فصل وتشخيص الصبغات في مخلفات الطماطة*

عبد المجيد حماد السامرائي[1] نهله طارق الشيخلي[1] سعود رشيد العاني[2]

(1) كلية الزراعة / قسم علوم الأغذية والتقانات الأحيائية .

(2) وزارة العلوم والتكنولوجيا .

الخلاصة :

أستخدم نظامان من المذيبات لأستخلاص الكاروتينويدات من مخلفات الطماطة الجافة . تكوّن النظام الأول من أستيون والايثر النفطي (درجة غليانه 40 – 60 مْ) ، حيث استعمل الاسيتون اولا ثم بعد عزله عن المخلفات استخدم الايثر النفطي لاستخلاص الصبغات منه ، وتكوّن النظام الثاني من خليط من أسيتون : هكسان : كحول أثيلي (1 : 2 : 1) ، ثم شخصت أنواع الكاروتينويدات بواسطة تقنية كروماتوغرافي السائل عالي الأداء (HPLC) فأمكن التعرف على 17 مركباً ، كان أبرزها صبغة الطماطة الرئيسة (اللايكوبين) ،وقد أظهر النظام الثاني كفاءة أعلى من الأول في أستخلاصها (80.9 % مقارنة بـ 39.6 % على التوالي) ، وعلل سبب الأنخفاض عند أستخدام النظام الأول الى حدوث أكسدة لنصف اللايكوبين تقريباً مكوناً مركب Lycopene diepoxide الذي ظهر بنسبة 37.7 % ، كما أستخلص النظام الثاني صبغة البيتاكاروتين بكفاءة فكانت نسبتها 2.5 % ، ولم يحدث لها أكسدة مقارنة بالنظام الأول الذي ظهر فيه نسبة البيتا كاروتين 1.7% مع 1.8 % β – carotene diepoxide . وعلى العكس من ذلك كان النظام الأول أفضل من الثاني في أستخلاص أحد الزانثوفيلات وهو Lycoxanthin اذ بلغت نسبته 8 و 2.1 % للنظامين على التوالي . كما ظهرت المجانسات من نوع cis ولا سيما cis – lycopen – 1 بنسب6.6 و 9.6% عند الأستخلاص بالنظامين على التوالي ، وقد يعود ظهورها إلى التعرض للضوء بوجود الأوكسجين.

Separation and identification of pigments in tomato residue

Abdulmajeeed H. Al – samarraie[1], Nahla, T. Al – sheekly[1] , Saoud R. Al – aini[2]

(1) College of Agriculture / Dept of food sci. and biotech.

(2) Ministry of Sciences and Technology .

Abstract

Carotenoids of dry tomato residues were extracted by two systems of solvent namely acetone - petroleum ether (b . p. 40 – 60 °C)(System 1) and acetone – hexane – ethanol (1 : 2 : 1) (System 2) . The pigments in extracts were identified by HPLC technique . From the 17 pigments identified , lycopene was the major .

System 2 gave higher percentage of lycopene (80.9 %) as compared with system 1 which gave 39.6 % . Formation of 37.7% of lycopene diepoxide might be the reason for the reduced percentage of lycopene when System 1 was used . β – Carotene was extracted effeceintly (2.51%) by system 2 , while the percentage decreased to 1.7% when using System 1 due to oxidation which produse 1.8% of β – Carotene diepoxide. On the contrary Lycoxanthin was efficiently extracted by system 1 (8%) rather than system 2 (2.1%) . Cis – isomers , mainly Cis – Lycopen – 1 was extracted by both

systems (6.6 and 9.6% respectively). The appearance of these isomers may be due to exposure to light with oxygen .

*بحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الثاني

المقدمة

يعود العديد من الملونات الغذائية بصورة عامة الى احد المجاميع الرئيسة الثلاث : الطبيعية والاصطناعية والصبغات الناتجة عن التفاعلات الكيمياوية وقد عرفت الصبغات الطبيعية المستخلصة من أصل نباتي منذ زمن بعيد كصبغة الانديجو الزرقاء المستخلصة من أوراق نبات الانديجو(13).

