دراسة التركيب الكيميائي لقشور بعض أنواع الروبيان واستخلاص وتشخيص الكاروتينويدات الفعالة حيوياً

هيفاء علي عواد **مازن جميل هندي**

جامعة كربلاء / كلية الزراعة **جامعة بغداد/ كلية الزراعة/قسم علوم الأغذية**

المستخلص

تمت دراسة التركيب الكيميائي لقشور الروبيان الرطبة والمجففة للأنواع *Penaeussemisulcat* و *Penaeus japonicas* و *Exopalamon styliferus* ، الذي تم شرائه من أسواق بغداد ، حيث بلغت نسب الرطوبة والرماد والدهن والبروتين (14.5 , 27 , 2.06 , 31%) للعينات المجففة وبلغت , 1 , 16 72 , 11% للعينات الرطبة على التوالي . استخدمت طرائق كيميائية مختلفة لأستخلاص الكاروتينويدات الخام من قشور الروبيان المجففة والرطبة . شملت الطريقة الأولى طريقة الأستخلاص الساخن بأستخدام مزيج المذيبات الآيثانول والبترواليوم أيثر (1 : 1 ح :ح) وبأستعمال جهاز السوكسليت في درجة حرارة 50مْ وشملت الطريقة الثانية والثالثة النقيع الحامضي والقاعدي لمدة 48 ساعةبأستخدام حامض الهايدروكلوريك (HCL1N) والقاعدة هيدروكسيد الصوديوم (1N) على التوالي . شملت الطريقة الرابعة الأستخلاص بزيت زهرة الشمس (1 : 1) . شملت طريقة الأستخلاص البارد بأستعمال ثلاث توليفات مختلفة من المذيبات العضوية تمثلت بالمعاملات T5 و T6 و T7 أذ تضمنت المعاملة T5 ألأستخلاص بواسطة الأيثانول 100% وتضمنت المعاملة T6 ألاستخلاص بمزيج المذيبات هكسان وأسيتون (1 :1 ،ح : ح) أما المعاملة T7 تضمنت أستخدام مزيج المذيبات الهكسان والأسيتون (2 : 1 ، ح : ح).

تم الحصول على أعلى حاصل للكاروتينويدات عليه باستخدام توليفة المذيبات العضوية المتكونة من هكسان وأسيتون 1:1 (حجم / حجم) إذ بلغت 0.08 ملغم/غم وبنسبة أستخلاص 80% للعينات المجففة . تم تنقية وتجزئة المستخلصات الكاروتينويدية بتقنية العمود السائل باستعمال عمود هلام السليكا (0.200 – 0.963) والمذيبات العضوية الهكسان والاسيتون وثنائي أثيل ايثر وشخصت مكونات المستخلص بتقنية كروموتوغرافي العمود عالي الأداء(HPLC) بوجود المركبات القياسية وظهرت المركبات الكيميائية الآتية:

B– carotene ، Astaxanthin ، Leutin ، Violastaxanthin وحامض السالسيلك بتركيز , 42.50 (46.75, 41.25 , 32.50 , 19.50) ملغم/ مل على التوالي . شخصت مكونات المستخلص بتقنية الأشعة تحت الحمراء (IR) وفي جهاز المطياف الضوئي نانوميتر بوجود المركبات القياسية للتأكد من نوعيتها .

Study of the chemical composition of some shrimp's shell and extraction , identification of bioactive carotenoids

H.A.Awad* **M.J.Hindi**

University of kerbala / College of Agriculture |*

University of Baghdad /College of Agriculture/ Dep. of Food Science

Abstract

This investigation was carried out to evaluate the activity of Carotenoids extracted from shrimp shell related to *Penaussemisculcats*, *Penausjaponicas* and *Exopalamon styliferus* that obtained from retail out in Baghdad – Iraq. The chemical composition of shrimp shell was 14.5 , 27 , 2.06 and 31% for moisture , ash , fat and protein respectively for dried sample , while the alternative values for wet samples were 72 , 11, 1, 16% respectively.

Different methods were employed for Carotenoids extraction from dried shrimp shell that included hot extraction by Soxhelet with petroleum ether and ethanol (1:1) volume : volume at 50C°. The seconed method (T2) included extraction by acidic extraction with HCL (1N) ,alkaline extraction (T3) by NaOH (1N), Sunflower oil extraction (T4).Cold extraction with different organic solution by three mixtures combinations that included absolute ethanol 100% (T5) , Hexane : Acetone (1:1, V:V) (T6) and Hexane : Acetone (2: 1, V: V) (T7) . The treatment (6) of Hexane : Acetone (1:1, V:V) was adopted as highest carotenoids yield was obtained and valued 0.08 µg/g with 80% extraction rate as compared to the aforementioned methods.

The Carotenoides extract was fractionated on Silca gel liquid Column Chromatography (LPLC) with Hexane , Aceton and diethyl ether was used for elution . The fractions of crude extracts were then identified by High performance Liquid Chromatography (HPLC)and the chemical compounds were β- Carotene , astaxanthin , Leutin , Violastaxanthin and Salicylic acid was existed at rates of 46.75 , 41.25, 32.50 , 19.50 and 42.5 µg/ml respectively . The crude extraxct components were further identified by both IR and Spectroscopy and compared with standard compounds .

