مجلـة الكوفـة للعلـوم الزراعيــة 9 (4) : 242 – 261 2017

دراسة الفعالية المضادة للأكسدة لصبغة الاستازانثين المستخلصة من قشور الروبيان

* زينة طارق نعمة الكنعان روضة محمود علي العلي
منير عبود جاسم الطائي
قسم علوم الأغذية– كلية الزراعة – جامعة البصرة – جمهورية العراق

المستخلص

استخلصت صبغة الاستازانثين من قشور الروبيان بمذيب الاسيتون 90% واعطت محتوى للصبغة مقداره 79.61 مايكروغم/غم. تميزت الاستازانثين بفعالية مضادة للأكسدة مقدارها 98.7% مقارنة بفعالية الاستازانثين القياسية وBHT والتوكوفيرول البالغة 96.5% عند التركيز 20 ملغم/مل. وقوة اختزالية عالية بلغت 275% وهي جاءت مقاربة لحامض الاسكوربيك 278% بينما اعطى كل من BHT و α–tocopherol وحامض الستريك قوة اختزالية اقل من الصبغة المستخلصة وهي 200 و 190 و 225% على التوالي. اعطت الصبغة قابلية على ربط ايون الحديدوز عند اعلى تركيز في الدراسة والبالغة 89% وهي اعلى مما اعطته BHT و α–tocopherol بلغت 44.6 و 45.1% على التوالي بينما تفوق كل من EDTA وحامض الاسكوربيك وحامض الستريكعليها في قابلية ربط ايون الحديدوز 97.7 و 96.9 و 94% على التوالي. بلغت قابلية الصبغة على اقتناص جذر الهيدروكسيل 84.79% وهي جاءت مقاربة الى حامض الاسكوربيك وحامض الستريك 85.45 و87.39% على التوالي بينما كانت قابليتها على الاقتناص عالية مقارنة مع BHT و tocopherol–α البالغة 57.45 و 58.13% على التوالي. أظهرت الصبغة قابلية اقتناص لبيروكسيد الهيدروجين واضحة بدءاً من التركيز 12–20 ملغم/مل وهي 83.03 – 89.67% ، تفوقت على كل من BHT و α–tocopherol وحامض الاسكوربيك عند اعلى تركيز 74.05 و 86.41 و 86.92% على التوالي بينما كانت اقل من قابلية حامض الستريك لاقتناص جذر بيروكسيد الهيدروجين البالغة 92.29%. تفوقت الاستازانثين في قابليتها على اقتناص جذر الاوكسجين النشط عن عينات المقارنة للـ BHT و α–tocopherol وحامض الاسكوربيك والبالغة 87 و 71 و 85% على التوالي بينما كانت اقل بفارق بسيط عن حامض الستريك الذي بلغ 88% .

الكلمات الدالة: مضادات الاكسدة، الاستازانثين، مخلفات الروبيان، الاختزالية.

---

* جزء من رسالة الماجستير للباحث الأول

مــقدمة

الكاروتينويدات هي صبغات برتقالية – حمراء اللون لا يمكن تصنيعها في الجسم لذا يتم الحصول عليها عن طريق التغذية، قابلة للذوبان في الدهون والمذيبات العضوية، سهلة التعرض للأكسدة ويمكن تقسيمها على مجموعتين الاولى Xanthophylls التي تحتوي على الاوكسجين او مجموعة الهيدروكسيل (C, H, O) وهي مشتقات مؤكسدة وتضم مجموعة كبيرة منها lutein, zeaxanthin، اما المجموعة الثانية الكاروتينات (C , H) التي تكونهيدروكاربوناتنقية ولا تحتوي على الاوكسجين ومنها α-carotene و lycopene .[1, 17, 24]

هي تربينات رباعية تحتوي على سلسلة متعددة الكاربون (C40) الذي يعد العمود الفقري للجزيء ويوجد في نهايات السلسلة حلقات اروماتية قد يرتبط بها الاوكسجين الذي يحتوي على المجاميع الوظيفية الفعالة، هناك عوامل عديدة تؤثر على تكوين الايزوميرات للكاروتينويدات مثل الحرارة والضوء والاختلافات الهيكلية واخرى تؤثر على تكوين الايزوميرات في الاغذية وهي المعاملات التصنيعية المختلفة مثل التسخين والتجفيف وغيرها من المعاملات[6].

يسمى الاستازانثين (3,3́ -dihydroxy-β-β́-carotene-4,4́ -dione) الصيغة الجزيئية له هي $C_{40}H_{52}O_4$ وزنه الجزيئي 596,84 مول/غم يحتوي على مجموعة هيدروكسيلية ومجموعة كيتونية في المواقع 3,3 و 4,4 وهذا ما يعطيه ميزات فريدة مثل قدرته على تكوين مركبات استرية وقوة للفعالية المضادة للأكسدة وله قوة اختزالية عالية ويكون اكثر قطبية من الكاروتينويدات الاخرى [23]. ان الميزة الاساسية لمضاد الاكسدة هو قدرته العالية لاقتناص الجذور الحرة وانواع الاوكسجين المتواجدة في النظم البايولوجية التي تكون قادرة على اكسدة الاحماض النووية والبروتينات والدهون وانحلالها مما تسبب الامراض ومن انواع مضادات الاكسدة الكاروتينويدات، الاحماض الفينولية، البولي فينول والفلافونويدات ومركبات تقتنص الجذور الحرة مثل جذور البيروكسيدات و الهيدروبيروكسيدات وبالتالي تمنع آليات الاكسدة المسببة للتلف والامراض .[10]

1-مواد وطرائق العمل

جلبت قشور الروبيان من الاسواق المحلية في مدينة البصرة، فصلت القشور المتكونة من الرأس والقذيفة والذيل عن الأحشاء الداخلية للرأس، ثم نظفت وغسلت عدة مرات بماء الحنفية بعدها فرمت القشور في خلاط كهربائي للحصول على خليط متجانس. اما

المـواد الكيميائيـة المسـتعملة فـي الدراسـة فهـي من النوع التحليلي.

2- استخلاص الصبغة

اتبعــت طريقــة Sindhu واخــرون [27] فــي اســتخلاص صــبغة الاســتازانثين مــن القشــور الطازجــة بالمــذيب اســيتون 90% بخلــط قشــور الروبيــان مــع المــذيب بنســبة 10:1 (و/ح) علــى ثلاثــة مراحــل حتــى الــتخلص تمامــاً مــن الصــبغة فــي القشــور، تجمــع الرواشــح فــي كــل مــرة وتوضــع فــي قمــع فصــل وتمــزج مــع حجــم مســاوي مــن NaCl 1%، يضــاف فــي قمــع الفصــل 12.5 مــل مــن الايثــر البترولــي و 9.4 مــل مــن NaCl 0.73% تمــزج المكونــات جيــداً وتتــرك لتســتقر، تجمــع طبقــة الصــبغة وتركــز بجهاز المبخر الدوار حتى الجفــاف علــى 40°م بعــدها تــذوب الصــبغة بـــ 5 مــل مــن الهكســان ويقــاس الامتصاصــية لهــا علــى طــول مــوجي 470 نــانومتر لحســاب تركيــز الصبغة حسب المعادلة التالية:

الاستازانثين مايكروغم. غم$^{-1}$ = $\frac{A \times D \times 10^6}{100 \times G \times d \times E}$

اذ تمثل:

A: الامتصاصية

D: مل حجم الهكسان في المستخلص

E: الامتصاصية النوعية 2100

G: وزن العينة بالغرام

d: عرض الخلية الضوئية

تقــــدير الفعاليـــــة المضادة للأكسدة

اتبعــت طريقــة Huang واخــرون (15) وذلــك بأخــذ 1 مــل مــن المســتخلص و 4 مــل مــن 2.5% حـــامض اللينوليـــك المحضـــر فـــي 99.5% ايثــانول و8 مــل مــن 0.5l مــولاري مــن دارئ الفوســفات (رقــم هيــدروجيني 7) و 4 مــل مــاء مقطر.