كما استخدمت الكاروتينات والكلوروفيلات والمواد الملونة في الشوندر وصبغة الاناتو ومستخلص قشرة العنب والفلفل الاحمر والزعفران (1).

أكدت الدراسات الحديثة على ضرورة استخدام المصادر الطبيعية للحصول على الملونات الغذائية وذلك لتفادي المخاطر الناجمة عن التأثيرات السلبية للملونات الاصطناعية على صحة الانسان ، فضلا عن ان الملونات الطبيعية تمتلك خواص حيوية تجعلها ذات قيمة غذائية هامة، فالكاروتين مادة اولية لتكوين فيتامينA . والكاروتينويدات عموما ذات قدرة كبيرة على منع الاكسدة لما تحتويه جزيئاتها على عدد كبير من الاواصر المزدوجة لا سيما صبغة اللايكوبين يليه الالفا كاروتين والبيتا كاروتين (4)، وبذلك تمنع تأثير الاكسدة على نكهة الغذاء ولونه (11) ، كما تكون مانعات اكسدة في انظمة جسم الانسان مما يساعد في الوقاية من الاصابة ببعض حالات السرطان (17) و(10) ، ومنع اكسدة الكولسترول السئ (البروتين الدهني منخفض الكثافة LDL) فيقلل من خطر امراض القلب (18) وغير ذلك من الفوائد. تعد الطماطة ومنتجاتها الغنية باللايكوبين اكثر قابلية على منع هذه الامراض(17) ، وعليه قامت بعض شركات الادوية بتلوين بعض منتجاتها الدوائية بالكاروتينويدات ، اما اللايكوبين فأنتج كمستحضر بشكل كبسولات مثل المنتوج التجاري المسمى Lycovit 10% الذي يحتوي على 11.45% لايكوبين (9) ، ولكن انتاج هذه المواد مكلفة احيانا اذا تم الاعتماد على الاثمار نفسها ، ولذا جاءت الدراسة لاستغلال قشور الطماطة التي ترمى كنفايات وبكميات هائلة من مصانع معجون الطماطة في انتاج بعض انواع الكاروتينويدات من هذه القشور عموما واللاكوبين ومشتقاته خصوصا و استخدمت طريقتان للاستخلاص ثم تقنية دقيقة في فصل وتشخيص المركبات الكاروتينويدية وهي كروماتوغرافي السائل عالي الاداء (HPLC) .

المواد وطرائق العمل

أستخدمت طريقتان لأستخلاص الكاروتينويدات هما :-

1 – طريقة Ranganna (1977) : مزج بواسطة الهزاز الدوامي 1 غم من قشور الطماطة الجافة مع 250 مل أسيتون على دفعات إلى أن أصبحت القشور عديمة اللون . وجمع المستخلص في قمع فصل يحتوي على 10 مل من الأيثر النفطي(درجة غليانه 40-60°م) . وأضيف له محلول مائي5% من كبريتات الصوديوم اللامائية بشكل قطرات مع التحريك لحين إنفصاله إلى طبقتين . بعد فصل طبقة الأسيتون السفلية أعيد غسلها بالأيثر النفطي أكثر من مرة حتى أصبح الأسيتون عديم اللون وكانت الكمية الكلية اللازمة من الأيثر أقل من 250 مل ، ومع ذلك أستخدمت كمية إضافية منه لتصبح 250 مل . جفف المحلول بالمبخر الدوار ، وإذيب بكمية معينة من الأسيتون لتشخيص مركباته بجهاز HPLC .

2 – طريقة Thompson وآخرون (2000) : مزج بواسطة الهزاز الدوامي 1 غم من قشور الطماطة المجففة مع خليط مكون من (أستيون : هكسان : كحول الأثيل) بنسبة 1:2:1 لمدة 10 دقائق ثم أضيف 1.5 مل ماء مع الخلط قبل سحب الطبقة العلوية المحتوية على الصبغات . أعيدت عملية الأستخلاص على القشور نفسها حتى أصبحت القشور عديمة اللون جفف المحلول وإذيب بالأسيتون لتشخيص مركباته بالـ HPLC وكانت ظروف تشغيل الجهاز هي: عمود 4.6 mm end-capped Neucleosil 100,5µM,250 وقرئ الامتصاص الضوئي على طول موجي 470nm وسرعة جريان المذيبات 1مل/ دقيقة . (6)