المقدمة

تعد مصادر المياه في العراق متنوعة منها مياه بحرية Marine water (الخليج العربي) ومصبية Estuary(مصب شط العرب) وعذبة Fresh water (نهري دجلة والفرات) ، كما تكثر فيه المسطحات المائية (الأهوار والبحيرات). تمتاز بيئة شط العرب بقلة الملوحة وأرتفاع درجة الحرارة نوعا ما صيفا وأعتدال البرودة شتاءاً مما جعلها منطقة يقل فيها التنوع الأحيائي Biodiversity وتزداد فيها أعداد أفراد كل نوع وهذه السمة من سمات بيئة المياه المويلحة (4) . أستخدم الروبيان كغذاء على نطاق واسع على اساس ملائمته أولا ولقيمته الغذائية العالية ثانيا ، كما يستفاد من هذا الحيوان في تنقية الماء من المخلفات وهو ضروري للتحكم في أزدهار الطحالب . واصبح من الحيوانات الشائعة عالميا في المجال البيئي وعلى صعيد

الأستزراع ومعظم هذه الأحياء المائية هي بحرية Marine ولكن العديد منها يعيش في المياه العذبة Fresh water أو المياه المويلحة Brackish أي مزرع من المياه المالحة البحرية والمياه العذبة (2) .

يعد تصنيع الروبيان من أهم الصناعات الغذائية في العالم وأن الفضلات الناتجة من تصنيع وأستهلاك الروبيان تؤدي الى مشاكل وتلوث بيئي إذ تمثل المخلفات الناتجة بعد التصنيع 60%، أما الجزء المأكول يمثل 40% فقط (5) ، وأن أستخدام هذه المخلفات وإعادة تصنيعها يمكن أن يحل عديد من المشكلات البيئية فضلاً عن سهولة الحصول عليها لرخص أثمانها والتي لم يتم استغلالها بالشكل الصحيح . تعد مخلفات الروبيان والأحياء المائية الأخرى وبعض أنواع الأسماك أحد أهم المصادر الطبيعية للكاروتينويدات الفعالة حيويا التي لها صفات مميزة كمضادات للأكسدة ومضادات للالتهابات وملائمتها للاستخدامات الدوائية والمدعمات الغذائية Food supplementary والأستعمالات الصيدلانية بدون حدوث أثار جانبية هذا دفع المختصين بعلوم كيمياء الأغذية لأيجاد أكفأ الطرائق لأستغلال تلك المخلفات واستخلاص المركبات الفعالة منها (16) .

إن المخلفات المتبقية بعد تصنيع الروبيان تحتوي على كميات مرتفعة من البروتين والأحماض الأمينية فضلا عن المركب معقد البروتين – الكاروتين الذي يحتوي على صبغة Astaxanthin والتي تكون أكثر أستقرارا وثباتا من الكاروتينات لوحدها (6) .

إن الكاروتينويدات تذوب في المذيبات العضوية والدهونو استخدمت عدة طرائق للأستخلاصهامثل الطرائق الأنزيمية والميكروبية وبأستخدام الزيوت النباتية فضلاً عن أستخدام الطرائق الكيميائية بوساطة المذيبات العضوية وقد أثبتت ملائمتها لأستخلاص الكاروتينويدات (7) وكان أعلى حاصل من الكاروتينويدات الذي حصل عليها 4.55 ملغم / غم من القشور الرطبة وباستخدام الأسيتون ، في حين ذكر(14) بأن مزيج الهكسان وكحول والأيزوبروبانول (50 : 50) أعطى أعلى حاصل إذ بلغ 43.91 ملغم/غم لنماذج القشور الرطبة مقارنة بالناتج المتحصل عليه من استعمال الأسيتون الذي بلغ 40.60 ملغم/ غم للقشور الرطبة وقد أعزى هذا الأختلاف الى تباين نوع الروبيان وأختلاف قطبية الأسيتون المستعمل بالأستخلاص . ذكر (13) أن أعلى حاصل من الكاروتينويدات تم الحصول عليه من قشور الروبيان نوع *Penaeus monodon* وبأستعمال الأسيتون مقارنة ببقية المذيبات تكون المذيبات القطبية بشكل عام جيدة للأستخلاص الصبغات التابعة لمجموعة Xanthophylls بينما لا يوصى با ستخدام المذيبات غير القطبية وذلك لوجود المركبات غير المحبة للماء Hydrophobic mass المحيطة بها بكميات محدودة (8) .يهدف البحث إيجاد أكفأ الطرائق الكيميائية لأستخلاص المركبات الفعالة المتمثلة بالكاروتينويدات من مخلفات قشور الروبيان التي تهمل كضائعات وأنتاج مركبات فعالة حيويا يمكن أستخدامها كمضافات طبيعية غذائية كونها ذات منشأ طبيعي حيواني ومأمونة الأستعمال بدلاً من المضافات الصناعية الكيميائية .

المواد وطرائق العمل

تم شراء الروبيان من الأسواق المحلية في مدينة بغداد، وتعود للأنواع *Penaeus semisulcats* و*japonicas Penaeus* و *Exopalamon styliferus* ويصطاد من البصرة ويسوق مجمداً إلى المحافظات الأخرى ، تم شراء الأنواع كبيرة الحجم ذات اللون الأحمر الزهري . نقل الروبيان مجمدا داخل صناديق بولي ستيارين الى المختبر لأجراء التحاليل المختبرية . أزيلت رؤوس الروبيان السوداء لعدم احتوائها على الصبغة الحمراء ثم فصلت القشرة الظهرية (الدرع) عن اللحم كما تم الاحتفاظ بالأرجل والأسواط لاحتوائهما على الصبغات .غسلت القشور جيداً تحت ماء الحنفيةلأزالة الأوساخ والشوائب والأتربة.جففت العينات تحت المروحة الهوائية مع التقليب المستمر حتىالجفاف لليوم التالي ، سحقت العينات الجافةبهاون خزفي مختبري ووضعت في أكياس بولي أثيلين وحفظت في الثلاجة بالتبريد في (4 مْ) لحين الاستعمال.