حفظــت هــذه المكونــات فــي حاضــنة عنــد درجــة حــرارة 50ْم لليــوم التــالي، بعــدها اخــذ 0.1 مــن هــذا الخلــيط واضــيف لــه 9.7 مــل مــن 75% ايثـــــانول و 0.1 مـــــل مـــــن 30% (و/ح) ثايوســيانات الامونيــوم. وبعــد ثــلاث دقــائق اضــيف 0.1 مــل مــن 0.02 مــولاري كلوريــد الحديـــدوز المحضـــر فـــي 3.5% حـــامض الهيــدروكلوريك، ثــم يقــاس تطــور اللــون علــى طــول مــوجي 500 نــانومتر. أمــا العينــة الضــابطة (Control) فيســتعمل 1 مــل هكســان بــدلاً مــن المســتخلص مــع كــل الإضــافات المــذكورة وتحسب الفعاليــة المضــادة للأكســدة مــن المعادلــة التالية:

الفعالية المضادة للأكسدة % = 100-[100 × (A_o/A_1)]

أذ ان:

A_1= امتصاصية العينة

A_o= امتصاصية العينة الضابطة

قــدرت الفعاليــة المضــادة للأكســدة للصــبغة بعــد عمـــل تراكيـــز مختلفـــة مـــن الصـــبغة 2-20 ملغم/مل بالمقارنــة مــع BHT و tocopherol

–α والصبغة القياسية بعد مرور يوم واحد من الحضن.

2-تقدير القوة الاختزالية

اتبعت طريقة Zhang واخرون(32) في تقدير القوة الاختزالية بخلط 2.5 مل من مستخلص الصبغة بتراكيز 2-20 ملغم/مل مع 2.5 مل محلول دارئ الفوسفات 0.2 مولاري برقم هيدروجيني مقداره 6.6 و 2.5 مل من 1% سيانيد البوتاسيوم الحديديكي في انابيب اختبار. حضن الخليط عند 50°م لمدة 20 دقيقة بعدها اضيف 2.5 مل من 10% TCA (ثلاثي كلوريد حامض الخليك)، نبذت الانابيب مركزياً بسرعة 2000 دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق.

اخذت الطبقة العلوية واضيف لها 5 مل ماء مقطر و1ملمن كلوريد الحديديك 0.1% ثم قرأت الامتصاصية عند طول موجي مقداره 700 نانومتر، حضرت العينة الضابطة بأضافة جميع المواد السابقة عدا العينة وتم مقارنة الصبغة مع BHT، α–tocopherol ، حامض الاسكوربيك، حامض الستريك.

حسبت القوة الاختزالية من المعادلة التالية:

$$\text{القوة الاختزالية} = [\frac{\text{امتصاصية العينة}}{\text{امتصاصية العينة الضابطة}}] \times 100 \quad 100- \quad [-1$$

4-قابلية ربط ايون الحديدوز

قدرت قابلية ربط ايون الحديد حسب الطريقة التي ذكرها Gulcin واخرون [13] المتضمنة مزج 0.4 مل من الصبغة بتراكيز تراوحت 2-20 ملغم.مل$^{-1}$ مع 0.4 مل من 0.002 مولاري كلوريد الحديدوز و0.4 مل من 8-hydroxy quinine المحضر بتركيز 0.005 مولاري في ايثانول. حضنت العينات لمدة 10 دقائق بدرجة حرارة المختبر في مكان مظلم، بعدها قيست الامتصاصية عند طول موجي 562 نانومتر ثم حسبت قابلية ربط ايون الحديد من المعادلة التالية:

$$\text{قابلية ربط ايون الحديد\%} = [1- \frac{\text{امتصاصية العينة}}{\text{امتصاصية العينة الضابطة}}] \times 100$$

أما العينة الضابطة فقد اضيفت كل المكونات عدا العينة وتم مقارنة النتائج مع كل من BHT، α–tocopherol، EDTA، حامض الاسكوربيك، حامض الستريك.

5-اقتناص جذر الهيدروكسيل

اتبعت طريقة Girgih واخرون(9) في تقدير قابلية اقتناص جذر الهيروكسيل اذ اخذ 1 مل من phenathroline 1,10 بتركيز 0.003 مولاري المحضر في 0.1 مولاري محلول

دارئ فوسـفات الصـوديوم بـرقم الهيـدروجيني 7.4 مـع 1 مـل مـن 0.003 مـولاري كبريتـات الحديـدوز Fe^{+2} المحضـرة فـي المحلـول الـدارئ السـابق وحضـن الخلـيط علـى 37°م لمـدة 60 دقيقـة مـع التحريـك، ثـم اخـذت الامتصاصـية عنـد طـول مـوجي 536 نـانومتر. ثـم حسـبت النسـبة المئويـة لاقتنـاص جـذر الهيدروكسـيل مـن المعادلة التالية:

$$100 \times [(A_\circ - A_2)/ (A_\circ - A_1)] =$$ % اقتناص جذر الهيدروكسيل

أذ ان:

$A_\circ$: امتصاصـية العينـة الضـابطة وهـي كـل المـواد السـابقة بـدون اضـافة الصـبغة واسـتبدالها بـ 1 مل من بيروكسيد الهيدروجين.

A_1: الامتصاصـية بوجـود 1مـل مـن الصـبغة بتراكيز 2-20 ملغم/مل.

A_2: هـو عينـة البلانـك اضـافة 1 مـل مـاء مقطـر بدون اضافة بيروكسيد الهيدروجين.

تـم مقارنـة النتـائج مـع كـل مـن BHT، α–tocopherol، حـامض الاسـكوربيك، حامض الستريك.

6-اقتناص بيروكسيد الهيدروجين

تـم تقـدير قابليـة صـبغة الاسـتازانثين فـي اقتنـاص بيروكسـيد الهيـدروجين بموجـب الطريقـة التـي ذكرهـا Turkoglu واخـرون [29] اذ اخـذ 1 مـل مـن الصـبغة بتراكيـز 2-20 ملغـم . مـل$^{-1}$مـع 0.6 مـل مـن 0.002 مـولاري H_2O_2 المحضـر فـي دارىء الفوسـفات 0.1 مـولاري بـرقم هيـدروجيني 7.4، تركـت الانابيـب مـدة 10دقـائق بدرجـة حـرارة المختبـر، بعـدها قـرأت الامتصاصـية عنـد طـول مـوجي 230 نـانومتر وقـدرت قابليـة اقتنـاص بيروكسـيد الهيـدروجين حسب المعادلة التالية:

$$100 \times (A_\circ/ A_1) =$$ % قابلية اقتناص بيروكسيد الهيدروجين

أذ ان:

A1: امتصاصـية العينـة، $A_\circ$: امتصاصـية العينـة الضـابطة بإضـافة كـل المـواد عـدا الصبغة.

قورنـت قابليـة اقتنـاص بيروكسـيد الهيـدروجين مـع BHT، α–tocopherol، حـامض الاسكوربيك، حامض الستريك.