النتائج والمناقشة

يبين الشكل (1) و (2) مخططات فصل الصبغات الكاروتينويدية لمخلفات الطماطة بتقنية HPLC بعد أستخلاصها بنظامين من المذيبات العضوية هما الأسيتون والأيثر النفطي (النظام الأول) وخليط الأسيتون : هكسان : كحول الأثيل (النظام الثاني) ، ويبين الجدول (1) أسماء 17 مركباً أمكن تشخيصها من بين 51 مركباً بمقارنتها بمركبات قياسية من خلال أوقات الأحتجاز (Retention time) وخواص طيف الأمتصاص لكل مركب منها.

يتضح من الجدول (1) أن النظام الثاني كان على العموم أكثر قدرة من النظام الأول على أستخلاص الكاروتينويدات من قشور الطماطة إذ أعطى أعلى مجموع لنسب صبغات اللايكوبين شملت (Lycopene ، Lycopene mono epoxide ، Lycopene diepoxide ، Cis – Lycopene – 1 ، Cis – Lycopene – 2) إذ بلغ المجموع 91.8 % مقارنة بـ 84.6 للخليط الأول .

كان النظام الثاني أكثر قدرة أيضاً في أستخلاص مركب Cis – lycopene – 1 إذ بلغت نسبته 9.6% مقارنة بـ 6.6 % للخليط الاول. الا ان النظام الاول تمكن من استخلاص مركبLycopene diepoxide بكفاءة عالية ليظهر بنسبة 37.7 % مقارنة بـ 0.6 % عند أستخدام النظام الثاني . أن ظهور المركب الاخير عند أستخدام النظام الأول بهذه النسبة العالية قد يعود إلى ملائمة النظام تحت ظروف التجربة لأستخلاص هذا المركب من الأنسجة ، أو يعود إلى أن هذا النظام وبوجود الأوكسجين كان سببا لاكسدة قسم من اللايكوبين وتحويله إلى هذا المركب أثناء عمليات الأستخلاص ، أي أن النظام الأول لم يوفر حماية للايكوبين من وصول الأوكسجين إليه . ومما يؤكد حدوث عملية الأكسدة للصبغات هو ظهور مركب β – carotene diepoxide عند أستخدام النظام الأول (16) .

إن أفضل مذيب لأستخلاص الكاروتينات ولا سيما البيتاكاروتين هو النظام الثاني حيث كانت النسبة المستخلصة 2.5 % في حين كانت نسبته بالنظام الأول 1.8 % ولكن المذيب الأول كان أكفأ في أستخلاص β – carotene diepoxide اذ كانت نسبته 1.7 % مقارنة بـ 0.03 % للخليط الثاني .

أما الزانثوفيلات فقد فصل منها تسعة أنواع كانت تراكيزها ضئيلة ماعدا مركب Lycoxanthin إذ بلغت نسبته المستخلصة بالنظامين على التوالي 8 و 2.1 % في حين كانت بقية الزانثوفيلات تتراوح بين 0.02 و 0.7 % .

أن ظهور المجانسات من نوع Cis – carotenoids يعد مؤشراً على تعرض المادة الغذائية إلى الضوء والأوكسجين (4) و(5) و(11) .

يظهر من الجدول (1) أيضاً خواص طيف الأمتصاص ممثلاً بالأطوال الموجية التي أعطت قيم أمتصاص عالية لكل مركب . يوضح الشكل (3) كيفية إيجاد تلك الأطوال الموجية للايكوبين وألـ Cis – Lycopen كمثال ، وبذلك أمكن التعرف على نوع كل مركب فضلاً عن الأعتماد على مدة أحتجازه (Retention time) في عمود ألـ HPLC .

أن وجود نسبة مرتفعة من صبغات اللايكوبين في قشور الطماطة هي قريبة من تلك النسبة المدونة لهذه الصبغات في ثمار الطماطة التي حصل عليها بعض الباحثين مثل (7) و (3) .