تهيئة عينات الروبيان للتحاليل المختبرية

أجريت عملية إزالة البروتينات Deproteinization طبقاً للطريقة المذكورة في (2011) بمعاملة مسحوق قشور الروبيان الجافة بمحلول هيدروكسيد الصوديوم(1N) وبواقع 1 : 20 (قشور روبيان : محلول هيدروكسيد الصوديوم ، وزن : حجم) . وأستغرقت عملية أستخلاص ساعتين في درجة حرارة الغرفة إذ ينفصل خلالها القشور المعاملة بالمحلول القاعدي الى طبقتين ، تؤخذ الطبقة العليا الحاوية على البروتين وجفف في درجة حرارة 90 مْ وقدرت نسبة البروتين بطريقة كيلدال ، وتم حساب نسبة البروتين في قشور الروبيان المجففة قبل وبعد أجراء المعاملة القلوية . قدرت نسبة البروتين المزال من القشور حسب المعادلة الأتية :

$$\text{إزالة البروتين \%} = \frac{\text{البروتن في الراشح}}{\text{مقدار البروتين في القشور المجففة}} \times 100$$

أستخلاص الكاروتينويداتCarotenoids Extraction

أجريت تجارب مبدئية لأختيار أفضل طريقة لأستخلاص الكاروتينويدات من قشور الروبيان وتضمنت أستعمال مذيبات عضوية ومحاليل حامضية وقاعدية وزيت زهرة الشمس . تم أختيار المعاملة التي تضمنت أستعمال الأسيتون : الهكسان (1 : 1 ، ح : ح) إذ أعطت أعلى حاصل .

أتبعت الطريقة المعتمدة من (16) للحصول على المستخلص الخام، إذ اخذ 20 غم من القشور وخلطت جيدا" بخلاط كهربائي للتجانس واضيف اليها تدريجيا 200 مل من مزيج المذيبات (هكسان : أسيتون) بنسبة 1:1(ح : ح) في قدح زجاجي حجم 250 مل ومزجت بالمازج المغناطيسي Magnetic Stirrer لمدة 4 ساعة مع مراعاة تغطية فوهة القدح الزجاجي لتقليل تبخر المذيبات . وكررت عملية الاستخلاص هذه ثلاث مرات إلى أن تصبح القشور عديمة اللون وفي كل مرة ينقل الراشح المتحصل عليه من الأستخلاص إلى قمع فصل زجاجي حجم 250 مل لأجراء التنقية الأولية من الشوائب ، بعد ذلك أجري الطرد المركزي في3000

دورة/ دقيقة ولمدة خمس دقائق للتنقيةوالحصول على مستخلص الذي تم تركيزه لاحقا بالمبخر الدوار في درجة حرارة 45 مْ وللتخلص من المذيب(10) ،ثم حسبت كمية المادة المستخلصة بفرق الوزن قبل التجفيف وبعده .

تجزئة المستخلص الخام بطريقة كروموتوغرافي السائل منخفض الضغط

بهدف التعرف وتشخيص مكونات المستخلص أولا ، تمت تجزئته باستعمال كروموتوغرافي العمود السائل Liquid Column Chromatography (18) ، إذ تمت تهيئة عمود التجزئة بطول 10 سم وقطر 1سم وفي أسفل العمود وضعت كمية قليلة من الصوف الزجاجي في العمودلتوخي الدقة في عملية التجزئة وملء العمود لاحقا بهلام السليكا نوع مسحوق(0.063 – 0.200 mm) ، كانت سرعة الجريان 0.5 مل / 1 دقيقة في درجة حرارة الغرفة 25 مْ ، مررت ثلاثة مذيبات مختلفة القطبية وشملت الهكسان ، ثنائي أثيل أيثر والأسيتون على التوالي. أجريت عملية التجزئة للمستخلص بإضافة1مل من المستخلص المذكور أعلاه إلى العمود وتم تمرير أولا 30مل من مذيب الهكسان لتهيئة الهلام لعملية الفصل واستردت الأجزاء المفصولة في قناني حجميه زجاجية (Vial) حجم 2مل رقمت من (1 – 100) ، أستردت الوجبة الأولى من عملية التجزئة وجمعت خلالها 16 قنينة حجميه من رقم 1 – 16وكلها كانت محاليل شفافة من دون لون ثم تم تمرير30 مل من مذيب ثنائي أثيل أيثر بالمرحلة الثانية وتم خلالها استرداد الصبغات في قناني من رقم 17– 32 إذ بدأت في هذه المرحلة تظهر صبغات مختلفة الألوان تراوحت بين الأصفر الباهت والأصفر الغامق وفي المرحلة الأخيرة من التجزئة تم تمرير30 – 40 مل من مذيب الأسيتون في العمود وتم فيها أسترداد الصبغات في القناني من رقم33 – 100 . كان مجموع الأجزاء المفصولة 100جزء ،وتم تمرير العينة القياسية من الأستازانثين في الظروف نفسها وفي قياسات العمود الأول نفسها لغرض التطابق من وجود الصبغة في مستخلص الكاروتينويدات الخام Crude Extraction، وتم أسترداد وجمع 100جزء أيضا . رقمت القناني الحجمية لكلا الأنموذجين المذكورين آنفاً من 1 – 100 جزء وجهزت لأجراء مسح الامتصاص الضوئي لها كخطوة أولى للتأكد من وجود صبغة الأستازانثين في المستخلص الخام Crude extracted .

تشخيص الصبغات التأكيدي بجهاز المطياف الضوئي

أجري مسح الأمتصاص الضوئي في جهاز المطياف الضوئي نوع UV – 1650 PC للأجزاء المفصولة على عمود هلام السليكا المذكور أنفاً (12). إذ تم أخذ 1مل من كل جزء وأكمل الحجم الى 5مل بالأيثانول ثم وضع في خلية جهاز المطياف الضوئي وتم قياس الأمتصاص الضوئي على طول موجي 200 – 800 نانوميتر . وأجريت جميع العمليات في أدنى مستوى من الإضاءة للحد من تأثير الضوء على الصبغات .

