

تحضير مشتقات الكايتوسان الذائبة بالماء والنااتجة من تفاعلات ميلارد وتشخيصها بتقنية GC-MS واختبارها بوصفها مضادات للاكسدة

منير عبود جاسم الطائي و علي حسين عبد الكريم و عالية جميل علي السعد

قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، جامعة البصرة، العراق

المستخلص: تم تحضير الكايتوسان من الكايتين المستخلص من قشور الروبيان *Penaeus semisulcatus* بإزالة مجاميع الاستيل من الكايتين بالطريقة الكيميائية، وقد حضرت مشتقات الكايتوسان الذائبة بالماء بتفاعل الكايتوسان المحضر مع نوعين من السكريات المختزلة بوساطة تفاعلات ميلارد على درجة حرارة 121°م لمدة 1/4 ساعة بواسطة الاوتوكليف (جهاز التعقيم بالبخار)، وقد حملت مشتقات الكايتوسان الناتجة من التفاعل الرموز G t- (d ، M t-d) حيث t درجة حرارة التفاعل، و d زمن التفاعل واما الرموز (G و M) فتمثل سكر (الكلوكوز و المالتوز) على التوالي، وقد شخّصت المشتقات بوساطة جهاز GC-MS ، وقد بينت النتائج احتواء المشتق (كايتوسان-كلوكوز) المعامل على درجة حرارة 121°م لمدة 1/4 ساعة (G121-1/4) ساعة على 5 مركبات، فيما احتوى مشتق كاييتوسان- مالتوز (M121-1/4) ساعة على مركبين، وقد شخّصت الصيغة الجزيئية والوزن الجزيئي والنسبة المئوية لمساحتها وزمن الاحتجاز (دقيقة) لكل مركب من هذه المركبات. واختبرت قابلية المشتقات على تثبيط اكسدة حامض اللينوليك من خلال تقدير الفعالية المضادة للاكسدة التي بينت ارتفاع فعالية المشتق (G121-1/4) ساعة وبفروقات معنوية بلغت (85.80) %، في حين بلغت فعالية المشتق (M121-1/4) ساعة (80.30) %.

الكلمات الدالة: مشتقات الكايتوسان، تفاعلات ميلارد، كروموتوغرافي الغاز، مضادات الاكسدة.

المقدمة

(40) % لكي يصبح كاييتوسان [8]. ويُعد الكايتوسان مضاد اكسدة ومضاداً للحياة المجهرية وغير سام الا ان تطبيقاته في التصنيع الغذائي محدودة بسبب ذائبيته المحدودة فهو لا يذوب الا في المحاليل الحامضية الضعيفة المخففه عند pH اقل من 6، لذلك بذلت الكثير من الجهود لايجاد الطريقة المناسبة لتحويل الكايتوسان وتحضير منه مشتقات فعالة ذائبة في المحاليل المتعادلة والقاعدية وجعله متاحاً في مجال واسع من التطبيقات [9]. ومعظم هذه التحويلات يكون بإضافة مجاميع فعالة

يعد الكايتوسان من البوليمرات المستقيمة والمتكون من وحدات متشابهة ذات سلاسل مستقيمة من N-acetyl-D-glucosamine و D-glucosamine المرتبطة باصرة كلايكوسيدية نوع بيتا (1-4) β [4]، ويشق الكايتوسان من الكايتين بطرائق مختلفة ويختلف الكايتين عن الكيتوسان في درجة الذوبان ففي عملية إزالة مجاميع الاستيل (-CH₃CO) من N-acetyl D-glucosamin لتكوين D-glucosamine فان نسبة مجاميع الاستيل المزالة ليس اقل من 50-

إزالة المعادن والبروتين: وضع مسحوق قشور الروبيان في محلول 4 % HCl (حجم.حجم⁻¹) بنسبة 14:1 (وزن.حجم⁻¹) وعلى درجة حرارة الغرفة لمدة 24 ساعة بعدها غسل الراسب المتبقي بالماء المقطر [11] وأزيل البروتين بمعاملة الناتج من المرحلة الاولى مع محلول NaOH بتركيز 5% (وزن.حجم⁻¹) بنسبة 12:1 (وزن.حجم⁻¹) لمدة 24 ساعة ثم غسل الراسب عدة مرات لحين الوصول لمرحلة التعادل (pH7) وجففت العينة على درجة حرارة 45°م لمدة 20 ساعة لانتاج الكايتين [11].

