تنقية الكارنوسين من عضلة صدر الدجاج وتشخيصه ببعض تقنيات الكروماتوكرافيا

ضحى داود سلمان
شعبة العلوم الاساسية
كلية الزراعة /جامعة بغداد

عامر خلف الدروش
قسم علوم الاغديه والتقانات الاحيائيه
كلية الزراعه /جامعة بغداد

المستخلص

استخلص الكارنوسين من عضلة صدر الدجاج باستخدام الماء المقطر ثم نقي بوساطة كروماتوكرافيا التبادل الايوني بأستعمال عمود CM-Cellulose ،شخص الكارنوسين بثلاث طرائق هي كروماتوكرافيا الورق وكروماتوكرافيا السائل عالي الكفاءة (HPLC) وباستخدام المطياف عند موجات الاشعة فوق البنفسجية .بلغت حصيلة الكارنوسين المستخلص والمنقى من عضلة صدر الدجاج 100ملغم/100غم ،وقد اظهر الكارنوسين المنقى بتقنية التبادل الايوني نقاوة عالية عند فحصة بكروماتوكرافيا الورق وظهر بقيمة Rf (0.20). كما ظهرت بقعتان للكارنوسين النقي بعد معاملته بحامض الهيدروكلوريك6عياري وترحيله بكروماتوكرافيا الورق ، مثلت هاتان البقعتان بيتا الانين والهستدين المكونيين للكارنوسين وبقيمة Rf×100 (40.1) و(16.7) على التوالي . كما تم الحصول على قمة واحدة ممثلة للكارنوسين باستخدام كروماتوكرافيا السائل عالي الكفاءة (HPLC) بوقت احتجاز 6.4 دقيقة . اظهر الكارنوسين المتحلل بحامض الهيدروكلوريك 6عياري قمتين بأوقات احتجاز قدرها 3.435 و4.423 دقيقة على التوالي وهي مقاربة لاوقات احتجاز الحوامض الامينية القياسية بيتا الانين والهستدين والتي بلغت 3.525 و 4.503 دقيقة على الترتيب . اظهر الكارنوسين اعلى امتصاصية على طول موجي 212 نانومتر باستخدام مطياف الاشعة فوق البنفسجية.

The Iraqi Journal of Agricultural Sciences 40 (2) :126-133 (2009) Salman & Al-darwash

CARNOSINE PURIFICATION FROM CHICKEN PECTORAL MUSELE AND DIAGNOSIS BY SAME CHROMATOGHRAFIC TECHNIQUES

Dhuha D. Salman
Dep. Basic Science
College of Agriculture
Baghdad University

Amir K. Al-darwash
Dep. Food Science& Biotechnology
College of Agriculture
Baghdad University

ABSTRACT

Carnosine from chicken pectoral muscle was extracted using water and purified by ion –exchange chromatography using CM-cellulose. Carnosine was identified by paper chromatography , high-performance liquid chromatography (HPLC) and ultraviolet spectrophotometer.the yield of extracted and purified carnosine was 100 mg / 100g of chicken pectoral muscle.Paper chromatography showed high purity of carnosine after ion-exchange purification and had Rf ×100 value of 20.4 .Two spots were obtained on paper chromatography after the treatment of the resultant purified carnosine with 6 N hydrochloric acid representing β-alanine and histidine which compose carnosine .These spots had Rf×100 values of 40.1, 16.7 respectively. One peak representing carnosine with retention time 6.4 min was obtained by HPLC. Two peaks were obtained on HPLC after treatment of carnosine with 6N hydrochloric acid, with retention time of 3.435, 4.423, respectively, which were close to retention times of the standard amino acid β-alanine and histidine 3.525, 4.503 min, respectively. Carnosine exhibited highest absorption at 212 nm as detected UV-spectrophotometericelly

مستل من اطروحة دكتوراه للباحث الاول **Part of Ph.D. dissertation of the first author**

المقدمة

الكارنوسين ببتيد ثنائي يتألف من الحامضيين الامينين بيتا الانين والهستدين (β-alanyl –L-histidine). يتوافر الكارنوسين في اللحوم وتحديداً اللحوم البيضاء يقع ضمن عائلة الببتيدات الثنائية المحتوية على الهستدين والتي تمتاز بتركيزها العالي ضمن المركبات النتروجينية اللابروتينية التي قد يصل تركيزها الى 100 ملي مولار من وزن العضلة الهيكلية (12).عرف الكارنوسين بتركيزة العالي ضمن هذة العائلة اذ يتراوح بين (5-40) ملي مولار (3).اكتشف الكارنوسين عام 1900 ثم توالت اكتشاف ببتيدات ثنائية اخرى مشتقة من الكارنوسين بلغت في الوقت الحاضر اكثر من 10 مركبات طبيعية (2).