7-اقتناص الاوكسجين النشط

اتبعـت طريقـة Pownall واخـرون[21]فـي تقـدير قابليـة اقتنـاص الاوكسـجين النشـط O بأخـذ 1 مـل مـن تراكيـز مختلفـة مـن الصـبغة 2-20 ملغـم. مـل$^{-1}$ مـع 1 مـل مـن دارئ Tris-Hcl بتركيـز 0.05 مـولاري ورقـم هيـدروجيني 8.3 يحتـوي علـى 0.001 مـولاري EDTA و 0.5 مـل مـن Pyrogallol (المحضـر بتركيـز 1.5% فـي 0.01 مـولاري Hcl) فـي انابيـب اختبـار، بعـدها تقـاس لامتصاصـية علـى طـول مـوجي420 نـانومتر، فـي حـين تتكـون العينـة الضـابطة مـن كـل المكونـات عـدا العينـة وتحسـب

النســبة المئويــة لقابليــة اقتنــاص الاوكســجين النشط من المعادلة التالية:

$$\text{قابلية اقتناص الاوكسجين النشط \%} = [\frac{A_1 - A_\circ}{A_\circ}] \times 100$$

اذ ان:

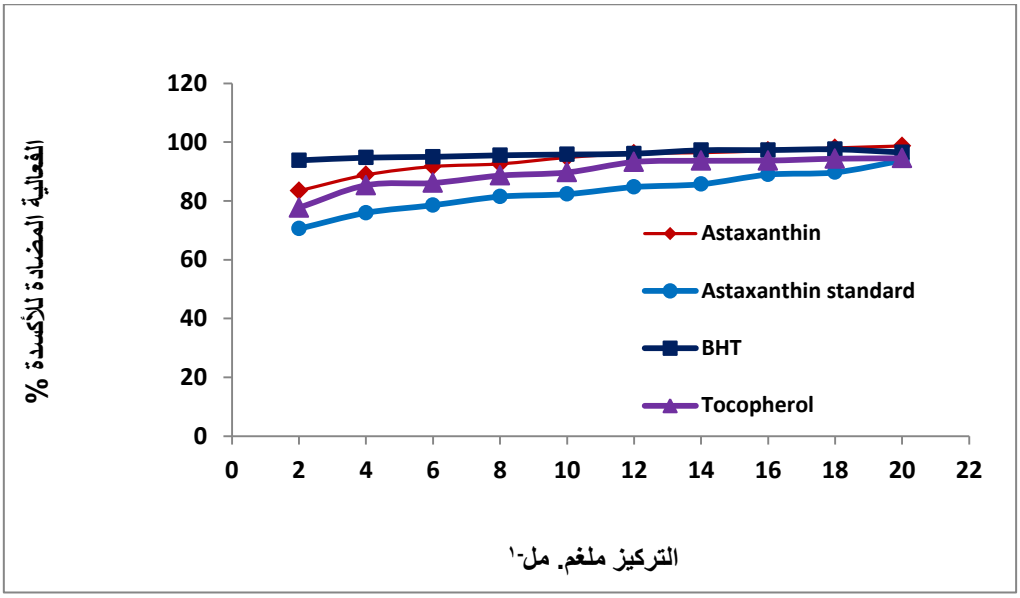
$A_\circ$= امتصاصية العينة الضابطة. A_1= امتصاصية العينة.

قورنت قابلية اقتناص الاوكسجين النشط مع BHT، α–tocopherol ، حامض الاسكوربيك، حامض الستريك.

النتائج والمناقشة

استخلاص الصبغة

اعطى الاستخلاص بالاسيتون 90% لقشور الروبيان الطازجة محتوى 79.61 بالمايكروغم/غم اذ يعد الاسيتون الاعلى قطبية وكذلك الماء[4] ان استعمال خليط من مذيبات مختلفة يعمل على زيادة القطبية لغرض الوصول الى النقطة الحرجة وهذا مما يساعد على استخلاص الصبغة من الكتلة الحيوية اكثر من مرة لزيادة كفاءة الاستخلاص. يكون اساس القطبية احتواء الجزيئة على مراكز منفصلة للشحنات الموجبة والسالبة المتأينة من ذرات الجزئية وكيفية ترتيب هذه الذرات لذلك فأنه من الممكن ان تنجذب جزيئة تحتوي على شحنات موجبة وسالبة الى جزيئة اخرى ذات طبيعة قطبية اي (محتوية على شحنات موجبة وسالبة ايضاً) [2].



شكل (1) الفعالية المضادة للأكسدة (%) لصبغة الاستازانثين المستخلصة بعد 24 ساعة.

اتفقت هذه النتيجة مع ما استعمله Sudhakar واخــرون (28) لاســتخلاص الكاروتينويــدات مــن النباتــات المائيــة باســتعمال ثــلاث مــذيبات اســيتون 90% و اســيتون 100% وايثــانول وكــان اســتخلاص الصــبغة بمــذيب الاســيتون 90% هــو الاعلــى مــن بــين المــذيبات المســتعملة. وجــاءت متفقــة ايضــاً مــع مــا حصــل عليــه Sindhu و Sherief (27) مــن اســتعمال عــدة مـذيبات فـي اسـتخلاص الاسـتازانثين مـن قشـور الروبيــان، اذ وجــدا ان اعلــى اســتخلاص كــان لمــذيب الاســيتون مقارنــة بالمــذيبات الاخــرى المستعملة في الدراسة.

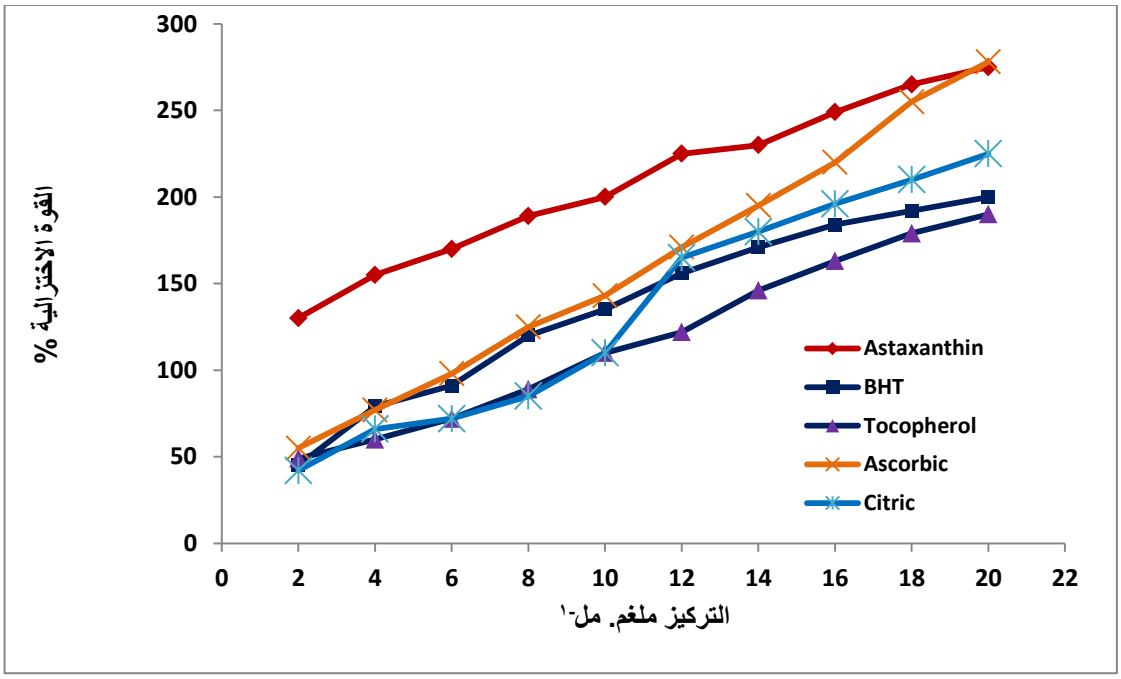
الفعالية المضادة للأكسدة للصبغة المستخلصة

يبــين الشــكل (1) النســبة المئويــة للفعاليــة المضــادة للأكســدة لصــبغة الاســتازانثين المستخلصــة مــن قشــور الروبيــان ومقارنتهــا مــع صــبغة الاســتازانثين القياســية و BHT و α–tocopherol لتراكيــز 2-20 ملغــم. مــل$^{-1}$ بعد 24 ساعة من الحضن، اذ اعطت الصبغة المستخلصــة فعاليــة مضــادة للأكســدة مقــدارها 83.47% عنــد 2 ملغــم. مــل$^{-1}$، فــي حــين ظهــر ان BHT يمتلــك فعاليــة عاليــة بلغــت 93.81% عنــد التركيــز نفســه، بينمــا اعطــت صــبغة الاسـتازانثين القياسـية المستخلصـة مـن الطحالـب الحمــراء فعاليــة مقــدارها 70.55%، فــي حــين امتلــك α–tocopherol فعاليــة بلغــت 77.68% عند تركيز 2 ملغم/مل.