دونت قيم الأمتصاص الضوئي للعينات كافة ثم تم عمل مخطط للعلاقة مابين رقم العينة وقيمة الأمتصاص الضوئي لكل عينة وذلك لتحديد موقع العينة المطلوبة لصبغة الأستازانثين التي أمتصت على الطول الموجي بين 470 – 474 نانوميتر، تم الفحص في مختبرات وزارة العلوم والتكنولوجيا / قسم كيمياء/ العدد الطبية ، تم تمرير العينة القياسية لصبغة الآستازانثين في الظروف نفسها لعينة الأنموذج المدروس ولكن بعمود آخر وبالقياسات نفسها للعمود السابق . بعد تسجيل كافة القراءات التي تم الحصول عليها من العينتين تم تحديد زمن

الاحتجاز عن طريق رسم مخطط بطريقة Low Pressure Liquid Chromatography (LPLC) لتحديد موقع ظهور عينة الأنموذج مع العينة القياسية .

يمكن تحديد المقدار الكمي الصبغات المستخلصة على وفق (4) وحسب المعادلة الأتية :-

$$\text{Ast } (\mu g/g)=\frac{A \times D \times 10^{6}}{100 \times G \times d \times E^{18}}$$

حيث أن:

Ast = مقدار صبغة الأستازانثين في القشور

10^6= عدد مرات التخفيف

G = وزن النموذج

d= قطر خلية التحليل (1 سم)

E= تركيز عامل ثابت مقداره 2100

D =المستخلص في الهكسان حجم

تشخيص مكونات المستخلص بتقنية العمود السائل عالي الأداء HPLC

شخصت مكونات المستخلص الخام لقشور الروبيان بتقنية HPLCالموجود في وزارة العلوم والتكنولوجيا/ قسم الكيمياء وتم الفصل على وفق الطريقة المذكورة من قبل (9) . كان نوع العمود (2.0 x 50 ملم) و حجم الجزيئات 3µ و الشركة المجهزة Zobax clipse XDB C-18 شمل الطور المتحرك استعمال تراكيز متدرجة من حامض الخليك 0.1% و ميثانول بتراكيز تراوحت بين0- 100% مبرمج لمدة 8 دقائق ونظم كاشف الأشعة فوق البنفسجية على 370 نانوميتر . وكانت سرعة الجريان 1.4مل / دقيقة وفي درجة حرارة الغرفة وحجم العينة المحقون 20 مايكروليتر وحسبت تراكيز المركبات المفصولة طبقا للمعادلة الآتية (9) .

$$\text{Concentration of sample } {}^{ug}/_{\text{ml}} = \frac{\text{Area of sample}}{Areaofstandard} \text{ X conc. of standard X dilution factor}$$

تشخيص مكونات المستخلص بتقنية أطياف الأشعة تحت الحمراء Infra Red Spectroscopy (IR)

أجري الفحص في وزارة العلوم والتكنولوجيا/شعبة العدد الطبية والصيدلانية/بغداد. جهز المستخلص ووضع على شرائح KBr في جهازIR وتم قياس الامتصاص الضوئي التي تراوحت بين 400 – 4000 سم-1 وشخصت المركبات تبعا للقمم المستحصلة باعتماد دليل الجهاز .

النتائج و المناقشة

دراسة التركيب الكيميائي لقشور الروبيان Chemical composition of Shrimp shell

يبين جدول (1) التركيب الكيميائي لقشور الروبيان الخام الرطبة وبعد التجفيف لكل من الرطوبة والرماد والدهن والبروتين، إذ بلغت 72 ،11، 1، 16% على التوالي للعينات الخام (الرطبة) وبلغت 14.5، 27، 2.06، 31% على التوالي للعينات المجففة وجاءت هذه النتائج مقاربة مع ما وجده (16) عند دراستهم الروبيان *Arteteus alcocki* وكانت المكونات للعينات الجافة كالآتي ، الرطوبة 14.57%، الرماد 29.40% ، الدهن 2.06% والبروتين 29.71% وللعينات الرطبة 70.74% ،10.36% ،1.03% ، 5.40% على التوالي.

جدول (1) التركيب الكيميائي لقشور الروبيان الرطبة والجافة

المكونات %	قشور الروبيان	
	الجافة	الرطبة
الرطوبة	14.5	72
رماد	27	11
دهون	2.06	1
بروتين (Nx6.25)	31	16

*النتائج معدل لثلاثة مكررات

إزالة البروتينات من قشور الروبيان المجففة Deproteinization

يوضح جدول (2) نسب إزالة البروتينات من قشور الروبيان المجففة والرطبة باستعمال معاملة قاعدية (NaoH 1N)، إذ بلغت نسبة الإزالة للعينة الرطبة76.5% وللعينة الجافة 58.5%، وجاءت هذه النتائج مقاربة لما وجده (11) إذ أشارا إلى أن نسبة إزالة البروتينات من قشور الروبيان للنوع *Aristeus alcocki* بلغت 77.68% للعينة الرطبة و51.53% للعينة الجافة. أن عملية إزالة البروتينات من العينات سواء كانت جافة أو رطبة وبالنقيع القاعدي أو الطريقة الإنزيمية مهمة أذ أن عدم أجراءها يؤدي الى تقليل نسب استخلاص الصبغات إلى النصف وذلك بسبب أرتباط الصبغة بالبروتينات وأعاقة أستخلاصها (16) .