يتركز الكارنوسين في العضلات المتحركة Excitable Tissue كالعضلات الهيكلية والقلبية وكذلك الانسجة العصبية، ولاهميته في الدماغ يطلق علية بالببتيد العصبي nuropeptide(4). تمتلك جزيئة الكارنوسين العديد من الوظائف التي شجعت الكثير من الباحثين على استخلاصه والاستفادة من خصائصة منها كمنظم (داريء) لحامض اللاكتيك في العضلات اذ يساهم الكارنوسين بنسبة 40%من السعة البفرية للعضلة ،كما يعمل كمضاد للاكسدة وهو محب للماء hydrophilic antioxidant ، مؤخر للشيخوخة وله دور في تحسين النظام المناعي ومعالجة الجروح وتنظيم مستوى الكلوكوز في الدم وفي حماية كريات الدم الحمراء من التحلل بفعل المواد الكيميائية المؤكسدة ولحماية (DNA) الخلايا من الاكسدة وحماية خلايا الدماغ من مرض الزهايمر و وظائف اخرى كثيرة (18).

اجريت طرائق عديدة لتشخيص وتقدير تركيز الكارنوسين في عضلة الفقريات تضمنت استعمال كروماتوكافيا التبادل الايوني (7، 13) كروماتوكرافيا الغاز(6) وكروماتوكرافيا الورق (11) وطرائق طيفية (9) .توصلت هذة الدراسات الى اختلاف تركيز الكارنوسين والببتيدات الثنائية الاخرى باختلاف صنف الحيوان ،كما انها تختلف من نسيج الى اخر ضمن النوع الواحد وتختلف ايضا باختلاف الاعمار. هدفت الدراسة الحالية الى استخلاص الكارنوسين من عضلة صدر الدجاج باستعمال الماء المقطر لكونة ببتيد ذائب في الماء ثم تنقيته باستعمال المبادل الايوني الموجب CM-cellulose ،وتشخيصه بكروماتوكرافيا الورق وكروماتوكرافيا السائل العالي الكفاءة(HPLC) وايجاد أفضل موجة ضوئية تعطي اعلى امتصاصية للكارنوسين باستعمال جهاز المطياف عند منطقة الاشعة فوق البنفسجية.

المواد وطرائق العمل

استخلص الكارنوسين من لحم صدر الدجاج بعمر (6 اسابيع) با ستعمال الماء المقطر وفقا للطريقة التي ذكرها Chan وزملاؤه (8) ونقي الكارنوسين وفقاً للطريقة الموصوفة من قبل Huangو Kuo (13) با ضافة المستخلص المائي المركز على عمود التبادل الايوني الموجب كاربوكسي مثيل سليلوز (CM-cellulose) اذ ازيلت الاجزاء غير المرتبطة بالعمود باستعمال محلول فوسفات الصوديوم الداريء بتركيز 1ملي مولار برقم هيدروجيني 3.5 ،ثم استرد الكارنوسين باستعمال محلول فوسفات الصوديوم الداريء بتركيز 10 ملي مولار ذوالرقم الهيدروجيني 8.5 وبسرعة جريان 60مل /ساعة بواقع 8مللتر للجزء الواحد . قيست الامتصاصية للاجزاء المفصولة بجها ز المطياف الضوئي على طول موجي 570 نانومتر بعد أجراء التفاعل اللوني مع النهايدرين المحضر وفقاً لما ذكره العواد (1) اذ يستخدم تفاعل النهادرين في الكشف النوعي والتقدير الكمي للحوامض الامينية والببتيدات ذات الاوزان الجزئية الواطئه ولايعطي تفاعل لوني مع البروتينات. ولغرض تمييز الكارنوسين بين القمم المفصوله قيست الاجزاء المفصولة نفسها بالجهاز نفسه بطول موجي 500 نا نومتر بعد أجراء التفاعل معها بطريقة Diazo المحضرة وفقاً لما ذكره Macpherson (15) اذ يستخدم هذا التفاعل للكشف عن حلقة الاميدازول في المركبات ،جمعت الاجزاء المفصولة الممثلة لمنحني الكارنوسين وجففت.شخص الكارنوسين بتقنية كروماتوكرافيا الورق رقم 3 (14) باستعمال خليط المذيبات (كحول اثيلي :حامض الخليك :ماء مقطر) بنسبة (78:5:17) ثم اعيد الاختباراللكارنوسين المسترد من البقع المفصولة بتقنية كروماتوغرافيا الورق وذلك بتحديد البقع المفصولة باستعمال بخار الايودين Iodine Vapour والذي عرضت له الورقة مدة 30 دقيقة في وعاء التجفيف Desieceator اذ ظهرت البقع بلون بني حددت بقلم