مما سبق نستنتج أن خليط الأسيتون : الهكسان : الكحول الأثيلي (1 : 2 : 1) لديه قدرة عالية على أستخلاص الكاروتينويدات بشكل عام واللايكوبين– وهي صبغة الطماطة الرئيسة – بشكل خاص وهو ما يتطابق مع ما وجدته (2) و(15) ان اهم الكاروتينات التي ظهرت بتراكيز عالية بفضل هذا النظام من المذيبات هي اللايكوبين والبيتاكاروتين وكانت نسبة اللايكوبين المستخلصة تزيد عن 80 % من الكاروتينويدات الكلية المشخصة . هذا فضلاً عن أن المذيبات المستخدمة في النظام الثاني أقل سمية من أنواع أخرى من المذيبات مثل رابع كلوريد الكاربون والكحول المثيلي وثنائي كلوروميثان .....ألخ التي أستخدمها باحثون أخرون (12) و (8) و(3) ويعد مذيب الهكسان حتى التجاري منه خالياً من عوامل الأكسدة والجناس Isomerization.

،

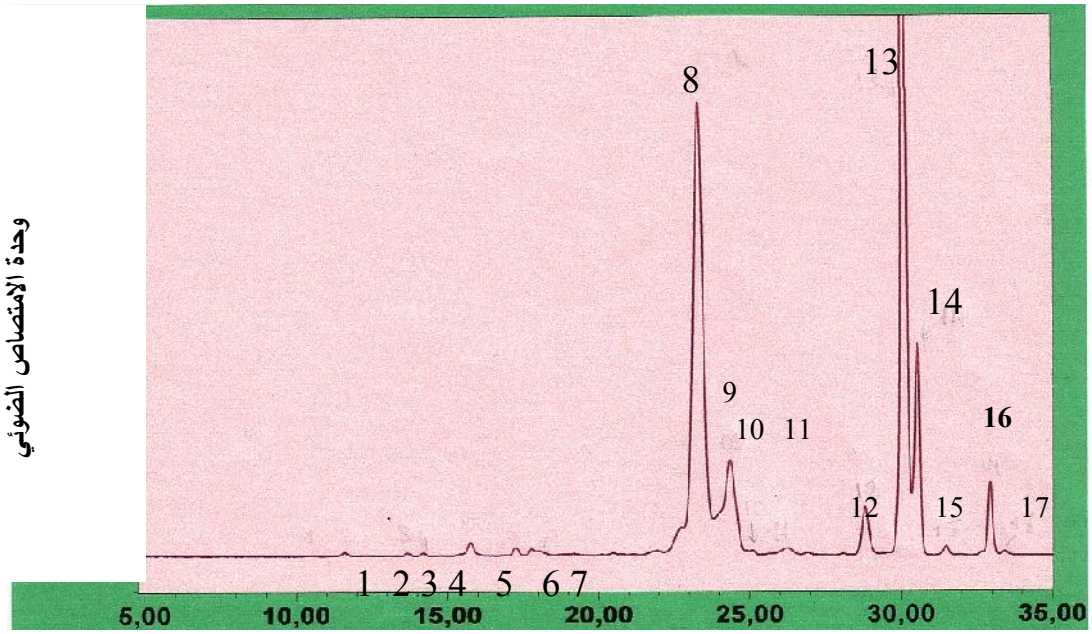
الجدول (1) نسب الكاروتينويدات المفصولة بتقنية كروماتوغرافي السائل عالي الاداء HPLC لمستخلص صبغات قشور الطماطة الخام بنظامين من المذيبات*