ازدادت الفعاليــة المضــادة للأكســدة للاســتازانثين المستخلصــة وكــل مــن صــبغة الاســتازانثين القياســية والــ BHT و α–tocopherol مــع زيــادة التركيــز حتــى وصــلت الــى اقصــى فعاليــة مقــدارها 98.7% وبــذلك تفوقــت فعاليتهــا فعاليــة BHT البالغــة 96.5% عنــد التركيــز 20 ملغم/مـل. أمـا فعاليـة كـل مـن صـبغة الاسـتازانثين القياسـية وα–tocopherol بعـد 24 سـاعة مـن الحضـن فـي مسـتحلب حـامض اللينوليـك وصـلت الــى 93.76 ,94.5% علــى التــوالي عنــد تركيــز 20 ملغم/مـل ويمكـن ان يعـزى الاخـتلاف فـي الفعاليــة بــين صــبغة الاســتازانثين المستخلصــة مــن القشــور وصــبغة الاســتازانثين القياســية الــى اخــتلاف المــادة الاوليــة وطــرق الاســتخلاص ونــوع المــذيب المســتعمل فــي الاســتخلاص وجـاءت هـذه النتـائج مقاربـة للتـي حصـلت عليهـا Gramza-Michatowska و Stachowiak [12] لفعاليــة صــبغة الاستازانثين المستخلصـة مـن خميـرة *Phaffia rhodozyma* التــي اعطــت فعاليــة مضــادة للأكســدة 94.58%، ولمــا توصــل لــهXia واخــرون(30) عنــد تقــدير الفعاليــة للصــبغة المستخلصـة مـن الطحالـب الدقيقـة *Odontella aurita* اذ كانــت 90.3%. يمكــن ان يعــود سـبب تفـوق الاسـتازانثين الـى مـا تمتلكـه مـن خصــائص تعتمــد علــى التركيــب الجزيئــي ووجــود مجموعــة الهيدروكســيل (OH) ومجموعـة الكيتـون C=O فـي انصـاف كـل حلقـة مع وجود الأواصر المزدوجة المتبادلة [10] .

القوة الاختزالية

يمثـل الشـكل (2) القـوة الاختزاليـة لصـبغة الاسـتازانثين للتراكيـز 2-20 ملغم.مـل$^{-1}$ ومقارنتهـا مـع BHT و α–tocopherol وحـامض الاسـكوربيك وحـامض السـتريك للتراكيـز نفسـها، اظهـرت الصـبغة قـوة اختزاليـة عاليـة عنـد اقـل تركيـز مسـتعمل 2 ملغم.مـل$^{-1}$ البـالغ 130% وحتـى التركيـز 10 ملغم.مـل$^{-1}$ 200% وهـي مقاربـة للقـوة الاختزاليـة التـي اعطاهـا BHT عنـد جميـع التراكيـز المسـتعملة التـي تراوحـت 45 – 200% ، بينمـا تفوقـت الصـبغة فـي قوتهـا الاختزاليـة عـن جميـع عينـات المقارنـة المسـتعملة فـي الدراسـة البالغـة 265, 246, 230, 225% لكـل مـن التراكيـز 18, 16, 14, 12 ملغم/مـل علـى التـوالي، فـي حـين قاربـت القـوة الاختزاليـة للصـبغة عنـد تركيـز 20 ملغم/مـل القـوة الاختزاليـة لحـامض الاسـكوربيك وهـي 278, 275 % علـى التـوالي. اعطـى حـامض السـتريك قـوة اختزاليـة عاليـة تراوحـت 42- 225 % للتراكيـز 220- ملغم/مـل ، بينمـا اعطـى α–tocopherol اقـل قـوة اختزاليـة فـي كـل التراكيـز المسـتعملة قيـد الدراسة وكانت بحدود 49 – 190 %.



شكل (2) القوة الاختزالية (%) للاستازانثين المستخلصة من قشور الروبيان

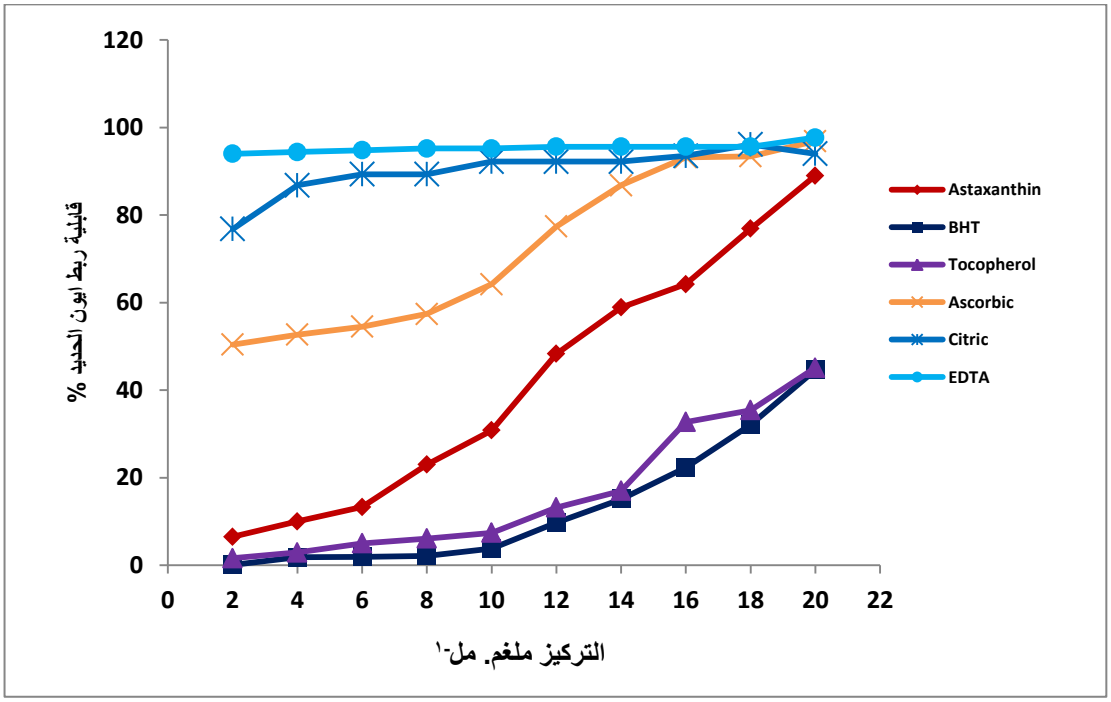
وجـاءت هـذه النتـائج مقاربـة الـى مـا وجدتـه Al-Ali [3] عنـد دراسـتها للقـوة الاختزاليـة لصـبغة Lycopene عنـد التراكيـز 0.5-5 ملغم.مـل$^{-1}$ والبالغـة 150-270.83% ، ويمكـن ان يعـود سـبب قـوة او ضـعف الاختزاليـة الـى عـدد وموقـع

المجـاميع الفعالـة المتواجـدة فـي الاسـتازانثين التـي تعمـل على اخمـاد الجـذور الحـرة او قـدرتها علـى مـنح الهيـدروجين وبالتـالي زيـادة الفعاليـة المضـادة للأكسـدة [25].