جدول (2) نسبة ازالة البروتينات لعينات قشور الروبيان الجافة و الرطبة

نسبة أزالة البروتينات لقشور الروبيان %	
مسحوق القشور الجافة	القشور الرطبة
53.5	76.5

أستخلاص الكاروتينويدات Carotenoids Extraction

يظهر جدول (3) نتائج أستخلاص الكاروتينويدات من قشور الروبيان الجافة والرطبة (الخام) بواسطة مذيبات عضوية مختلفة ومعاملات حامضية وقاعدية وزيت زهرة الشمس . إذ حصل على أعلى نسبة

أستخلاص من العينات الجافة مقارنة مع العينات الرطبة (الخام) وبمدى يتراوح بين 16 – 82% للعينات الجافة وبمقدار يتراوح بين 15 – 71% للعينات الرطبة أو الخام . يبدو أن تجفيف العينات وإزالة الرطوبة منها يسمح بحصول تلامس أفضل بين المكونات الخلوية لقشور الروبيان مع المذيبات الأمر الذي يسمح بحصول عملية أستخلاص أكفأ (10). تم الحصول على أعلى حاصل من مستخلص الكاروتينويدات الخام في المعاملة (T1) وبواقع 82% ولكن لم يتم أعتماد هذه الطريقة لطول مدة الأستخلاص وأحتمالية تغير الصفات الكيميائية للكاروتينويدات لأستخدام الحرارة فيها .

تم أختيار المعاملة T6 (هكسان : أسيتون ، 1:1 ، ح:ح) بالطريقة الباردة بأستعمال توليفة من المذيبات القطبية وغير القطبية والتي شملت (الهكسان والأسيتون 1:1 ح : ح) بواقع 0.80 ملغم/غم وبنسبة أستخلاص 80% للعينات المجففة .

أن كمية الكاروتينويدات الخام المستحصلة تعتمد على نوع الروبيان والظروف البيئية التي يعيش بها فضلاً عن الأختلاف في طرق الأستخلاص وظروفها وقد أظهرت دراسة سابقة أن الهكسان والأسيتون يؤلفان أفضل توليفة للأستخلاص (3) . كما حصلت دراسة أخرى على أفضل حاصل من الكاروتينويدات من قشور الروبيان الجافة (*Aristeus alcocki*) بأستعمال الهكسان والأيزوبروبانول المشابه (1:1) حجم : حجم (16) .

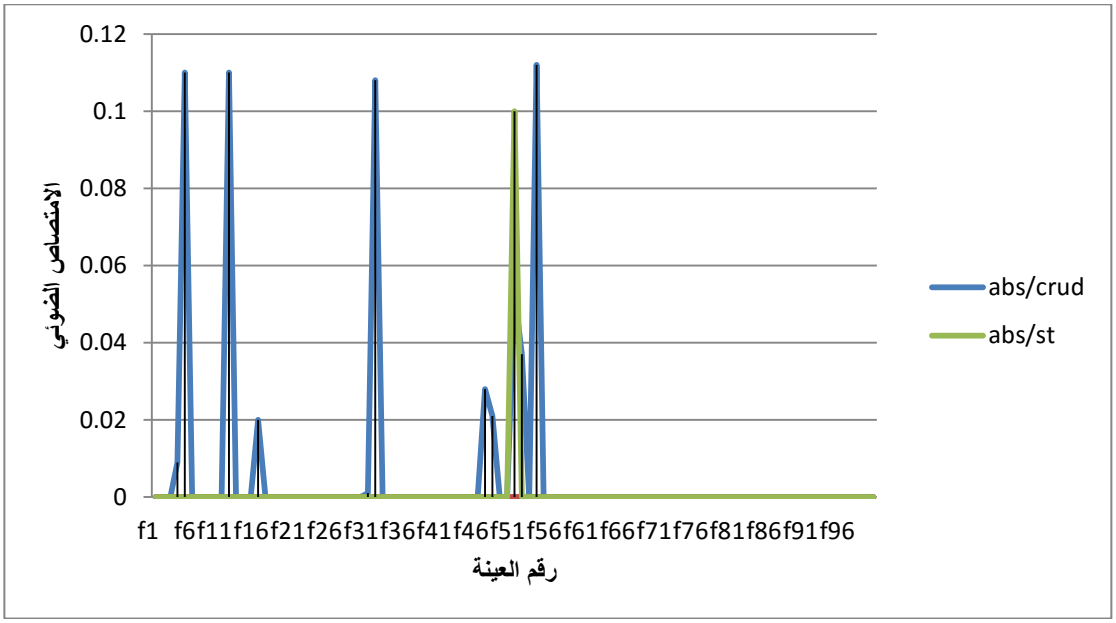
جدول (3) المذيبات المستعملة لأستخلاص الكاروتينويدات ونسب الحاصل (%)

رقم المعاملة		المذيبات المستخدمة	طريقة الاستخلاص	الحاصل من الصبغة		نسب الاستخلاص	
				عينة جافة ملغم / غم	عينة رطبة ملغم / غم	عينة جافة (%)	عينة رطبة (%)
T1		أيثانول وبترواليوم إيثر 1:1 ح:ح	أستخلاص ساخن وبجهاز السوكسليت	0.82	0.60	82	60
T2		حامض HCL (1N)	نقيع حامضي لمدة 48 ساعة	o.16	0.15	16	15
T3		قاعدة NaOH (1N)	نقيع لمدة 48 ساعة	0.42	0.23	42	23
T4		زيت زهرة الشمس 1:1 ح:و	نقيع لمدة 48 ساعة	0.45	0.34	45	34
T5	الاستخلاص البارد	الأيثانول 100%	أستخلاص بارد	0.55	0.42	55	42
T6		هكسان : أسيتون 1:1ح:ح	أستخلاص بارد	0.80	0.71	80	60
T7		هكسان: أسيتون 1:1 ح:ح	أستخلاص بارد	0.60	0.42	60	42

تشخيص مكونات المستخلص بجهاز الأمتصاص الضوئي

يظهر الشكل (1) منحنى الأمتصاص الضوئي للكاروتينويدات المفصولة من المستخلص الخام من قشور الروبيانبقياس الطول الموجي لأعظم أمتصاص للمركباتالمفصولة ، شمل القياس مدى من الطول الموجي تراوح