3- إستخلاص الكايتوسان من الكايتين المحضر

حُضِر الكايتوسان من الكايتين حسب طريقة Kamil *et al.* [7] بإزالة مجاميع الاستلة Deacetylation من الكايتين وذلك بالمعاملة القاعدية للكايتين باستعمال 50% (وزن.حجم⁻¹) محلول NaOH بنسبة (10:1) (وزن.حجم⁻¹) على درجة حرارة 100°م لمدة 20 ساعة، غسل الناتج عدة مرات بالماء المقطر لحين الوصول الى pH7 ثم جفف على درجة حرارة 45°م لمدة 20 ساعة.

4- تحضير مشتقات الكايتوسان الذائبة بالماء

حُضِرَت مشتقات الكايتوسان الذائبة بالماء من الكايتوسان المحضر حسب طريقة Ying *et al.* [13] وذلك بتحويله بواسطة تفاعلات ميلارد فقد حُضِر 1% (وزن.حجم⁻¹) من محلول الكايتوسان في 0.2 مولاري حامض الخليك ، اضيف 1 غم من السكريات المختزلة المتمثلة بالكلوكوز (glucose) والفركتوز (fructose) الى محلول الكايتوسان كل سكر على حدة وخلطت على هزاز مغناطيسي لحين الذوبان وعولمت على درجة حرارة 121°م لمدة 1/4 ساعة باستعمال الاوتوكليف [3]. وبعد التفاعل مباشرة وضعت العينات في حمام ثلجي

للكايتوسان او مجاميع محبة للماء مثل السكريات بتكوين اواصر تساهمية مع المجاميع الامينية الفعالة او اضافة مركبات فعالة اخرى مثل cyclodextrins, dendrimers, crown ethers بتحويلات متعددة منها الكيميائية مثل تفاعلات ميلارد، millard reaction Quaternization N-Amination [5]، [5] Hydroxy alkylation لتحويل الكايتوسان الى مشتقاته الذائبة بالماء بواسطة تفاعلات ميلارد تتضمن تفاعل المجاميع الامينية والمجاميع الكربونيلية لمختلف الجزيئات والتي تتطلب الحرارة لانتاج مشتقات ذائبة بالماء وتفاعل ميلارد هو تفاعل كيميائي غير انزيمي بمسار متكامل ينتج عند تسخين السكريات المختزلة مع الاحماض الامينية وينتهي بتكوين مركبات الميلانويدينات [2]، ويشير الى الكايتوسان ومشتقاته على انها من مضادات اكسدة اولية وثانوية وذلك لقابليتها على اقتناص الجذور الحرة بالاضافة الى ربطها لايونات المعادن [12]، وأن مؤشر الكايتوسان ومشتقاته بوصفها مضادات اكسدة هو قابليتها على اقتناص الجذور الحرة والتي تعود الى حقيقة ان ايون الهيدروجين في المجاميع الامينية NH_3^+ يتفاعل مع الجذور الحرة لتكوين مركبات أكثر استقراراً [13].

المواد وطرائق العمل

1-المواد الأولية: جهزت القشور من الروبيان الموجود في سوق البصرة القديمة في محافظة البصرة كنواتج عرضية لعملية تنظيف الروبيان غسلت القشور بماء الحنفية وجففت في الظل وطحنت الى مسحوق لغرض استخلاص الكايتوسان اجري تصنيف الروبيان في مركز علوم البحار، جامعة البصرة.

2- إستخلاص الكايتين : استخلص الكايتين من مسحوق قشور الروبيان بطريقة تضمنت:

جديد وسخن على درجة حرارة 75°م مع التحريك على المحرك المغناطيسي ثم تم التخلص من المحلول الساخن بمحلول EDTA جديد وسخن مرة أخرى إلى 75°م، ثم استبدل محلول EDTA بماء مقطر ساخن عدة مرات لدقائق قليلة ثم وضعت اكياس الديليزة في عبوة بلاستيكية تحوي ماء مقطر مع قطرات قليلة من الكلوروفورم وحفظت في الثلاجة لحين الاستعمال.