ت	الكاروتينويدات	النظام الاول**	النظام الثاني* **	
		النسبة المئوية	النسبة المئوية	الاطوال الموجية في نظام مذيب الفصل
.1	Neoxanthin	0.02	0.1	415،436،464
.2	Cis-neoxanthin	0.1	0.1	356،412،432،462
.3	Violaxanthin epoxide	0.1	0.1	416،442،466
.4	Violaxanthin	0.1	0.1	468،442،418
.5	Zeaxanthin	3.0	0.4	266.3، 445.5 ، 474.6
.6	Neolutein	0.2	0.4	474،449،424،348
.7	Cryptoxanthin	0.4	0.7	449.1,475.8 ،274.6,334
.8	Lycopene diepoxide	37.7	0.6	431,454,491
.9	Lycoxanthin	8.0	2.1	490.3 ،349.5,460
.10	Cis-lycoxanthin	1.0	0.3	485.5 ،349.5,458.8
.11	Lycopene monoepoxide	4.0	0.1	501.2,472.1,360.8
.12	B-carotene diepoxide	7.1	0.03	472.1,443.1
.13	Lycopene	39.6	80.9	504.9,474.6,361.8
.14	Cis-lycopene-1	6.6	9.6	498.8,468.5,443.1,361.8
.15	Cis-lycopene-2	3.0	0.6	496.4,464.9,440.7,360.8
16	B-carotene	1.8	2.5	480.6,452.8,279.3
.17	Cis-B-carotene	1.0	0.1	348،420،448،478
مجموع نسب صبغات اللايكوبين		84.6	91.8	

* هي نسبة كل مركب بين المركبات

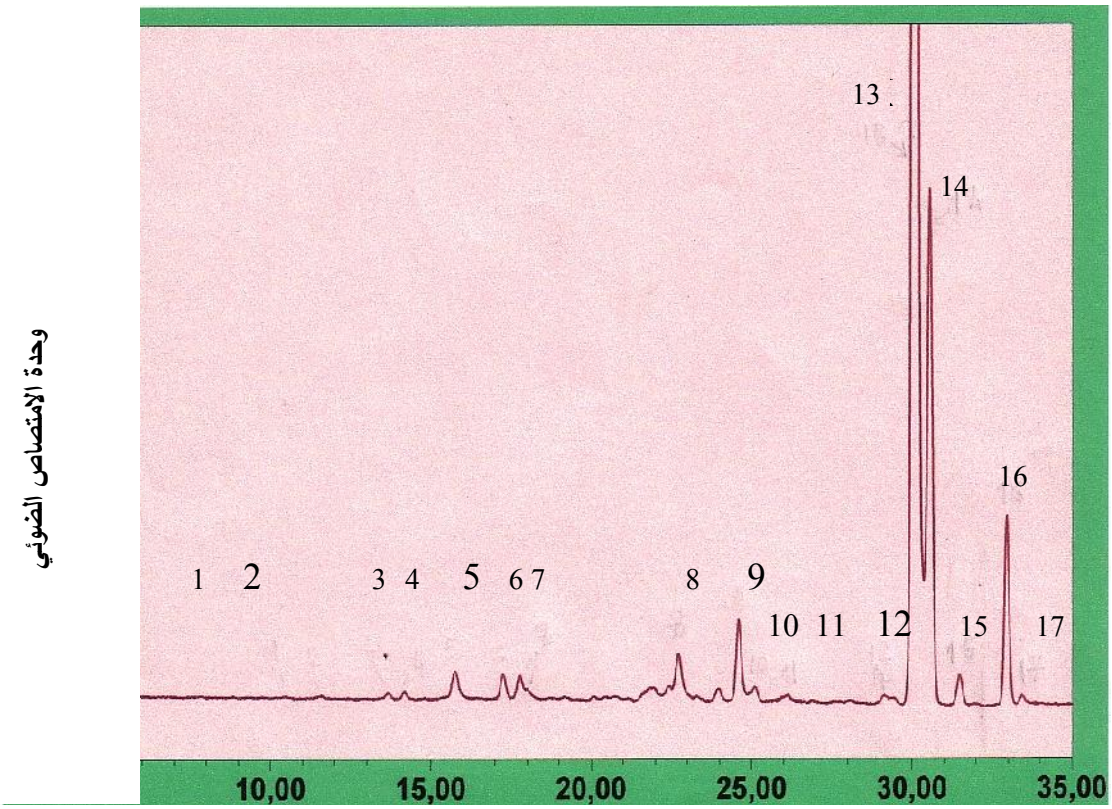
* * اسيتون ثم ايثر نفطي (درجة غليانه 40-60)