بين200 – 800 نانوميتر ثم أخذت القراءات التي تم الحصول عليها من الأمتصاص الضوئي على الطول الموجي 470 – 472 نانوميتر فقط ، والذي أعطى ست قمم مميزة كما ظهر في شكل 1وكانت القمة السادسة مقابلة للعينة القياسية من الأستازانثين إذ تطابق وقت الأحتجاز للعينة قيد الدراسة مع وقت الأحتجاز للعينة القياسية للمركب في المخطط مما يؤكد وجود المركب المطلوب في القنينة الحجمية رقم 51 , 52 بوقت أحتجاز 102 دقيقة . أما بقية القمم التي ظهرت فهي تعود لكاروتينويدات أخرى لم يتم التأكد منها .تعود معظم خواص الأمتصاص الضوئي للكاروتينويدات الى الأواصر المزدوجة المتبادلة في السلسلة المستمرة (Polyene) فضلا" عن تأثير بعض المجاميع الجانبية ويلاحظ أن هذه المركبات تعطي في أغلب الحالات ثلاث قمم للأمتصاص الضوئي (19). وذكر أن تغير مذيب القياس قد يؤثر قليلا" في قيم الأمتصاص الضوئي وأن بعض المذيبات تسبب زيادة الطول الموجي لأعظم أمتصاص بينما تسبب مذيبات أخرى في خفض رقم الطول الموجي (10) .

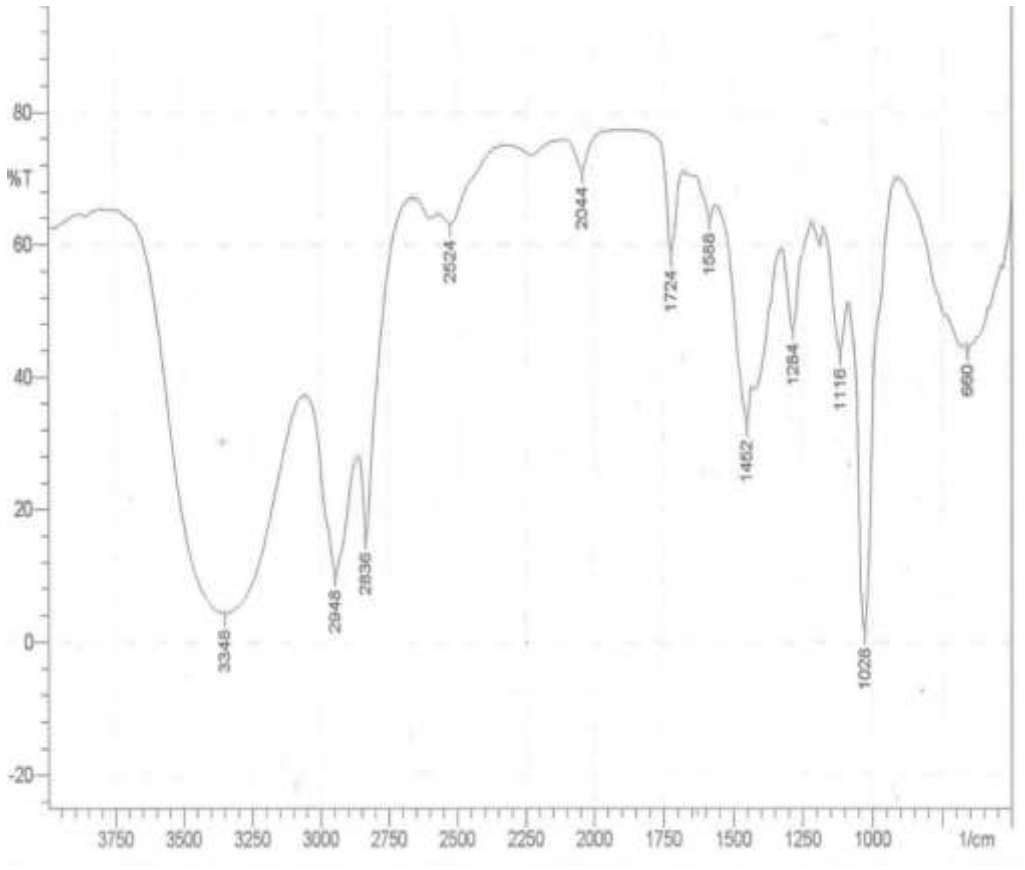


شكل (1) منحنى الأمتصاص الضوئي لعينة مستخلص الكاروتتينويدات الخام ولعينة الكاروتينويدات القياسية بطريقة LPLC

التحليل الطيفي بالاشعة تحت الحمراء (IR)

اظهر المخطط الطيفي لجهاز **IR** في(شكل.2) لمستخلص قشور الروبيان الخام والمفصول بطريقة العمود السائل المناطق المميزة للمجاميع الفعالة العائدة لهذا المستخلص ، ظهور حزمة امتصاص عند تردد 3400 ما بين (3250 – 3500) سم$^{-1}$ ، تعزى للاصرة (O – H) الموجودة في مركب الأستازانثين قيد الدراسة وموقعها يشير الى أنها تعود لأحماض دهنية إذ تتصف الأحماض الدهنية أن حزمة الهيدروكسيل (OH) لها تظهر في تلك المنطقة على شكل قمة عريضة بسبب التأصر الهيدروجيني البيني في الأحماض الدهنية، وغالبا ماتتداخل هذه الحزمة مع حزمة C–H الأليفاتية ، كما أن ظهور حزمة امتصاص عند التردد الامتطاطي (1588) سم$^{-1}$ تعود الى الاصرة المقترنة (C=C–C=C) والتي تكون على طول هيكل جزيئات الكاروتينويدات

، لهذا يظهر امتصاصها في المنطقة الواطئة وليس كما هو معتاد عند التردد (1600) $^{-1}$ سم .وظهور حزمة امتصاص اخرى عند التردد (1727) سم $^{-1}$ تعود الى مجموعة (C=O) الكاربونيل يؤكد وجود الأحماض الدهنية الموجودة في المركب قيد الدراسة وهي حزمة امتصاص مميزة للكيتونات . وهناك حزم امتصاص اخرى عند التردد (2948 – 2836) سم $^{-1}$ تعود الى الاصرة (C – H) الاليفائية في هذه المنطقة . وقد شخصت الحزم الناتجة أشارة الى القيم الخاصة بالمركبات التي ظهرت (1) .