6- تشخيص مركبات مشتقات الكايتوسان بواسطة GC-MS

شخصت مركبات مشتقات الكايتوسان المجففة والذائبة بالماء والنااتجة من تفاعلات ميلارد بعد اذابت 0.1 غم من كل مشتق في 10 مل من الكحول الايثيلي بتركيز 99% والحصول على محلول شخصت مركباته بجهاز كروموتوغرافيا الغاز المتصل بجهاز طيف الكتلة (GCMS P 2010-Q). وتم الفحص في وحدة سلامة الغذاء، قسم علوم الاغذية، كلية الزراعة، جامعة البصرة وتحت الظروف التالية:

[GC-2010]	
Column Oven Temp.	:40.0 °C
Injection Temp.	:280.00 °C
Injection Mode	:Split
Flow Control Mode	:Linear
Velocity	
Pressure	:96.1 kPa
Total Flow	:56.0
mL/min	
Column Flow	:1.71
mL/min	
Linear Velocity	:47.2
cm/sec	
Purge Flow	:3.0
mL/min	
Split Ratio	:30.0
Oven Temp. Program	
Rate Temperature °C Hold Time	
-	40.0 2.00
	2.00

وعودلت بمحلول هيدروكسيد الصوديوم NaOH بتركيز 2 مولاري ونبذت مركزيا على 8000 دورة. دقيقة¹. وقد اخذ الراشح وتمت عملية النضح الغشائي باكياس الديليزة المجهزة من شركة Guangzhou Zhenrui للادوات الطبية بوزن جزيئي 14 كيلودالتون بوجود الماء المقطر لمدة 5 ايام ثم جفد المحلول المديلز واجريت له الفحوصات اللازمة. وان مشتقات الكايتوسان الذائبة بالماء والنااتجة من تفاعلات ميلارد حملت الرموز التالية: F t-d ، G t-d حيث t درجة حرارة التفاعل و d زمن التفاعل و (F و G) سكر (الكلوكوز و الفركتوز) فمثلا:-

(G 121-1/4) ساعة (تفاعل سكر الكلوكوز على درجة حرارة 121°م لمدة 15 دقيقة)

(F121-1/4) ساعة (تفاعل سكر الفركتوز على درجة حرارة 121°م لمدة 15 دقيقة).

5- تنشيط اكياس الديليزة (النضح الغشائي)

نشطت اكياس الديليزة حسب طريقة [1] Brewer وقد استعملت المحاليل التالية:

أ-محلول حامض الخليك الثلجي بتركيز 1%(حجم.حجم¹): اخذ 10 مل من حامض الخليك الثلجي واكمل الحجم الى لتر بالماء المقطر.

أ-محلول 1% (وزن.حجم¹) من كربونات الصوديوم، 10⁻³مول من EDTA: وزن 20 غم من كربونات الصوديوم و0.652 غم من EDTA واذيبت في الماء واكمل الحجم الى لترين بالماء المقطر، واتبعت الخطوات التالية :

غمزت اكياس الديليزة بمحلول (أ) لمدة ساعة ثم تركت في اناء يحتوي على ماء مقطر لمدة بض دقائق على محرك مغناطيسي، ثم استبدل الماء بمحلول (ب)، واستبدل EDTA القاعدي بمحلول

والوزن الجزيئي والنسبة المئوية لمساحتها وزمن الاحتجاز (دقيقة) لكل مركب من هذه المركبات وتصنف المركبات المتطايرة لتفاعلات ميلارد اعتمادا على نوع السكر المرتبط و نوع الاحماض الامينية أو المركبات الاخرى التي تحوي مجموعة أمين بالإضافة الى نسبة الاجزاء المرتبطة وظروف التجربة (درجة الحرارة ووقت التفاعل، والاس الهيدروجيني والرطوبة)، فمن ضمن المركبات المتكونة نتيجة هذه التفاعلات المركبات الاساسية للطعم والنكهة في الاغذية مثل oxazoles, imidazoles, thiazoles, pyrazines, pyrroles, والتي تكون في مرحلة هدم سترير والمركبات الالديهايدية مثل المركبات (phenylacetaldehyde)

(methylbutanal) , (methylpropanal)، وقد احتوت المشتقات قيد الدراسة على هذه المركبات كما في المركب (Propanal, 2-methyl-3-phenyl) في مشتق كاييتوسان- كلوكوز [14].

وقد أشار [6] *Jerkovic et al.* الى وجود مركبات تفاعلات ميلارد بعد استخلاص المركبات المتطايرة والشبه متطايرة من العسل وتشخيصها بواسطة GC-MS وكان ضمن هذه المركبات 2-Octadec-9-en-1-olTetradecane Benzaldehyde, وقد تقاربت هذه المركبات كثيرا من مركبات المشتقات قيد الدراسة فمشتق كاييتوسان- مالتوز احتوى على مشتقات البنزين benzene derivatives مثل مشتق كاييتوسان-كلوكوز الذي احتوى على المركب (1-4 propeny) Benzene,1-methoxy والمركبات الاليفاتية.