قابلية ربط ايون الحديدوز

يوضـح الشـكل (3) النسـبة المئويـة لقابليـة مسـتخلص الاسـتازانثين لـربط ايـون الحديـد ومقارنتهـا مـع كـل مـن BHT، tocopherol– α، EDTA، حـامض الاسـكوربيك، حـامض السـتريك وبتراكيـز 2-20 ملغم/مـل، اذ ظهـر مـن خـلال النتـائج ان للاسـتازانثين المستخلصـة مـن قشـور الروبيـان قابليـة ضـعيفة علـى ربـط ايـون الحيديـدوز بـدءاً مـن التركيـز 2 ملغـم. مـل$^{-1}$ وحتـى 10 ملغـم. مـل$^{-1}$ وكانـت اقـل مـن 50% ولكـن مـع تزايـد التركيـز 12-20 ملغم.مـل$^{-1}$ ازدادت قابليتهـا علـى ربـط ايـون الحيديـدوز حتـى وصـلت الـى اقصـاها عنـد تركيـز 20 ملغـم. مـل$^{-1}$ البالغـة 89% وهـذه النسـبة التـي اظهرتهـا الاسـتازانثين هـي اعلـى مـن قابليـة كـل مـن α–tocopherol وBHT التـي وصـلت الـى 44.51 ,44.6% علـى التـوالي ومـع ذلـك فأنهـا اقـل ممـا وصـل اليـه كـل مـن EDTA، وحـامض الاسـكوربيك وحـامض السـتريك لجميـع التراكيـز المسـتعملة فـي الدراسـة البالغـة 94-76.8, 97.7-94 ,96.9-10% علـى التـوالي وكانـت هـذه النسـب مقاربـة للتـي حصـل عليهـا Gowda واخـرون (11) عنـد تقـدير قابليـة الليـوتين علـى ربـط ايـون الحديـد البالغـة 91%، بينمـا كانـت اعلـى ممـا توصـل اليـه كـل مـن Manimalaand و Murugesan (19) عنـد دراسـة قابليـة الكاروتينويـدات المستخلصـة مـن خميـرة *Sporobolomyces sp.* علـى ربـط ايـون الحديـد البالغـة 59.32%، وجـاءت هـذه النتـائج خلافـاً مـع مـا وجـده Cheng واخـرون(5) فـي دراسـة قابليـة صـبغة Deinoxanthin علـى ربـط ايـون الحديـد ومقارنتهـا مـع EDTA، اذ لاحظـوا انخفـاض قابليـة المسـتخلص علـى ربـط الحديـد مـع زيـادة التركيـز مقارنـة مـع EDTA، يعـزى سـبب التبـاين الـى تـأثير المجـاميع الفعالـة الموجـودة فـي صـبغة الاسـتازانثين علـى ايـون الحديـد، اذ ان ايونـات الحديـدوز تـؤدي الـى تكـوين جـذر $^{\bullet}OH$ عـن طريـق تفاعـل فنتـون وبوجـود مركـب 8-hydroxy quinine الـذي يكـون معقـد مـع ايـون الحديـدوز Fe^{+2} ويتفكـك هـذا المعقـد بوجـود عوامـل مخلبيـة والـذي يـؤدي الـى نقـص اللـون الاحمـر الـذي يعطـي مؤشـراً عـن مـدى قابليـة ربـط المعـادن وفعاليتهـا فـي منـع حـدوث الضـرر التأكسـدي النـاجم عـن الحديد[14, 7, 20].

امـا قابليـة EDTA العاليـة علـى ربـط ايـون الحديـدوز فيعـود لكونـه خالـب للأيونـات ممـا يمنـع ذوبـان نسـبة عاليـة مـن الحديـدوز والـذي يـؤدي الـى تـأخير مـنح الالكتـرون واعاقـة توليـد الحـرة[11].



شكل (3) النسبة المئوية لقابلية الاستازانثين المستخلصة على ربط ايون الحديد

اقتناص جذر الهيدروكسيل

يمثل الشكل (4) قابلية الاستازانثين على اقتناص جذر الهيدروكسيل عند تراكيز 2-20 ملغم/مل مقارنة بكل من BHT ، α–tocopherol ،حامض الاسكوربيك، حامض الستريك، اذ لوحظ ان النسبة المئوية لاقتناص جذر الهيدروكسيل من قبل الاستازانثين عند تركيز 2 ملغم. مل$^{-1}$ % 40.21 وهي مقاربة لكل من BHT و α–tocopherol 40 ,41.84% على التوالي عند التركيز نفسه. اما عند تركيز 4 ملغم/مل وصلت النسبة المئوية للاقتناص الى 49.7% وهي اعلى من النسبة المئوية لاقتناص جذر الهيدروكسيل من قبل كل من BHT و α–tocopherol والبالغة 42.23, 42.87% على التوالي، بعدها اخذت نسبة الاقتناص بالتزايد مع زيادة التركيز من 6 ملغم/مل البالغة 58.62%، في حين ان تركيز 8 ملغم/مل اعطى نسبة اقتناص مقدارها 67.08% وحتى تركيز 20 ملغم/مل 84.79% وهي اقل من قابلية اقتناص حامض الاسكوربيك لجذر الهيدروكسيل التي كانت بحدود 53.71 - 85.45% وهي ايضا اقل من قابلية حامض الستريك على اقتناص جذر الهيدروكسيل الذي تراوح ما بين 55.67 - 87.39%.

يتولـد جـذر الهيدروكسـيل بوجـود H_2O_2 عـن طريـق تفاعـل فنتـون الـذي يتحفـز بأيونـات الحديدوز Fe^{+2} والذي يؤدي الى ظهور اللون عنـد اقتنـاص هـذه الجـذور مـن قبـل مضـاد الاكسـدة وان تغيـر اللـون يكـون متناسـباً مـع قابليـة اقتنـاص الكاروتينويـدات لتلـك الجـذور، وان جـذر الهيدروكسـيل $OH^{\bullet}$ وهـو جـذر نشـط جـداً يمكـن ان يتفاعـل مـع البروتينـات والاحمـاض النوويـة واللبيـدات وغيرهـا مـن الجزيئـات ليغيـر مـن تركيبهـا مسـبباً التلـف(11 و 32)

وقـد ذكـر Pu (22) ان الخـواص المضـادة للأكسـدة العاليـة للاسـتازانثين هـي عـن طريـق الـتخلص مـن الجـذور الحـرة واخمادهـا يعـود الـى سلسـلة الاسـتازانثين الطويلـة والمحتويـة علـى الاواصـر المزدوجـة المتبادلـة والمجـاميع الكيتونيـة والهيدروكسـيلية وان فعاليتهـا تفـوق 10مرات فعالية الكاروتينويدات الاخرى.

