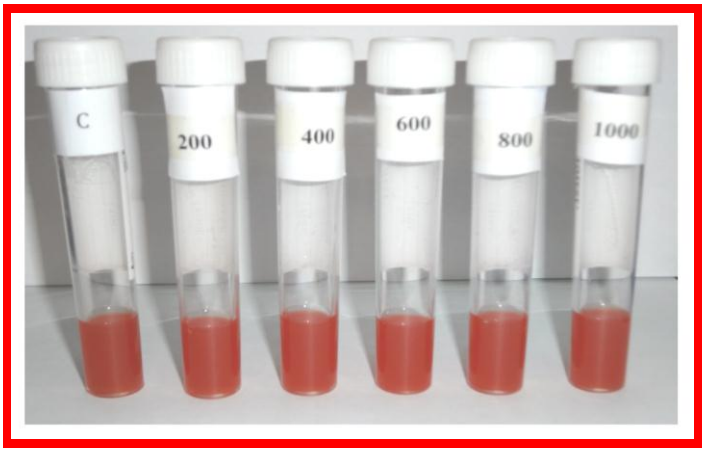


شكل (5) : مرتسم تشخيص الكارنوسين بتقنية FTIR لمركب الكارنوسين القياسي

كشف تحديد السمية للكارنوسينات الكحولية والمائية على محلول دم الإنسان

أشارت النتائج المبينة في الشكلين (6 ، 7) إلى إختبار فحص الُسمية للكارنوسينات الكحولية والمائية للسمك الخشني ومركب الكارنوسين القياسي بالمقارنة مع العينة الضابطة ، وبعد الملاحظة البصرية لم يظهر أي تحلل لكريات الدم كما لم تظهر أي ترسبات أو عكارة في المحلول الملحي بتراكيز (200، 400، 600، 800، 1000) جزء بالمليون خلال فترات التحضين بدرجة حرارة 37 °م لفترات (10، 30، 60) دقيقة، فضلاً عن عدم حدوث تغيرات في شكل الدم ومظهره، يُستدل من ذلك على أن الكارنوسينات المستخلصة ليس لها تأثير على تحلل وترسيب كريات الدم، ويؤيد ذلك ما توصل اليه Regazzoni.*et.al.* (2016) من خلال إستعمال الكارنوسين بجرعة 2 غرام يوميا لمدة 12 أسبوع لأشخاص لديهم زيادة في الوزن لغرض خفضها ومتابعة مساره من خلال الفحوصات البايولوجية للعمليات الأيضية، وهي بذلك تعد آمنة للاستعمالات البشرية كمكملات غذائية وفي صناعة الأدوية ومستحضرات التجميل.

شكل (6): الكشـف عن سميــة كارنوسينات سمك الخشني لـدم الانسان (A) الكحولي ، (B) المائي



شكل (7): الكشـف عن سُميــة مركـب الكارنوسيـن القياسـي لـدم الانسان

المصـــادر

الحاجي، ضحى داود سلمان .(2006).إستخلاص الكارنوسين من صدر الدجاج وتحضيره مختبريا ودراسة بعض خصائصه الوظيفية. أطروحة دكتوراه، كلية الزراعة، جامعة بغداد.

Antoine, F.R.; Wei, C.I.; Littell, R.C. and Marshall, M.R. (1999). HPLC method for analysis of free amino acids in fish using o-phthaldialdehyde precolumnderivatization. J. Agric. Food Chem, 47 (12): 5100-5107.

Aristoy, M.C. and Toldra, F. (2004). Histidine dipeptides HPLC-based test for the detection of mammalian origin proteins in feeds for ruminants. Meat Sci., 67: 211–217.

Auh, J.H.; Namgung, N.; Shin, K.S.; Park, S.W. and Paik I.K. (2010). Effects of supplementary blood meal on the content of carnosine and..anserine..in..broiler..meat. J..Poult..Sci, .47:302–309.

Aydogan, S. (2012). The importance of carnosine to erythrocyte rheology. Series on Biomechanics, l (27): 93-99.

Boldyrev, A.; Aldini, G. and Derave, W. (2013). Paphysiology and pathophysiology of carnosine. Physiol. Rev., 93: 1803–1845.