*** اسيتون : هكسان : كحول اثيلي (1:2:1)



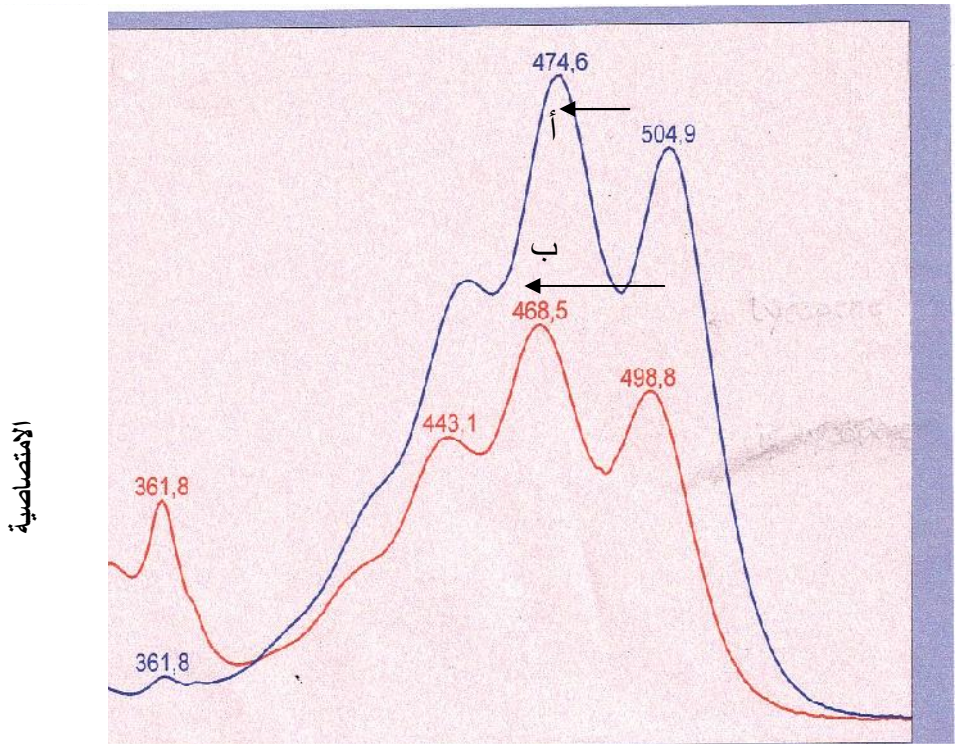
شكل (1) تحليل الكروماتوغرافي السائل عالي الاداء HPLC للمركبات الكاروتينويدية المستخلصة من قشور الطماطة بالنظام الأول(اسيتون ثم كحول نفطي درجة غليانه (40-60)) والمفصولة على عمود الطور المعكوس مع طور متحرك بنظام المذيب المتدرج (gradient)، نوع العمود 4.6 mm × End-capped Neucleosil 100,5µM,250 على طول موجي nm470 ، سرعة الجريان 1مل/ دقيقة .

المركبات من 1 إلى 17 كما مذكورة في الجدول رقم (1)



شكل (2) تحليل الكروماتوغرافي السائل عالي الاداءHPLC للمركبات الكاروتينويدية المستخلصة من قشور الطماطة بالنظام الثاني(اسيتون : هكسان : كحول اثيلي–1:2:1) والمفصولة على عمود الطور المعكوس مع طور متحرك بنظام المذيب المتدرج (gradient)، نوع العمود End-capped Nucleosil 100,5µM,250 × 4.6 mm على طول موجي 470 nm ، سرعة الجريان 1مل/دقيقة .

المركبات من 1 إلى 17 كما مذكورة في الجدول رقم (1)



شكل (3) الاطوال الموجية لأعلى إمتصاص ضوئي لبعض الكاروتينويدات المستخلصة من قشور الطماطة بعد فصلها بتقنية كروماتوغرافي السائل عالي الاداء (HPLC) في مذيبات الطور المتحرك

(أ) Lycopene ،

(ب) cis-Lycopene-1

المصـــادر

1. البلداوي ، عامرة محمد ، إستخلاص ودراسة صفات ثلاثة بدائل محلية للمواد الملونة في الصناعات الغذائية. مجلة العلوم الزراعية العراقية (1993) المجلد (24)- العدد(2)

2 . حسين، ديمة شاكر ، استخلاص صبغات الكاروتين من تفل البندورة واستخدامها كمادة ملونة للأغذية. رسالة ماجستير ، كلية الزراعة- الجامعة الأردنية (1996).