الرصاص وعرضت الورقة للهواء للتخلص من الايودين ثم قصت بقع الكارنوسين ووضعت في انبوبة اختبار وذوبت محتوياتها بالماء المقطربخر الماء باستعمال فرن تحت التفريغ بحرارة 40 م° ثم أضيف حامض الهيدروكلوريك 6 عياري اغلقت انبوبة الاختبار وسخن الخليط بدرجة حرارة 130 م° مدة ساعة واحدة ، ثم بخر الانموذج حتى الجفاف بأستعمال فرن تحت التفريغ ثم اعيد اذابته بالماء المقطر ثم التبخير حتى الجفاف ثم ذوب الكارنوسين المتحلل بالماء المقطر 0.1 مللتر ورحل بورق الكروماتوغرافيا رقم 3 كما رحلت معه الحوامض الامينية القياسية بيتا- الانين والهستدين باستعمال خليط المذيبات المذكور اعلاه وذلك لاعطاء مؤشر تأكيدي اخر لهوية الكارنوسين وفقاً لما قام به Crush (11) كما استعملت اطوال موجية مختلفة لايجاد أعلى امتصاص ضوئي للكارنوسين ضمن مدى من الاشعة فوق البنفسجية تراوحت بين (200-400) نانومتر باستعمال المطياف الضوئي Spectrophotometer ، اذ ذوب 5 ملغم من الكارنوسين في 5مللتر ماء مقطر ثم قيست الامتصاصية بالاطوال الموجية المذكورة. كما أستعملت تقنية HPLC لتشخيص الكارنوسين والكارنوسين المتحلل بحامض الهيدروكلوريك 6 عياري والحامضين الامينين بيتا – الانين والهستدين لغرض المقارنة مع الكارنوسين المتحلل ، وقد تم كما ذكره O'Dowd واخرون (16) بخلط 20مايكروغرام من النماذج المذكورة اعلاه كل على انفراد مع 20مايكروليتر من كاشف(OPA) Orthopthaldehyre المحضر من (50ملغم من مادة OPAمع 50 ملغم من المركبتوايثانول مذوبة في 1.5 مللتر من الايثانول ثم اضيف له بورات البوتاسيوم 0.4مولار للوصول الى الرقم الهيدروجيني 9.4 وازيلت منه فقاعات الهواء باستعمال حمام الامواج فوق الصوتية)و50مايكروليتر من محلول الفوسفات الدارىء بتركيز 0.01 مولار. وبعد المزج الجيد حقن في جهاز HPLC موديل LC-10ATVP-Shimadzu اذ فصل الكارنوسين على عمود Octadecyl silica (ODS) بابعاد (4.6 ×250) ملم بمعدل جريان 1مللتر /دقيقة للطور المتحرك(دارىء الفوسفات بتركيز 0.01 مولار مع الميثانول بنسبة 60:40) وقيست الامتصاصية بطول موجي 380 نانومتر.