40.00	100.0	0.50
0.50		
9.00	280.0	0.00
0.00		
30.00	300.0	1.00

[GC Program]

[GCMS-QP2010 Ultra]

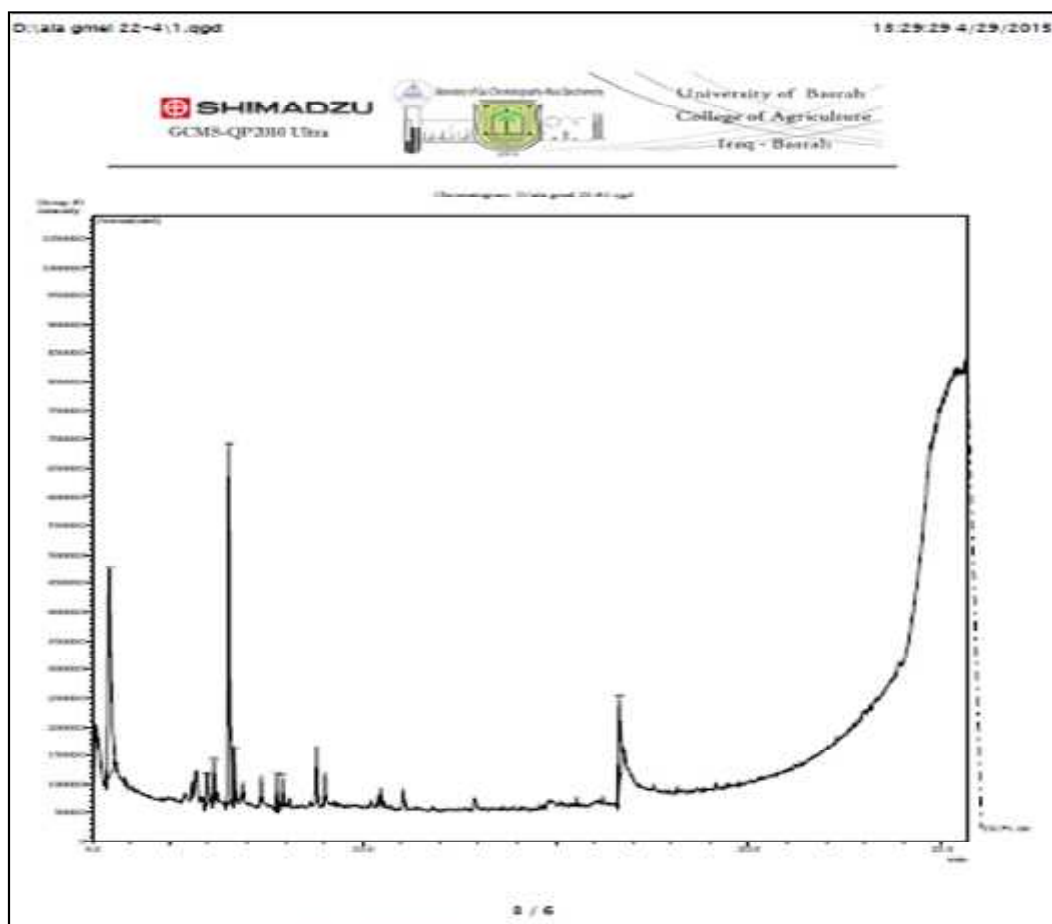
IonSourceTemp	:200.00 °C
Interface Temp.	:280.00 °C
Solvent Cut Time	:3.00 min
Detector Gain Mode	:Relative
Detector Gain	:0.82 kV+0.10

تقدير فعالية مشتقات الكاييتوسان المضادة للاكسدة
قدرت الفعالية المضادة لأكسدة حامض اللينوليك لمشتقات الكاييتوسان الناتجة من تفاعلات ميلارد الذائبة بالماء حسب [10] Osawa and Namiki.