شكل(2) المخطط الطيفي لجهاز IR لمستخلص الكاروتينويدات الخام من قشور الروبيان بوساطة (الهكسان والأسيتون **1:1**)

كروموتوغرافي السائل عالي الأداء HPLC

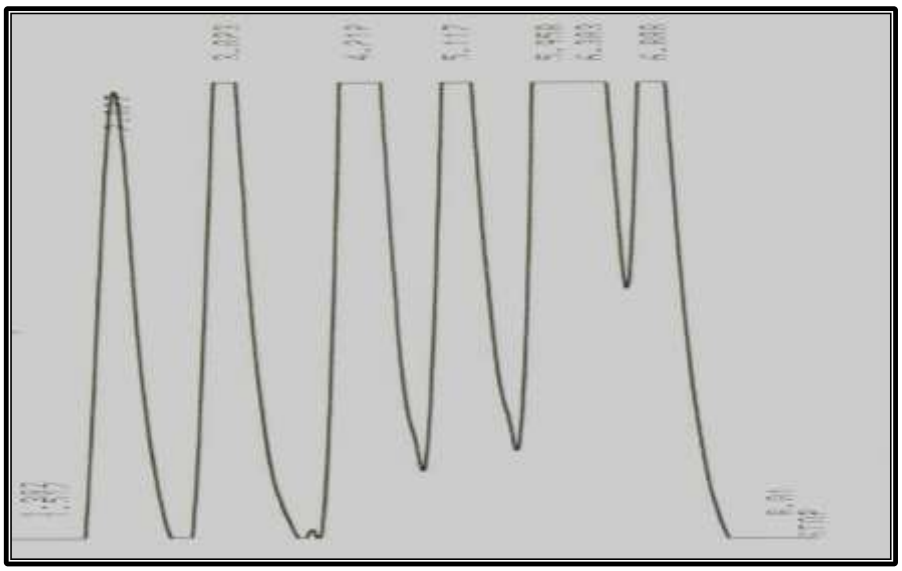
يظهر جدول (4) والشكل (3) نتائج تحليل العمود السائل عالي الأداء لمستخلص الكاروتينويدات من قشور الروبيان بالمذيبات (هكسان : اسيتون)1 : 1، إذ لوحظ ظهور خمسة مركبات مميزة في المستخلص وبلغت قيم وقتالاحتجاز 2.03 و 2.90 و4.18 و 5.09 و5.9 دقيقة .

تعود للمركبات Acetylsalioylic acid carotene, astaxanthin,violaxanthin , leutein – βعلى التوالي . يظهر الشكل (3) تطابق القمم العائدة لهذه المركبات مع القمم للعينات القياسية للمركبات الخمسة في الشكل 4. يظهر جدول (4) أيضا تراكيز المركبات المذكورة آنفاً التي تم تشخيصها وان صبغة الأستازانثين و بيتا كاروتين وحامض السالساليك سجلا قيما عالية مقارنة ببقية المركبات اذ بلغت46.75 و

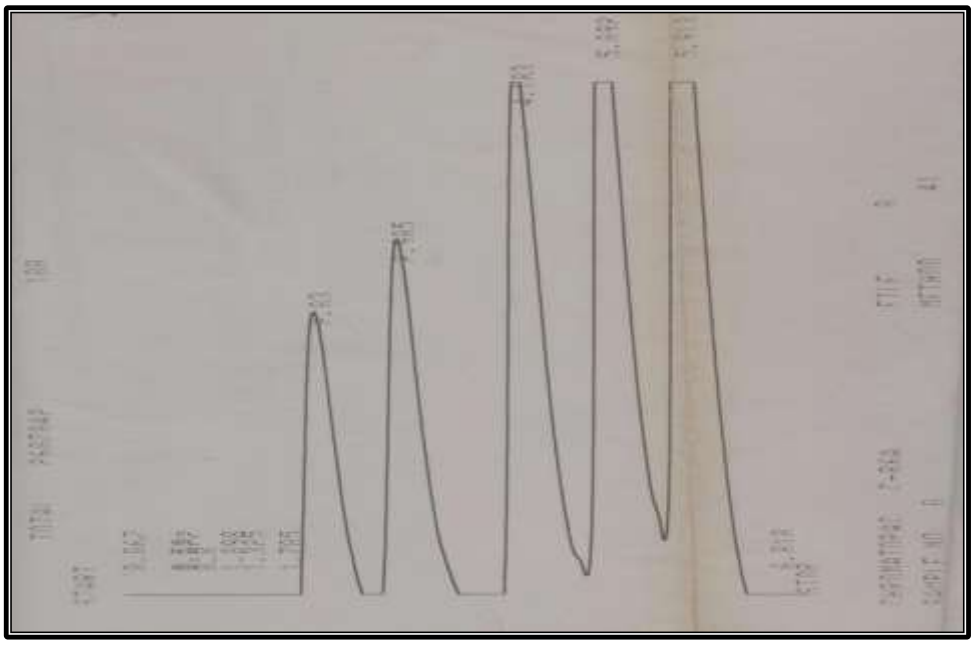
41.25 و 42.50 ملغم / مل في المستخلص على التوالي . واعطت صبغة violaxanthin قيمة بلغت 19.50 ملغم / مل . واظهرت صبغة اللوتين قيمة مقدارها 32.50 ملغم / مل . وتشير النتائج الى ان حامض الساساليك والذي شخص بتركيز 42.50 ملغم / مل يستخدم في صناعة الأدوية كدواء لعلاج صداع الرأس ومسكن للألم ومضاد للألتهابات ويدخل في صناعة الأسبرين والباراسيتول ، وجاءت هذه النتائج متفقة مع ما وجده (17) وأشار (15) الى ان الاستازانثين هي من المركبات السائدة في الكاروبتنويدات المستخلصة من قشور الروبيان والاحياء المائية .وهذا ما اكده أيضا (14) بان الاستازانثين يشكل الكاروبتنويدات الرئيسة في الروبيان نوع *Solonoceraindica*, *Aristeusalcocki* . تظهر نتائج هذه الدراسة أن قشور الروبيان تحتوي على مستويات عالية من صبغة الأستازانثين وقد يكون مصدرا جيدا للمستخلصات الحيوانية للصبغات الطبيعية .يلاحظ من الجدول أن تركيز صبغة البيتاكاروتين عالية نسبيا مقارنة بالصبغات الأخرى وهذا ما أشير له في عدد من الدراسات التي تعزو ذلك الى طبيعة هذه المركبات إذ أن المسافة التي يقطعها المركب أثنا الفصل تعتمد على الألفة والأدمصاص المييزة له فالبيتاكاروتين هو اقل الفة أدمصاص مقارنة مع الزانثوفيلات وبذلك يقطع مسافة أطول من الزانثوفيلات التي تدمص بقوة أعلى بسبب المجاميع الفعالة الموجودة في تركيبها فضلاً عن الى قابلية هذه المركبات على الذوبان في الطور المتحرك (7).