النتائج والمناقشة

أظهرت نتائج تنقية الكارنوسين من المستخلص المائي لعضلة صدر الدجاج باستعمال المبادل الايوني CM-cellulose ظهور قمم عديدة في مرحلة الاسترداد كما موضحة في الشكل (1) عند قياس الامتصاصية على طول موجي 570 نانومتر للاجزاء المفصولة باستخدام محلول النهايدرين.وعند قياس الامتصاصية بطول موجي 500 نانومتر باستعمال محلول Diazo والذي استخدم للكشف عن مجاميع الاميدازول في المركبات اذاعطى لون برتقالي – محمر مع زيادة التركيز (9)،لوحظ ظهور قمتين تمثلت بالاجزاء المستردة (50-63) و (74-100) على التوالي.عدت القمة الاولى ممثلة للهستدين وذلك بعد التاكد من خلال امرار هستدين قياسي بتركيز 10ملغم على المبادل الايوني ولوحظ نزولة في القمة الاولى ،اما القمة الثانية فللكارنوسين وذلك لان قيمة Pka للكارنوسين هي 7.01 بينما الهستدين 6.2 (4) أي ان الكارنوسين اكثر قاعدية من الهستدين ، لذا من المتوقع ان يكون استرداد الهستدين اسرع من الكارنوسين . بالنسبة للحوامض الامينية والببتيدات المتعادلة والحاملة للشحنه السالبة فانها تنزل بمحلول الغسل .والحوامض الامينية والببتيدات القاعدية الشحنه المرتبطه بلعمود فانها تسترد بلاعتماد على قيم Pka الخاصة بها، الا ان مايتفاعل مع كاشف Diazo هو فقط المركبات الحاوية على مجموعة الاميدازول وعليه جمعت اجزاء القمة الثانية الممثلة للكارنوسين وهي الاجزاء (74-100) وجففت .وقد كانت كمية الكارنوسين المحصل عليها بعد التنقية والتجفيد بحدود 100ملغم لكل 100غم من وزن عضلة صدر الدجاج .بينما وجد (8) ان عضلة الدجاج تحتوي على 400 ملغم كارنوسين لكل 100غم من وزن العضلة .وذكر Boldyrev و Johnson(5) ان محتوى الكارنوسين يصل الى 280 ملغم لكل 100غم من وزن عضلة صدر الدجاج ، واشار Chun wu وزملاؤه (10) الى ان محتوى الكارنوسين من خلاصة الدجاج هي بحدود (94± 35) ملغم لكل 100غم

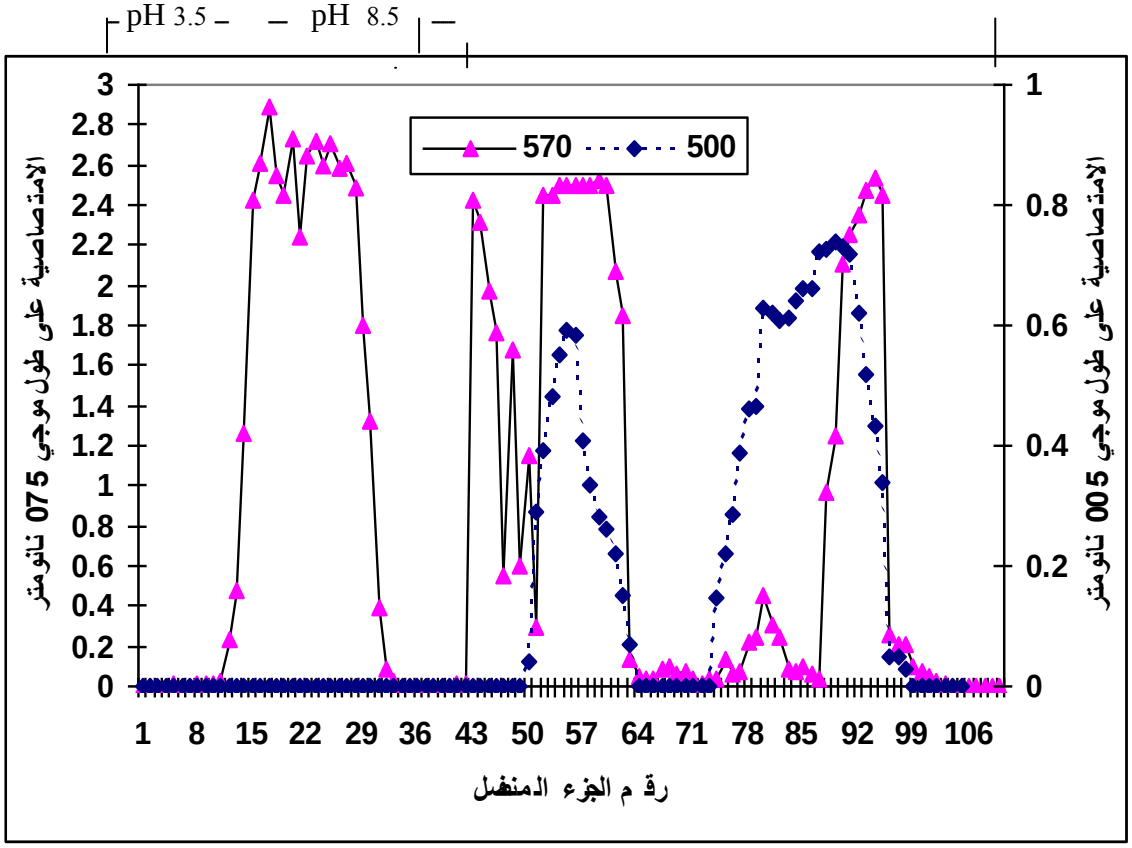
من عضلة الدجاج ، وقد يعتمد ذلك على صنف الدجاج وبيئته ووزنه وعمره وغيرها من عوامل فردية اخرى. .