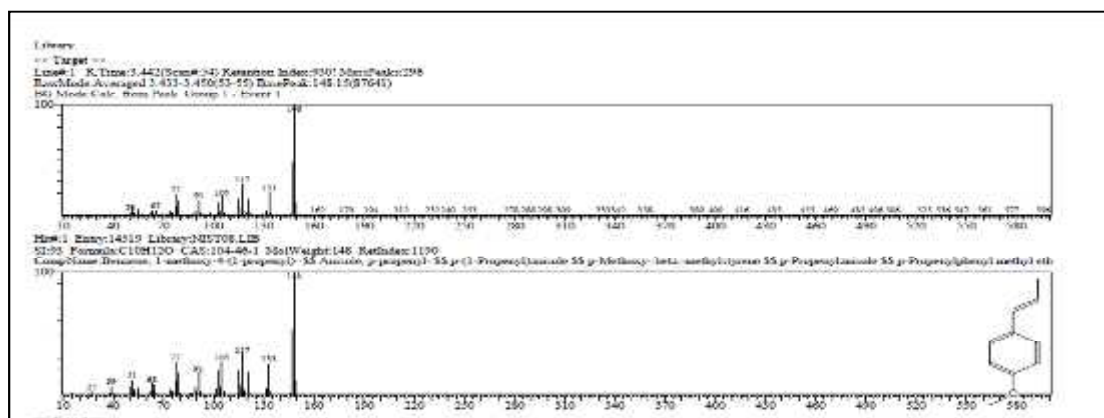
النتائج والمناقشة

يبين المرسوم 1 احتواء مشتقات كاييتوسان- كلوكوز المعاملة على درجة حرارة 121°م لمدة 1/4 ساعة (G121-1/4) ساعة على 5 قمم متمثلة بالمركبات Benzene,1-methoxy 4-(1 propeny) ,

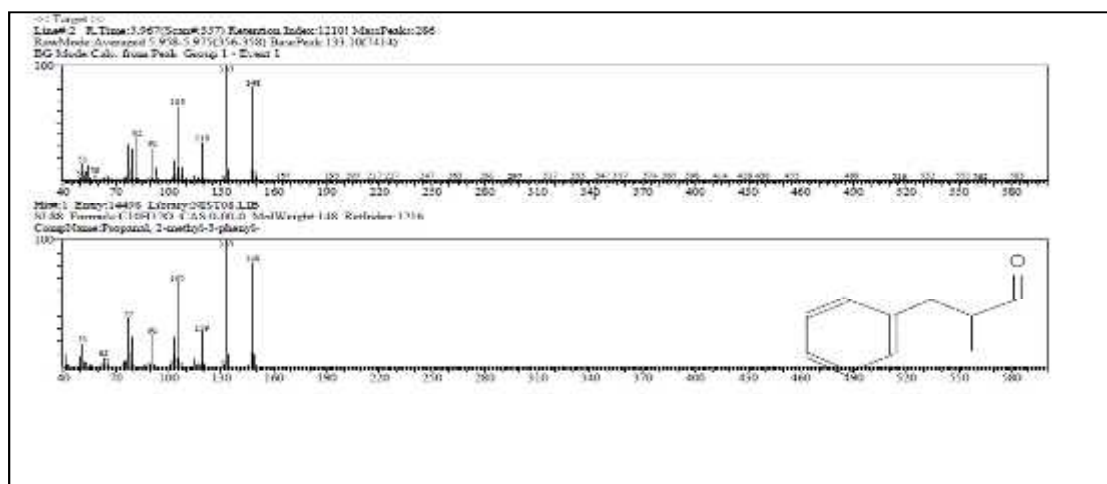
(Propanal,2-methyl-3-phenyl-), (Benzaldehyde,4-methoxy),(2-Propanone1-phenyl-), (1-Tetradecene), 4-(methoxypheny), اما المرسوم 8 فيبين احتواء مشتق كاييتوسان- مالتوز (M121-1/4) ساعة على قمتين متمثلة بالمركبات (1,2-), (Cyclopentaedione), 2,3,4,5-Tetra-O- , benzoylhex-2-ulopyranose) كما تبين الاشكال (6,5,4,3,2) طيف الكتلة لمركبات المشتق (G121-1/4) ساعة اما الاشكال (9,8) فتبين طيف الكتلة لمركبات المشتق (M121-1/4) ساعة، وتبين جداول (1 و 2) الصيغة الجزيئية