Boldyrev , A.; Bulygina,E.; Leinso, T.; Petrushanko, I.; Tsubone, S. and Abe H.(2004). Protection of neuronal
cells against reactive oxygen species by carnosine and related compounds, Comp Biochemphysiol Biochem.Mol.Biol, 137 (1): 8-81.

Branham, M.L.; Singh, P.; Bisetty, K.; Sabela, M. and Govender, T. (2011). Preparation, spectrochemical, and computational analysis of L-carnosine. (2-[(3-aminopropanoyl) amino] -3- (1H-imidazol-5yl) propanoic acid) and its ruthenium (II) coordination complexes in aqueous solution. Molecules, 16 (12) 10269-10291.

Jones, G.; Smith, M. and Harris, R. (2011). Imidazole dipeptide content of dietary sources commonly consumed within the British diet. Proceeding of the Nutrition Society, 70: 363.

Khosravi, M.; Rahimi, R. and Safavib, E. (2014). Synthesis of L-carnosine and its applications in biomedical fields. In: The 18th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry, Multidisciplinary Digital Publishing Institute.

Kishi, H.; Kubomura, D. and Sugiura, T. (2013). Verification of anti-fatigue effect of anserine by angle fatigue indicator based on median frequency changes of electromyograms. Functional Foods in Health and Disease, 3(10) 389-399.

Maikhunthod, B.M. and Intarapichet, K. (2005). Heat and ultrafiltration extraction of broiler meat carnosine and its antioxidant activity. Meat Science, 71(2): 364-374.

Manhiani, P.S. (2011). Carnosine content and antioxidant activity from poultry co-products, protein meal and stressed poultry tissues All Dissertations, 681 PP.

Manhiani, P.S.; Northcutt, J.K.; Han, I.; Bridges, W.C. and Dawson, P.L. (2013). Antioxidant activity of carnosine extracted from various poultry tissues. Poult. Sci., 92 (2): 444-453.

Nair, M.G.; Putnam,A.R.; Mishar, S.K.; Muks, M.H.; Taf, W.H.; Kesller, J.E. and Lynm, D.G. (1989). Faerifungin: A new broad spectrum antibiotic from *Streptomyces griseus* var. *Autotrophicus*. Journal of Natural Products, 52(4): 797 - 809.

Regazzoni, L. D.; Courten, B.; Garzon, D.; Altomare, A.; Marinello C.; Jakubova, M.; Vallova, S.; Krumpolec,
P.; Carini, M.; Ukropec, J.; Ukropcova, B. and Aldini, G. (2016). A carnosine intervention study in overweight human volunteers: bioavailability and reactive carbonyl species sequestering effect. Sci .Rep., Published online: 06.

Wu, H.C.; Shiau, C.Y., Chen, H.M. and Chiou, T.K. (2003). Antioxidant activities of carnosine, anserine, some free amino acids and their combination. J. Food and Drug Anal, 11(2): 148-153.

Extraction and identification of Carnosines from Alkhshni Fish *Liza abu* L. by using different techniques

Rawdha Mahmood Ali Aum-El-Bashar H. J. AL-Mossawi Lena Samer Mohammed

Food Science Dept. College of Agriculture-University of Basrah
Basrah-Iraq

Abstract

Carnosines were extracted from alkhshni fish *Liza abu* L. by using alcohol and water separation,Carnosines were identificated in several ways including spectroscopy identification using UV-visible and Fourier Transform infrared spectrophotometer technology and High Performance Liquid Chromatography (HPLC), spectral diagnostics using Ultraviolet-visible (UV) carnosines single peak showed at 215 nm wavelength and at diagnosis High Performance Liquid Chromatography (HPLC) retention time stood for standard carnosines 2.532 and author carnosines separated from 2.614 minutes alcoholic carnosines and 2.625 minutes aqueous carnosines, after undetecting the detection of toxicity assay of carnosines prepared on human blood serum and there have been no changes in its shape and appearance.

Keywords: Alkhshni fish, Carnosines, Ultrafiltration, HPLC, UV-visible, FTIR .Spectrometer.