اظهرت نتائج تشخيص الكارنوسين بتقنية كروماتوكرافيا الورق باستخدام خليط المذيبات (ايثانول :حامض الخليك : الماء)الموضحة بالشكل (2- أ) ان الكارنوسين كان بدرجة عالية من النقاوة وان قيمة Rf×100 له كانت 20.4 وهي مقاربة لما ذكره Kalyankar و Meister (14) من ان قيمة Rf × 100 للكارنوسين هي بحدود 21 عند استخدامه نفس ظروف الفصل .علما ان قيمة Rf تتأثر بالعديد من العوامل منها درجة الحرارة (17) .

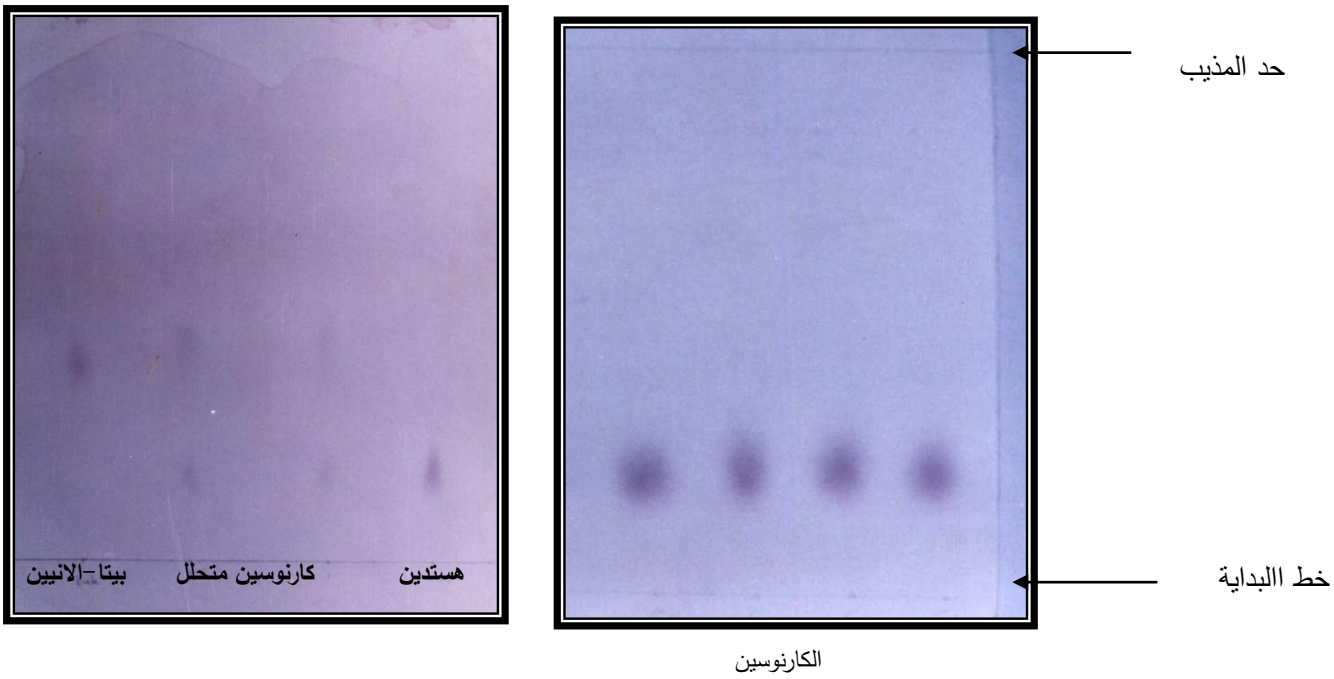
عند تحليل بقعة الكارنوسين المستردة من الورق الى مكوناتها من الحوامض الامينية بالمعاملة بحامض الهيدروكلوريك (6)عياري ثم ترحيلها بكروماتوكرافيا الورق مع الحوامض الامينية القياسية المكونة للكارنوسين لوحظ ظهور بقعتين لهما قيم Rf × 100 لاتختلف كثيرا عن قيمة Rf×100 للحامضين الامينين الهستدين وبيتا الانين القياسية شكل (2 – ب) فقد بلغت قيمة

Rf×100 للهستدين القياسي والمتحلل 17.9 و16.7 على التوالي ، بينما قيمة Rf×100 للبيتا الانين القياسي والمتحلل فكانت بحدود 37.7 و 40.1 على التوالي .وقد ذكر Smith و Jepson (17) من ان البيتيد المتحلل تحت تاثير المعاملة الحامضية مدة ساعة ينتج منه حوامض امينية حرة تختلف قليلاً بقيمة Rf عن الحوامض الامينية الاصلية.