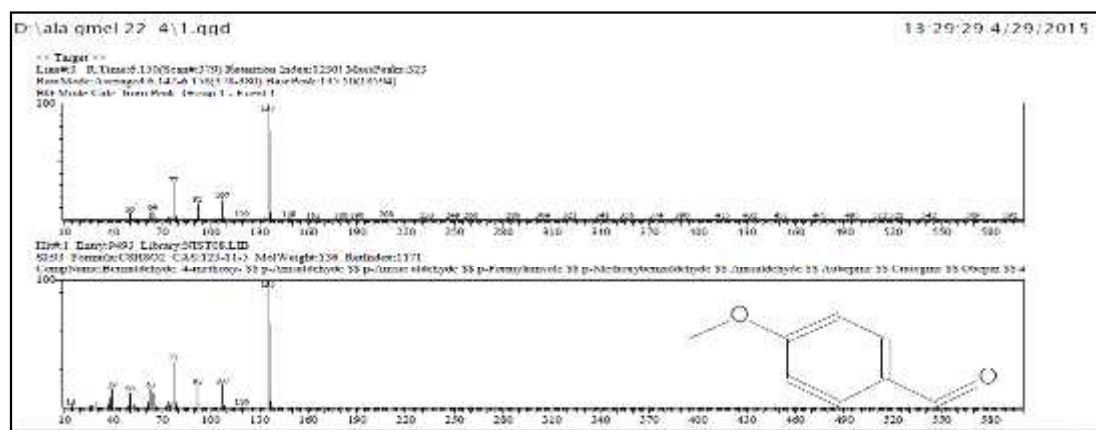
شكل (1): مرتسم مركبات المشتق (G121-1/4) ساعة بعد تشخيصها بجهاز GC-MS.



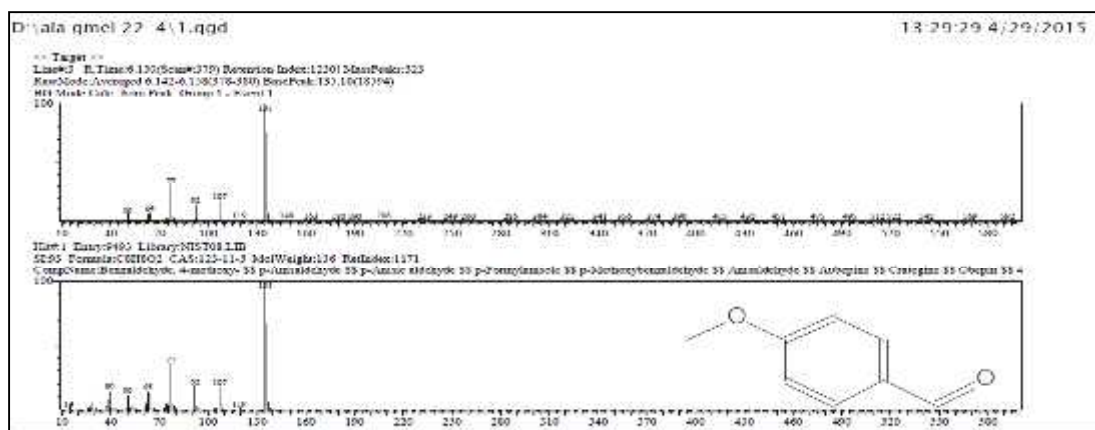
شكل (2): طيف الكتلة للمركب Benzene,1-methoxy 4-(1 propenyl) الخاص بالمشتق (G121-1/4) ساعة.



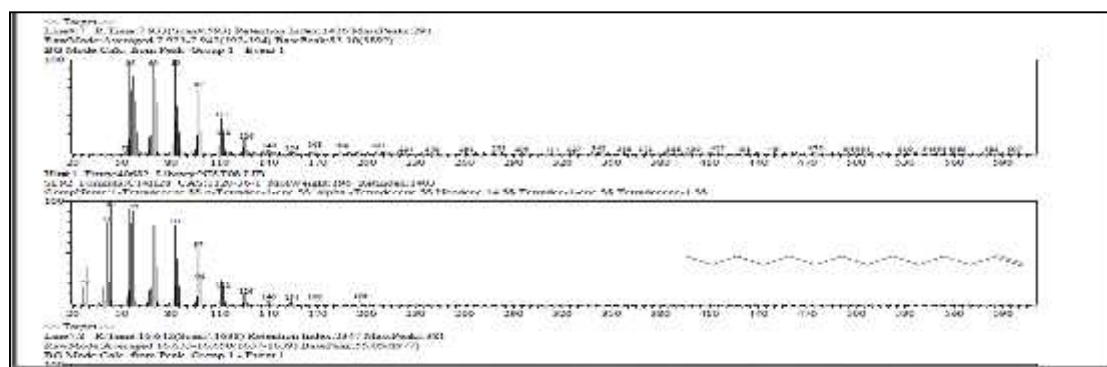
شكل(3): طيف الكتلة للمركب Propanal, 2-methyl-3-phenyl- الخاص بالمشنق (G121-1/4) ساعة.