3 . Abushita, A.A.; Daood, H.G. and Biacs, P.A. , Change in carotenoids and antioxidant vitamins in tomato as a function of varietal and technological factors. J. Agric. Food Chem. (2000),48, 2075- 2081.

4. Anguelova, T. and Warthesen, J. , Degradation of lycopene,α- carotene and β-carotene during lipid peroxidation. Food chemistry and Toxicology (2000 a), 65: 71-75.

5. Anguelova, T. and Warthesen, J. , Lycopene stability in tomato powders. Food Chemistry and Toxicology (2000b) , 65:67-70.

6. Daood,H.G.;Biacs,P.A.andSamer,H. , High-Performance liquid chromatography of carotenoids from tomato products on conventional and base-deactivated AB reversed phase column. . In "Pigments in food, More than colors" L. Dufosse, ed. Universite de Brelagne Occidentale Quimper , (2004) , P. 315-317.

7. Daood, H.G.; Biacs, P.A.; Hoschke, A.; Harkay-Vinkler, M. and Hajdu, F. , Separation and identification of tomato Fruit pigments by TLC and HPLC. Acta Alimentaria , (1987) , 16(4): 339-350.

8 . Desio, F.; Servillo, L.; Loiuduce, R.; Laratta, B. and Castalda, D. , Achromatographic procedure for determination of carotenoids and chlorophylls in vegetable products.J. Acta Alimentaria, (2001) , 30: 395-405.

9 . Hoppe, P.P.; Kramer, K.; Berg, H.V.A.; Steenge, G.;Vliet, T.V. , Synthetic and tomato based lycopene have identical bioavailability in humans. Contributions to the 13th International carotenoid society symposiam Hawaii, USA. (2002) .

10 Liu, C.; Lian, F.; Smith, D.E.; Russell, R.M. and Wang, X.D., Lycopene supplementation inhibits lung squamous metaplasia and Induces apoptosis via up-regulating insulin- like growth factor- binding protein 3 in cigarette smoke-exposed ferrets. Cancer Research, (2003) , 63:3138-3144.

11 .Manzocco, L.; Calligaris, S. and Nicoli, M.C., Effect of the physical state on carotenoid oxidation in tomato derivatives. In "Pigments in Food, More Than Colours" L. Dufosse,ed. Universite de Brelagne Occidental Quimper. , (2004) , p. 130-132.

12 .Nguyen, M.L. and Schwartz, S.J., Lycopene stability during food processing. P.S.E.M., (1998) , 218: 101-105.

13 .Procter,J..Color in Plants and Flowers,Everset House Publishers.New York , (1978) .

14 .Ranganna, S. Plant Pigments , In "Manual of Analysis of Fruit and Vegetable Products". Tata Mc Graw – Hill, New Delhi. , (1977) , p.27-80.

15 .Thompson,K.A.; Marshall,M.R.; Sims,C.I.; Sargent ,S.A. and Scott,J.W., Cultivar, maturity, and heat treatment on lycopene content in tomatoes. Food Chemistry and Toxicology, (2000) , 65(5):791-795.

16 .Von Elbe, J.H. and Schwartz ,S.J.. Colorants. In"Food Chemistry" O.R.Fennema. ed. 3ed. Edition. Marcel Dekker, Inc. New York. Basel, (1996) , p.651-722.

17 .Weisburger ,J.H.. Lycopene and tomato products in health promation . Exp. Biol. Med., (2002) , 227:924-927

18 .Yokota ,T.; Ohlake, T.; Ishikawa ,H.; Inakuma ,T.; Ishignro,Y.; Terao, J.; Nagao , A. and Etoh , H.. Quenching of peroxynitrite by lycopene in vitro . Chemistry Letters, (2004) , 33(1):80-81