لقدأظهر التشخيص الطيفي باستخدام الاشعة فوق البنفسجية (شكل3) ظهور قمة واحدة عند الطول الموجي (212) نا نومتر ، اذ ان اعلى امتصاصية للكارنوسين كانت عند الطول الموجي المذكور وهذا يتطابق مع ماتوصل اليه Huang و Kuo (13) واللذان ذكرا بان أعلى امتصاصية للكارنوسين هي عند الطول الموجي 212 نانومتر. وتعد هذه الطريقة من الطرائق المستخدمة في تحديد نقاوة المحاليل احادية المذاب وتشخيص المذاب من خلال تثبيت الطول الموجي الامثل لامتصاصه . كما ظهرت قمة واحدة للكارنوسين عند تشخيصه بكروماتوكرافيا السائل عالي الكفاءة شكل (4 – أ) اذ ظهرت قمة بوقت احتجاز بلغ (6.4) دقيقة. وعند تحليل الكارنوسين بحامض الهيدروكلوريك (6)عياري الى مكوناتة من الحوامض الامينية ثم فصلها بجهاز HPLC شكل (4- ب) فقد لوحظ ظهور قمتين بوقت احتجاز 3.435 و 4.423 دقيقة على التوالي .وقد تقاربت هذه القيم مع وقت احتجاز الحوامض الامينية القياسية بيتا الانين والهستدين والبالغة 3.525 و 4.503 دقيقة على التوالي .وبناء على ماذكر فأن الطرائق الثلاثة المستخدمة في تشخيص الكارنوسين أثبتت كفاية عملية التنقية بالمبادل الايوني (CMC) في الحصول على الكارنوسين بنقاوة عالية .



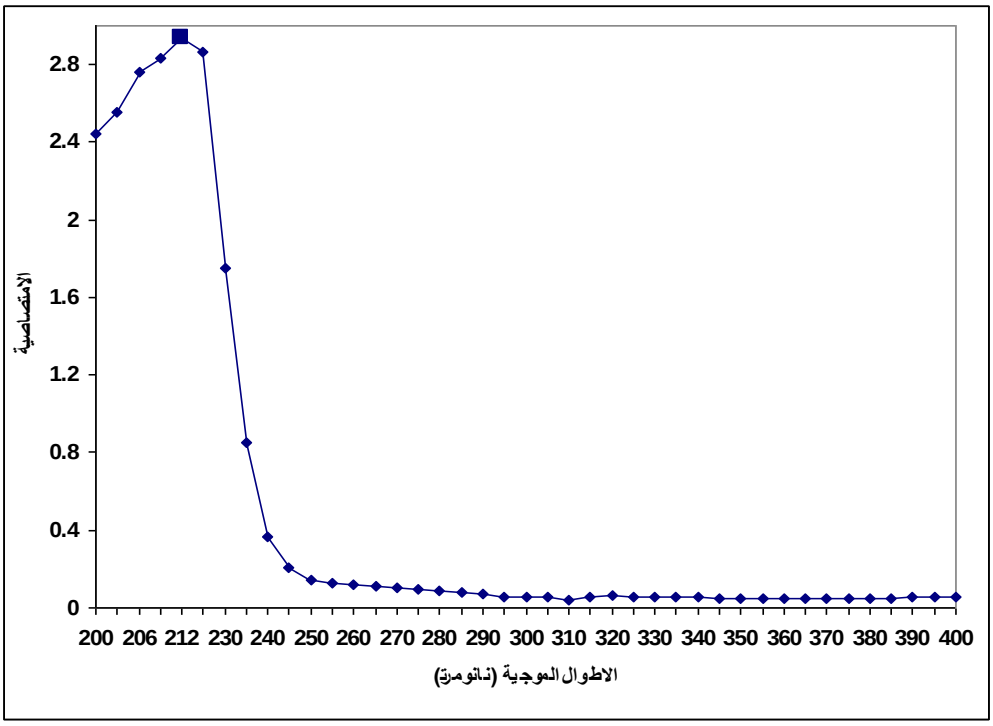
شكل1. تنقية الكارنوسين من صدر الدجاج بأستخدام كروماتوغرافيا التبادل الايوني الموجب باستخدام المبادل الايوني CM-cellulose بابعاد (2×35) سم ، تمت الموازنة بمحلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 1 ملي مولار وبرقم هيدروجيني 3.5 ، استرد الكارنوسين بالمحلول الدارئ نفسه بتركيز 10 ملي مولار وبرقم هيدروجيني 8.5 بسرعة جريان 60 مللتر/ساعة بواقع 8 مللتر للجزء الواحد.