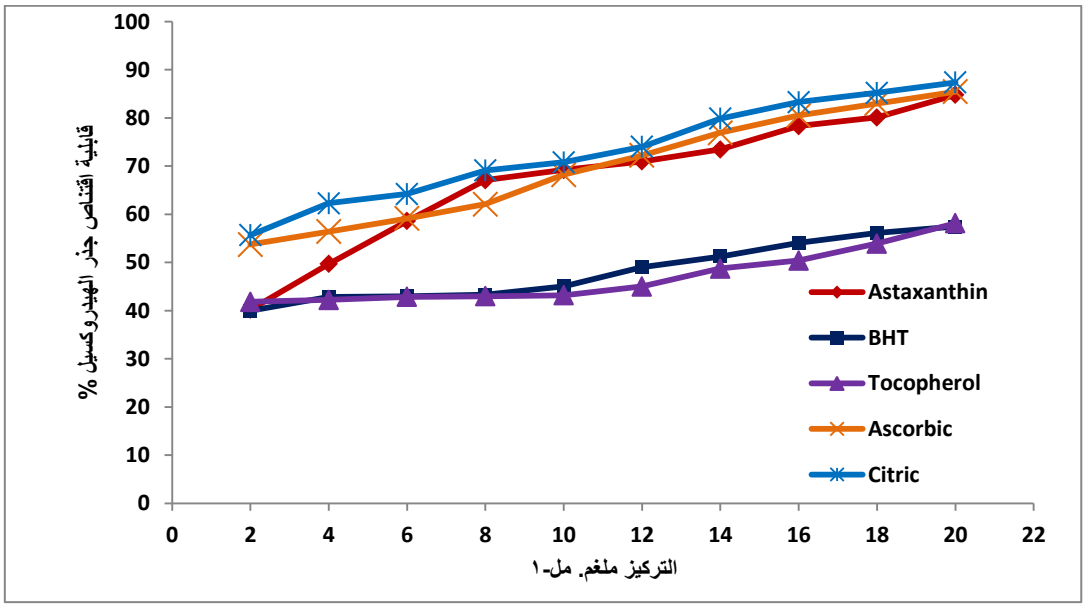
قابلية اقتناص بيروكسيد الهيدروجين

يوضـح الشـكل (5) قابليـة مسـتخلص صـبغة الاسـتازانثين لاقتنـاص بيروكسـيد الهيـدروجين H_2O_2 باسـتعمال التراكيـز 2-20 ملغم/مـل بالمقارنـة مـع BHT و α–tocopherol وكـل مـن حـامض الاسـكوربيك والسـتريك بـالتراكيز نفسـها. اذ ظهـر ان الاسـتازانثين تمتلـك قـدرة علـى اقتنـاص بيروكسـيد الهيـدروجين بـدءً مـن التركيـز 2 ملغم/مـل البـالغ 44.57 %، ثـم ازدادت قابليـة الصـبغة علـى الاقتنـاص عنـد 4 ملغـم. مـل$^{-1}$ التـي وصـلت الـى اكثـر مـن50% وكـان الاقتنـاص اكثـر وضـوحاً بـدءاً مـن التركيـز12ملغـم. مـل$^{-1}$ 83.03% وحتـى التركيـز 20 ملغـم. مـل$^{-1}$ 89.67% وبالمقارنـة مـع BHT الـذي اعطـى اقـل قابليـة اقتنـاص لـ H_2O_2 لجميـع التراكيـز التـي كانـت بحـدود 74.05-42.67% .

امـا حـامض السـتريك ابـدى ارتفاعـاً فـي قابليتـه للاقتنـاص و بكـل التراكيـز المسـتعملة قيـد الدراسـة، اذ سـجلت اقـل واعلـى قيمـة مقـدارها 78.61-92.29% لكـل مـن 2 و20 ملغم/مـل علـى التـوالي، واظهـر كـل مـن الـ tocopherol –α وحـامض الاسـكوربيك قابليـة علـى اقتنـاص H_2O_2 بقـيم متقاربـة 86.41 و86.92% علـى التـوالي. اختلفت هذه النتـائج عن مـا توصـل اليـه Kaur واخـرون(16) عنـد دراسـتهم قابليـة مسـتخلص Lycopene بتراكيـز مختلفـة 70- 10مـايكروغم. مـل$^{-1}$ علـى اقتنـاص بيروكسـيد الهيـدروجين ومقارنتهـا مـع حـامض الاسـكوربيك وان صـبغة Lycopene اعطـت زيـادة خطيـة مـع زيـادة التراكيـز حتـى وصـلت الـى اعلـى زيـادة مقـدارها 90%، وكـذلك جـاءت هـذه النتـائج مقاربـة لمـا وجدتـه Ali -Al [3] فـي دراسـتها لقابليـة صـبغة الـLycopene علـى اقتنـاص بيروكسـيد الهيـدروجين عنـد 5 ملغم/مـل والبالغـة 73.74%. يمكـن ان يعـود السـبب فـي قابليـة الاسـتازانثين لاقتنـاص بيروكسـيد الهيـدروجين الـى تركيبهـا الهيكلـي بوجـود مجمـوعتين فعالـة O_2 و OH فـي نهايات السلسلة عند كل حلقة اروماتية [8].

قابلية اقتناص الاوكسجين النشط

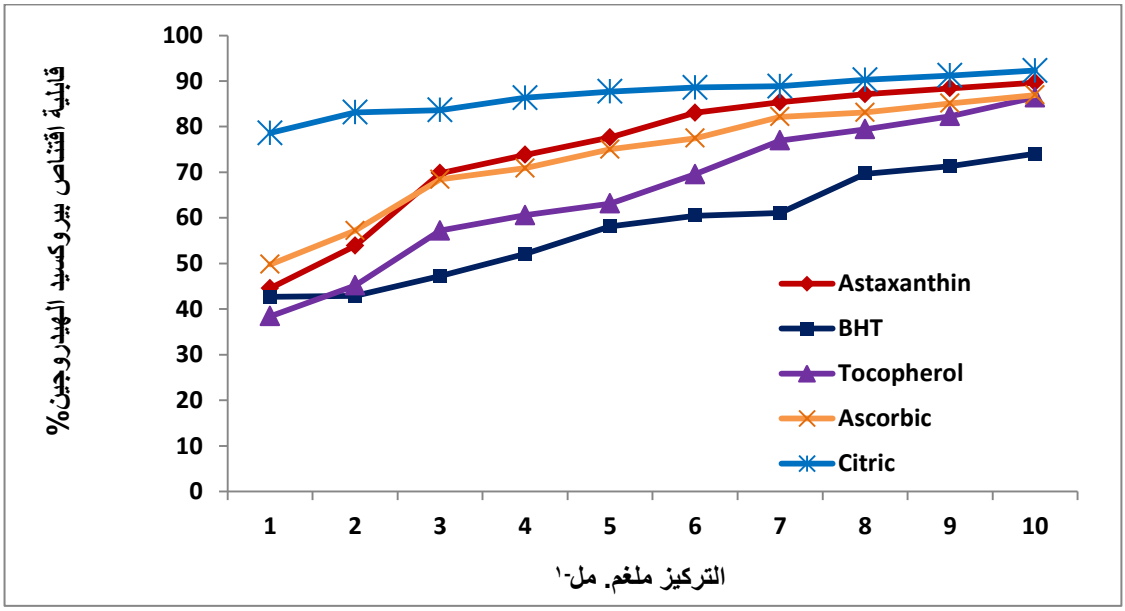
يظهـر مـن الشـكل (6) النسـبة المئويـة لقابليـة الاسـتازانثين علـى اقتنـاص الاوكسـجين الفعـال وبتراكيـز تراوحـت 2-20 ملغم/مـل ومقارنتهـا مـع BHT ، α– tocopherol ،حـامض الاسـكوربيك،حامض السـتريك بـالتراكيز نفسها، اذ تبين من خلال النتائج زيادة في قابلية الاسـتازانثين علـى اقتنـاص الاوكسـجين مـن التركيـز 2ملغم. مـل$^{-1}$ وحتـى التركيـز 20 ملغم. مـل$^{-1}$، ولكـن كانـت النسـبة المئويـة لاقتنـاص الاوكسـجين النشـط اعلـى مـن 50% عنـد التراكيـز مـن 12 الـى 20 ملغم. مـل$^{-1}$ والبالغـة 87%, 84, 71, 68, 56 علـى التـوالي وجـاءت قابلية اقتنـاص الاوكسـجين متقاربـة مـع قابليـة α– tocopherol وحـامض السـتريك والاسـكوربيك والبالغـة 81 و85 و 88% علـى التـوالي عنـد التركيـز 20 ملغم/مـل امـا الـ BHT فـأعطى اقـل قابليـة علـى اقتنـاص الاوكسـجين مقارنة بالصبغة المستخلصة البالغة 71%.