جدول (4) وقت الاحتجازوالمساحة والتركيز للمركبات المفصولة بتقنية HPLC

ت	المركب	وقت الأحتجاز	Area M voH	التركيز 25mg\ml
1	Acetyl Salioylicacid	2.03	166937	42.50
2	Astaxanthin	2.90	222926	41.25
3	β–carotene	4.18	282410	46.75
4	Leutein	5.09	307453	32.50
5	Violaxanthin	5.9	362484	19.50



شكل(3) منحنى التحليل الطيفي لمستخلص الكاروتينويدات الخام بجهاز HPLC



شكل (4)منحنى التحليل الطيفي للعينات القياسية بجهاز HPLC

المصادر

1- حمدي ، سهيلة طالب . (1988). التحليل الطيفي للمركبات العضوية ، كتاي مترجم الى العربية ، جامعة البصرة دار الكتب، ص 451.

2- العبيدي ، تغريد صادق محسن . (2005). دراسة بعض الجوانب الحياتية لروبيان الممالح وأستخدامه لتغذية يرقات أسماك الكارب العادي *Cyprinus carpio* والكارب العشبي *Ctenopharyngodon idella* . أطروحة دكتوراة/ جامعة بغداد/ كلية الزراعة/قسم الثروة الحيوانية.

3- A.O.A.C. (1984). Official Methods of analysis Association of official Analytical chemists , Washington, DC, pp 1018.

4- Barnes , R.S.K. (1974). Estuaries biology. Edward Arnold, London pp.76

5- Barratt, A. and Montano, R. (1986) shrimp heads – anew source of protein INFOFISH markg. Dig. 4 (86). 21.

6- Capelli, B. and Gerald R. (2013). Natural Astaxanthin " King of the carotenoids " Third edition.

7- Davies, B. H. (1976). Carotenoids, ch. 19. In "chemistry and Biochemistry of plant pigments" T. W. Goodwin, ed. Vol. 2. Academic press, London. P 38 – 165.

8- Delgado, v.; Jimenez, A. and Peredes , L. (2000). Natural pigments : carotenoids, anthocyanins and betalains : characteristics biosynthesis. Preparation and stability. CRC, crit. Rev. food. Sci. nutr. , 40 : 173 – 289.

9- Halvorsen,B.; Holte, K. ; Myhrstad, M. ; Barikmo, L.; Hvattum, E., and Fagertun, R. (2002). Systematic screeing of total antioxidant in dietary plant J. Nutrition, 132, 461-471.

10- Harborne , J.B. (1973). Phytochemical methods. Champman and hall, London, NewYork.

11- Holando , H. and Netto, F. (2006). Recovery of components from shrimp (Xiphopenaeus K. oyeri) processing waste by enzymatic hydrolysis. J. Food Sci. 7 (5) , 298 – 303.

12- Kelley, C. and Harmon , A. (1972). Method of determining carotenoid several shrimp products .fish. bull. 70, 11 – 17.

13- Paul. V. ; Vimala. S. (2000) . Utilization of crustacean fishery waste as a source of carotenoids. J. Exp- Zool. Ind. 12 (2) 377 – 380.

14- Sachindra, N. M; Bhaskar, N. and Mahendrakar, N. S. (2005). Carotenoids in different body components of Indian shrimps. J. sci. Food Agric., 2005 , 85 , 167 – 172.

15- Sachindra, N. M .; Bhaskar, N. and Mahendrakar, N. S.(2006). Recovery of Carotenoids shrimpwaste in organic solvents. Waste manage, 26 , 1092 – 1098

16- Sindhu , S. and Sherief ,P.M. (2011). Extraction , Characterization, Antioxidant and Anti-Inflammatory properties of Carotenoids from the Shell Waste of Arabian Red Shrimp Aristeus alcocki .The open Conference proceedings journal, 2, 95-103.

17- Shahidi, F. ; Synowiecki, N. M. (1992). In seafood science and Technology, Bligh E. G, Ed, fishing news books, PP301 – 304.

18- Taungbod hitham, A. ; Kajadphai ,G. P. ; Jones, M. ; Wahlquist, L. and David, R. B.(1997) . Evaluation of extraction method for the analysis of carotenoids in fruits and vegetables food chemistry. Vol. 63. no. 4, pp 557 – 584.

19- Williams , D.H. and Fleming , E.(1973). Spectroscopic methods inorganic chemistry. 2nd ed . Mcgraw/ Hill (UK).