شكل (4): طيف الكتلة للمركب Benzaldehyde, 4-methoxy الخاص بالمشتق (G121-1/4) ساعة.



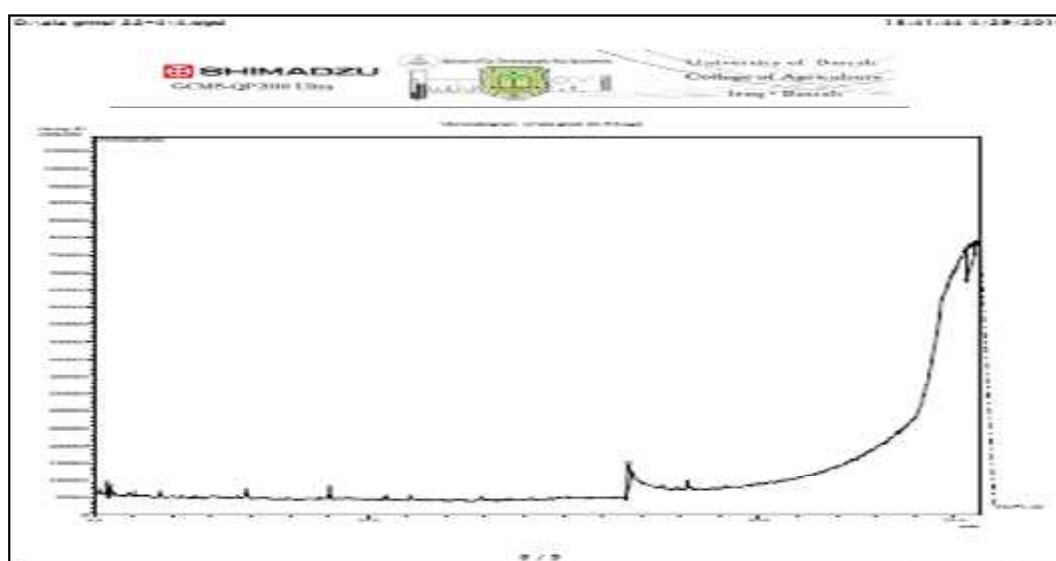
شكل (5): طيف الكتلة للمركب 2-Propanone, 1-(4-methoxyphenyl) الخاص بالمشتق (G121-1/4). ساعة



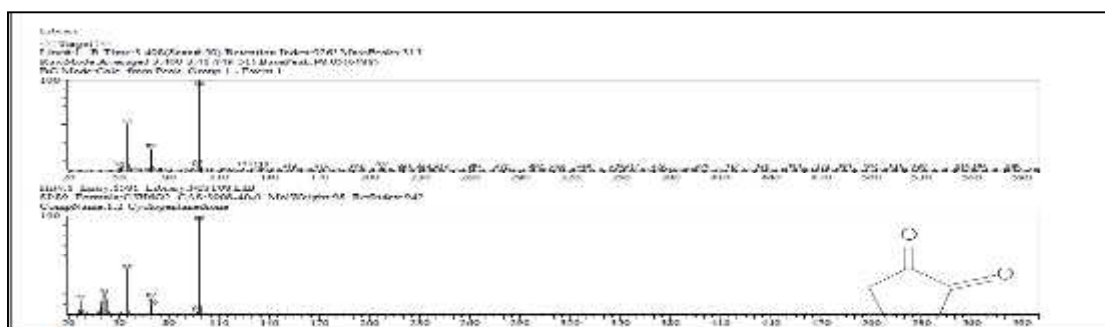
شكل (6): طيف الكتلة للمركب 1-Tetradecene الخاص بالمشتق (G121-1/4) ساعة.

جدول (1): انواع مركبات المشتق (G121-1/4) ساعة التي شخّصت بواسطة GC-MS.