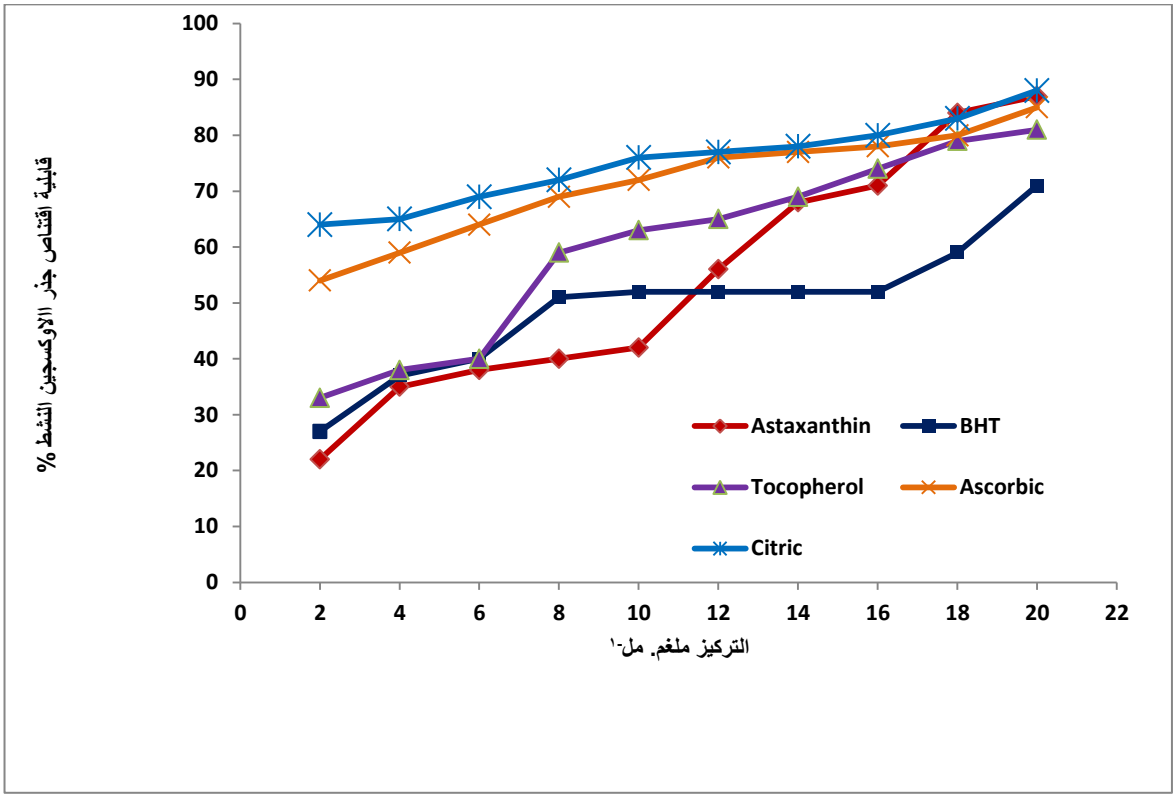
شكل (4) قابلية الاستازانثين(%) على اقتناص جذر الهيدروكسيل

تعمـل صـبغة الاسـتازانثين علـى اقتنـاص جـذر الاوكسـجين غيـر المسـتقر والنشـط تجـاه التفـاعلات الكيميائيـة مـع جزيئـات اخـرى والمستمدة مـن ثـلاث عناصـر هـي الاوكسـجين والنيتـروجين والكبريـت وبالتـالي تكـوين انـواع مـن الاوكسـجين الفعـال(ROS) Radical Superoxide Scavenging والنيتـروجين الفعـال Radical Nitrogen Scavenging (RNS) وانـواع الكبريـت الفعـال Radical disulfide Scavenging (RSS) اذ

يتفاعل جذر $O^{\bullet}_{2}$- مع عدد من الجزيئات لتوليد ROS أوعن طريق العوامل المحفزة المعدنية أو تفاعلات الاجهاد التأكسدي التي تؤدي الى حالة مرضية تعرف باسم اكسدة الاجهاد، يؤدي تراكم ROS مسبباً الاكسدة في الخلايا وبذلك تبدأ آلية الدفاع لحماية الخلايا من تراكم وتطور الـROS بواسطة الضرر التأكسدي وتشمل هذه الدفاعات مضادات الاكسدة وهي وان وجدت بتراكيز منخفضة فهي تؤخر او تمنع الاكسدة والتي تكون فعالة ليتم تبرع الالكترونات الخاصة لـROS وبالتالي ابطال مفعول الآثار السلبية لجذر الاوكسجين النشط وبشكل عام يعمل مضاد الاكسدة في الجسم على ثلاث مستويات مختلفة هي منع او الحفاظ على تشكيل الانواع التفاعلية ، كبح انواع الجذور الفعالة اما باستعمال مضادات الاكسدة الاولية و/او مضادات الاكسدة الثانوية مثل حامض الاسكوربيك والتوكوفيرول واصلاح مراكز تلف الجزيئات المستهدفة مثل glutathione. تصنف مضادات الاكسدة الى مجموعتين رئيستين مضادات الاكسدة الانزيمية ومضادات الاكسدة غير الانزيمية وتعد مضادات الاكسدة الانزيمية الموجودة في الجسم وتشمل Superoxide dismutase (SOD) وهي الكاتليز والجلوتاثيون بمثابة خط الدفاع الاول للجسم ضد ROS و RSS و RNS (18).



شكل رقم (5) قابلية الاستازانثين المستخلصة (%) على اقتناص بيروكسيد الهيدروجين



شكل (6) قابلية الاستازانثين المستخلصة (%) على اقتناص الاوكسجين النشط

المصادر

1-الطـــائي، منيـــر عبـــود جاســـم.1986. تكنولوجيـا اللحـوم والأسـماك. مطبعـة جامعـة البصـــرة. جامعـــة البصـــرة. وزارة التعلـــيم العالي والبحث العلمي. العراق.

2-دلالـــي، باســـل كامـــل والحكـــيم، صـــادق حســـن.1987. تحليـــل الأغذيـــة، مديريـــة دار الكتـــب للطباعـــة والنشـــر، جامعـــة الموصـــل، وزارة التعلـــيم العـــالي والبحـــث العلمـــي. العراق.

3-Al-Ali, R. M.2012. The antioxidant properties of tomato lycopene. Basrah J. Agric. Sci., 25(1):27-38.

4- Boonnoun, P .Y; A. Kurita; Kamo; Wahyudiono; S. Machmudah; Y. Okita; E. Ohashi; H. Kanda and Goto, M.2014. Wet extraction of lipids and astaxanthin from *haematococcus pluvialis* by liquefied dimethyl ether. J. Nutr. Food Sci., 4:305.

5- Cheng, J; Z. Zhang; Z. Zheng; G. Lv; L. Wang; B. Tian and Hua, Y.2014. Antioxidative and hepatoprotective activities of deinoxanthin-rich extract from *Deinococcus radiodurans* R1 against carbon Tetrachloride-induced liver injury in mice. Trop. J Pharm. Res.,13(4):573-580.

6- Eldahshan, A. O. and A. N.B Singab.2013. Carotenoids. Journal of pharmacognosy and phytochemistry, 2:225-234.

7- El-Sayed, A. B.2010. Carotenoids accumulation in the green alga *scenedesmus sp.* incubated with industrial citrate waste and different induction stresses. Nature and Science, 8(10): 34-40.

8- Gacheva, G.; P. Dimitrova and Pilarski, P. 2015.New strain *haematococcus* cf. *pluvialis* rozhen-12–growth, biochemical characteristics and future perspectives. Genetics and Plant Physiology, 5(1): 29–38.

9- Girgih, A. T; C. C. Udenigwe and Aluko, R. F.2011. In vitro antioxidant properties of hemp seed protein hydrolysate fractions . J. Am. Oil Chem. Soc., 88: 381-389.