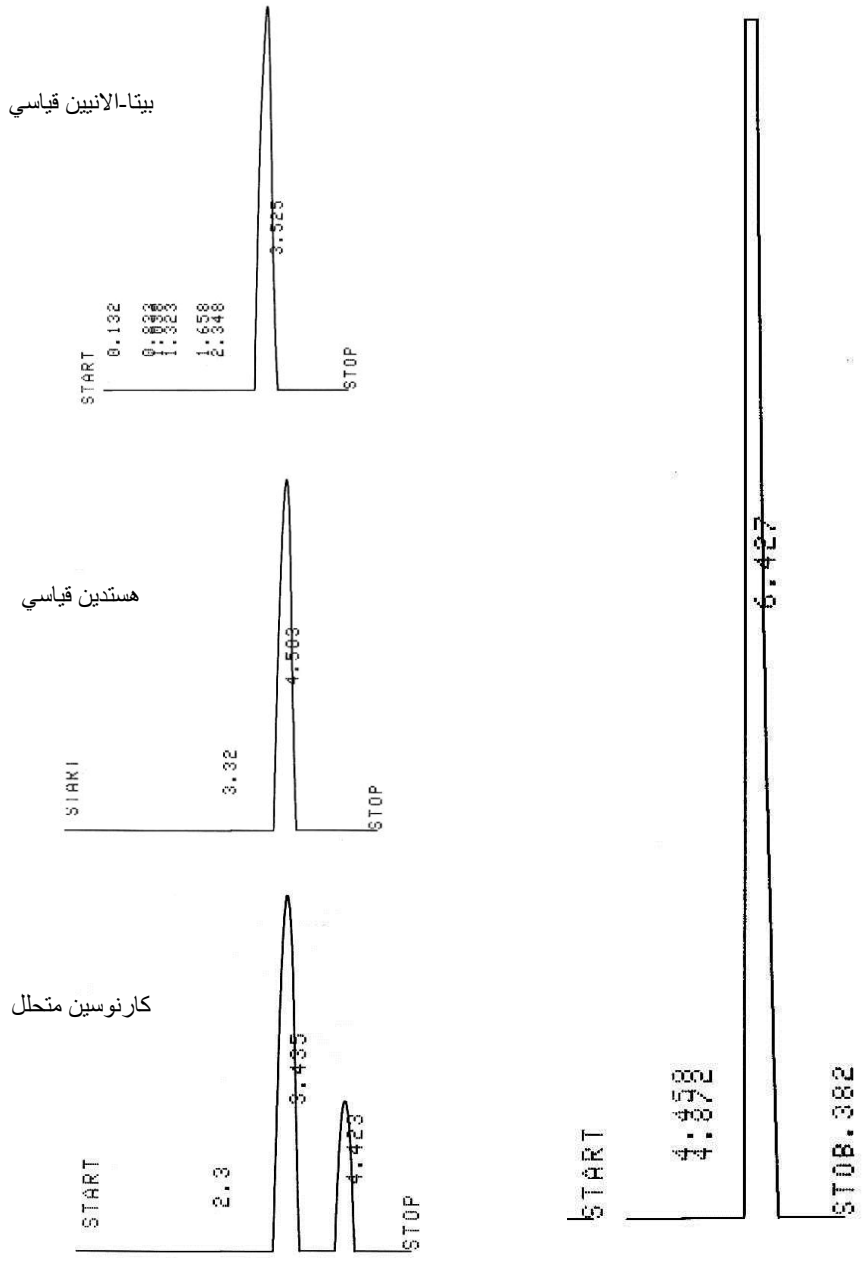
شكل2. تشخيص الكارنوسين والكشف عن نقاوته و الكشف عن الحوامض الامينية المكونة له بطريقة كروماتوغرافيا الورق (P.C) باستخدام خليط المذيبات(كحول اثيلي :حامض الخليك :ماء مقطر) بنسبة (78:5:17) :

أ.الكارنوسين المنقى من صدر الدجاج

ب.الحوامض الامينية بعد اجراء تحليل له بحامض الهيدروكلوريك 6 عياري ومقارنتها بحوامض امينية قياسية.



شكل 3. التشخيص الطيفي للكارنوسين باستخدام أطوال موجية مختلفة لتحديد الطول الموجي الامثل للكارنوسين المعزول من صدر الدجاج



(ب) (أ)

شكل 4. تشخيص الكارنوسين المنقى بالتبادل الايوني (CMC)باستخدام كروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة HPLC بأستخدام عمود Octadecyl silica (ODS) بابعاد (4.6 ×250) ملم بمعدل جريان 1مللتر /دقيقة باستخدام الطور المتحرك(دارىء الفوسفات بتركيز 0.01 مولار مع الميثانول بنسبة 60:40) وقيست الامتصاصية بطول موجي 380 نانومتر.

أ. الكارنوسين المنقى بالتبادل الايوني

ب. الحوامض الامينية المكونة للكارنوسين المتحلل بحامض الهيدروكلوريك 6 عياري،والحامضين الامينين القياسيين بيتا-الانين والهستدين

المصادر

1. العـواد ، قاسـم حسـن1977. دراسـة تـأثير فتـرة الانضـاج علـى المكونـات البروتينيـة ونوعيـة جـبن الجـدر المصـنع مـن حليـب الجـاموس. رسـالة ماجستير،قسـم الصناعات الغذائية ، كلية الزراعة ،جامعة بغداد، 29-30.

2. Boldyrev, A. A. and, S. Severin 1990. The histidine- containing dipeptides carnosine and anserine: distribution, properties and biological significance. Adv.Enzymes Regul., 30:175-193.

3. Boldyrev, A. A. 2000. Problems and perspective in studing The biological role of carnosine. Biochemistry (Moscow). 65 (7): 751-756.

4. Boldyrev, A. A. 2001. Histidine containing dipeptides in excitable tissues, Moscow.

5. Boldyrev, A. A. and P. Johnson. 2002. Carnosine and related compounds: Antioxidant dipeptides. Reserch signpost kerala, India,101-113.

6. Carisano, A. 1967. Gas chromatographic determination of β-alanyl histidine dipeptides in soup preparations. J. Chromatog. 27: 259-263.

7. Carnegie, P. R., K. P. Hee, and A.W. Bell. 1982. Ophidine (B-alanyl-L-3-methylhistidine, "Balenine") and other histidine dipeptides in pig muscles and tinned Hams. J. Sci. Food. Agric. 33: 795-801.

8. Chan, K. M.; E. A. Decker, and W. J. Means. 1993. Extraction and activity of carnosine, a naturally occurring antioxidant in beef muscle. J. Food. Sci. 58(1): 1

9. Charles, J. and J. V. Parker. 1966. Spectrophotometric determination of carnosine and anserine in muscle. Analytical Chemistry, 38(10): 1359-1362.

10. Chun Wu, H., B. Sun pan, C. Chang, and C. Yuan Shiau. 2005. Low-molecular weight peptides as related to antioxidant properties of chicken essence. J. of Food and Drug Analysis, 13(2): 176-183.

11. Crush, K. G. 1970 Review article: Carnosine and related substance in animal tissues. Comp. Biochem. Physiol. 34: 3-30.

12. Harding, J.W. and J. O' fallon. 1979. The subcellular distribution of carnosine, carnosine synthetase, and carnosinase in mouse olfactory tissues .Brain Research, 173:99-109.

13. Huang, S. and J. C. Kuo. 2000. Concentrations and antioxidative activity of anserine and carnosine in poultry meat extracts treated with demineralization and papain. Proc. Natl. Sci. Counc. Roc (B). 24 (4): 193-201.

14. Kalyankar, G. D. and A. Meister. 1971. Carnosine synthetase (chick muscle). Methods Enzymol. 17: 102-105.

15. Macpherson, H. T. 1942. Modifid procedure for the colorimetric estimation of arginine and Histidine. Biochem.J. 36: 59-63.

16. O'Dowd, J. J, D. J. Robins, and D. J. Miller. 1988. Detection characterization, and quantification of carnosine and other histidyl derivatives in cardiac and skeletal muscle. Biochem. Biophys.Acta, 967:241-249.

17. Smith, I. and, J. B.Jepson. 1960. The Investigation of New Compounds. pp. 534. In Smith, I. 1960. Chromatographic and Electrophoretic Techniques. Vol. I Great Britain , Pitman Press,

18. Tolonen, M. 2003. L-carnosine. The super peptide. www.biovita.fi/ english / terveyssivut/carnosine-ref.html

19. Wolos, A., K. Piekarska, and T. Pilecka, 1983. A new rapid method for determination of anserine and carnosine in muscles. Comp. Biochem. Physiol. 74B (3): 623-626.