10- Goto, S; K. Kogure and Abe, K.2001. Efficient radical trapping at the surface and inside the phospholipids membrane is responsible for highly potent antioxidative activity of the carotenoid astaxanthin. Biochem. Biophys. Acta., 1521: 251-258.

11- Gowda, T. S. S; A. R. Dinesha; A. R. harsha and Srinivasa, A. L.2010. Free radical scavenging activity of lutein – isolated from methi leaves (*Trigonella foenum graecum*). Int J Pharmacy Pharm Sci., 2: 113-117.

12- Gramza-Michałowska, A. and B. Stachowiak.2010. The antioxidant potential of carotenoid extract from *phaffia rhodozyma*. Acta Sci. Pol.

radical scavenging activity of lycopene. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, 3: 1220-1228.

17- Kouchi, H.H.; M. M. Nasab and Shabanpur, B.2012. Extraction of carotenoids from crustacean waste using organic solvents. Recycling of Organic Waste in Agriculture.

18- Kunwar, A. and K. I. Priyadarsini, K.2011. Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health. Journal of Medical & Allied Sciences, 1(2): 53-60.

19- Manimala, M. R. A. and R. Murugesan 2014. In vitro antioxidant and antimicrobial activity of carotenoid pigment extracted from *Sporobolomyces sp*. isolated from natural source. Journal of Applied and Natural Science, 6 (2): 649 – 653.

20- Mohan, S. C;V. Balamurugan; S. T. Salini, and Technol. Aliment., 9(2): 171-188.

13- Gülcin, I; M. Oktay; E. Kirecci and Küfrevioĝlu, O.2003. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum L*.) seed extracts. Food Chemistry, 83: 371-382.

14- Huang, X; J. Dai; J. Fournier; A. M. Ali; Q. Zhang and Frenkel, K.2002. Ferrous ion autoxidation and its chelation in iron-loaded human liver HepG2 cells. Free Radic. Biol. Med., 32(1):84-92.

15- Huda-Faujan, N; A. Noriham; A. S. Norrakiah and Babji, A. S.2009. Antioxidant activity of plants methanolic extracts containing phenolic compounds. African Journal of Biotechnology, 8 (3): 484-489.

16- Kaur, A.; J. Dhari; O. P. Sharma; G. Gupta and Kharb, V.2012.
In-vitro anti-oxidant and free

applications—A review. Mar. Drugs, 12: 128-152.

24- Regal, P.; K. T. Amorim-Carrilho; A. Cepeda and Fente, C.2014. Review of methods for analysis of carotenoids. Trends in Analytical Chemistry, 56:49–73.

25- Rice – Evans, C. A.; N. J. Miller; P. G. Bolwell; P. M. Bramley and Pridham, J. B. 1995. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonides. Free Radical Res., 22:375-385.

26- Rodrigues, E.; L. R. B. Mariutti and Mercadante, A. Z.2012. Scavenging capacity of marine carotenoids against reactive oxygen and nitrogen species in a membrane-mimicking system. Mar. Drugs, 10: 1784-1798

27- Sindhu, S. and Sherief, P.M.2011. Extraction, characterization, antioxidant and anti-inflammatory properties of Rekha, R.2012. Metal ion chelating activity and hydrogen peroxide scavenging activity of medicinal plant *Kalanchoe pinnata*. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 4(1):197-202.

21- Pownall, T. L.; C. C. Udenigwe and Aluko, R. E.2010. Amino acid composition and antioxidant properties of pea seed (*Pisum sativum L.*) enzymatic protein hydrolysate fractions. J. Agric. Food Chem., 58: 4712-4718.

22- Pu, J.2010. Development of Stable Microencapsulated Astaxanthin Powders Using Extracted Astaxanthin from Crawfish and Shrimp Byproducts. Thesis Master of Science. Louisiana State University.USA

23- Ranga Rao, A. ; Moi, S. R. and Aswathanarayana, R. G.2014. A staxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial

carotenoids from the shell waste of Arabian Red Shrimp *Aristeus alcocki*, Ramadan 1938. The Open Conference Proceedings Journal, 2: 95-103.

28- Sudhakar, M. P.; J. S. Ananthalakshmi and Nair, B. B. (2013). Extraction, purification and study on antioxidant properties of fucoxanthin from brown seaweeds. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research,5(7):169-175.

29- Türkoğlu, S.; S. Çelik; D. Türkoğlu; U. Çakılcıoğlu and Bahsi, M.2010. Determination of the antioxidant properties of ethanol and water extracts from different parts of *Teucrium parviflorum Schreber*. African Journal of Biotechnology, 9 (40): 6797-6805.

30- Xia, S.; K. Wang; L. Wan; A. Li; Q. Hu and Zhang, C.2013. Production, characterization, and antioxidant activity of fucoxanthin from the marine diatom *odontella aurita*. Mar. Drugs, 11: 2667-2681.

31- Wang, J.; Y. Lee; M. Chou; R. Chang; C. Chiu; Y. Liang and Wu, L.2015. Astaxanthin protects steroidogenesis from hydrogen peroxide-induced oxidative stress in mouse leydig cells. Mar. Drugs, 13: 1375-1388.

32- Zhang, Y.; H. Fang; Q. Xie; J. Sun; R. Liu; Z. Hong; R. Yi and Wu, H.2014. Comparative evaluation of the radical-scavenging activities of fucoxanthin and its stereoisomers. Molecules, 19(2):2100-13.

Study Activity Antioxidant Alastazantin dye extracted from the shrimp shell

*Zina Tariq Nimah Al-kanaan Rawdhah Mahmoud Ali Al-Ali

Munir Abboud Jassim al-Tai

Department of Food Science – College of Agriculture – University of Basra University –Republic Iraq

Abstract

Extraction of the pigment was 90 % acetone 79.61µg/g. The effectiveness of anti-oxidation after 24 hours of a dens was estimated and it was found to be proportional with the increasing of the concentration of astaxanthin which ranged from 83.47 -98.7% of 2-20 mg/ml, respectively, at the highest concentration which was higher than, in their effectiveness, the standard astaxanthin and BHT samples and tocopherol-α, which were to 93.76%, 96.75% and 94.50%, respectively, at the highest concentration. Astaxanthin characterized by high strongly reductionist amounted to 275%, which is nearly approach to ascorbic acid that has a value of 278%, while each of BHT, α- tocopherol and citric acid gave reductionist force less than a dye extracted, 200 and 190 and 225%, respectively. The tincture appeared an ability to connect ferrous ion at the highest concentration in the study (89%) which is higher than that of BHT and α- tocopherol which were 44.6% and 45.1% respectively, while EDTA, ascorbic acid and citric acid beat it in the ability to link ferrous ion which were 97.7%, 96.9% and 94%, respectively.The ability to seize the root of the hydroxyl dye was 84.79% which approach that of the ascorbic acid and citric acid (85.45% and 87.39%), respectively, while it was higherthan that of BHT and tocopherol-α that have values of 57.45% and 58.13 respectively.The dye showed a clear ability to seize the hydrogen peroxide starting froma concentration of 12-20

mg/ml, which reached 83.03%-89.67%, surpassing each of BHT, tocopherol-α and ascorbic acid at the highest concentration that have the values 74.05%, 86.41% and 86.92%, respectively, while it was less than the ability of acid Citric to seize the radical of hydrogen peroxide that was 92.29%. Astaxanthinsurpassed, in its ability to seize the radical of the active oxygen,the control samples of BHT, tocopherol-α and ascorbic acid, having values of 87%, 71% and 85%, respectively, while it was slightly lessthan that of citric acid which was 88%.

Keywords: Antioxidants, Astaxanthin,Waste shrimp, Reducing Power.

Part of the M.Sc thesis of the third author