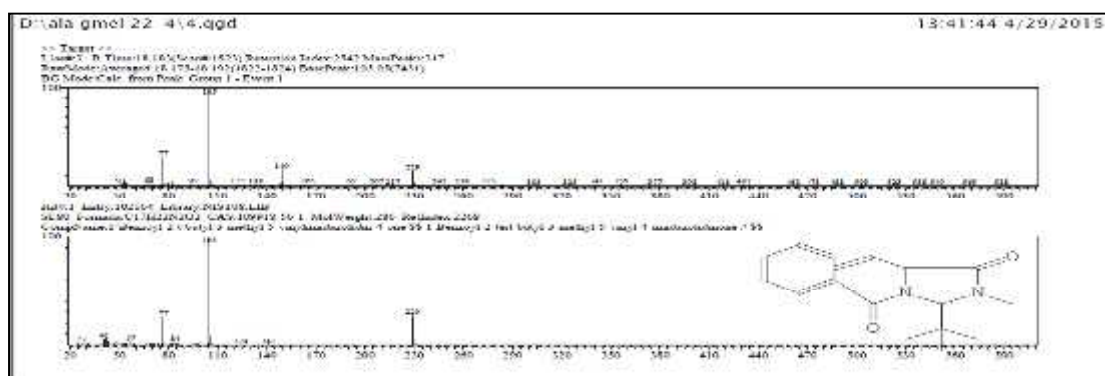
ت	اسم المركب	الصيغة الجزيئية	و.ج	المساحة %	زمن الاحتجاز
1	Benzene ,1 methoxy-4-(1-propeny)	C ₁₀ H ₁₂ O	148	37.44	3.44
2	Propanal, 2-methyl-3-phenyl-	C ₁₀ H ₁₂ O	148	3.06	5.967
3	Benzaldehyde, 4-methoxy	C ₈ H ₈ O ₂	136	3.53	6.150
4	2-Propanone, 1-(4-methoxyphenyl	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	164	2.14	7.784
5	1-Tetradecene	C ₁₄ H ₂₈	196	1.76	7.936



شكل (7): مرتمم مركبات المشتق (M121-1/4) ساعة بعد تشخيصها بجهاز GC-MS



شكل (8): طيف الكتلة للمركب 1,2-Cyclopentanedione الخاص بالمشقق (M121-1/4) ساعة.



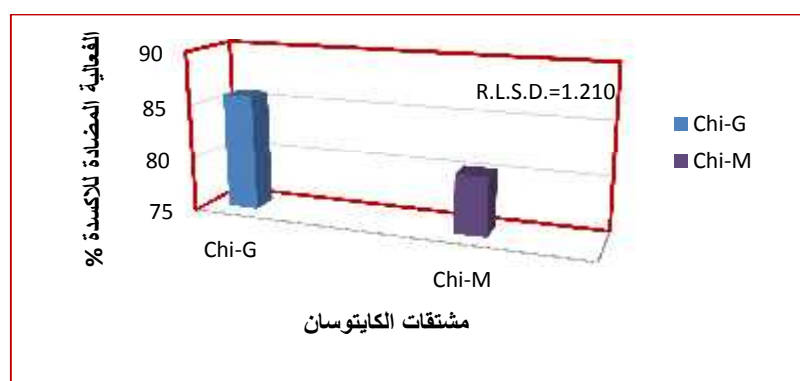
شكل (9): طيف الكتلة للمركب 2,3,4,5-Tetra-O-benzoylhex-2-ulopyranose

جدول (2): مركبات المشقق (M121-1/4) ساعة التي شخصت بواسطة GC-MS.

ت	اسم المركب	الصيغة الجزيئية	و.ج	المساحة %	زمن الاحتجاز
1	1,2- Cyclopentanedione	C ₅ H ₆ O ₂	98	4.56	3.411
2	2,3,4,5-Tetra-O-benzoylhex-2-ulopyranose	C ₁₇ H ₂₂ N ₂ O ₂	286	63.49	25.333

على المشقق (M121-1/4) ساعة عند مستوى معنوية $p < 0.05$ فقد اعطى أعلى فعالية مضادة للاكسدة بلغت (85.80) %، اما المشقق (M121-1/4) فبلغت فعاليته (80.30) %

تقدير فعالية مشتقات الكايتوسان المضادة للاكسدة قدرت الفعالية المضادة للاكسدة للمشتقات بإستعمال التركيز 10 ملغم/مل كما في الشكل 10، ونلاحظ ان المشقق (G121-1/4) ساعة قد تفوق معنويا



شكل (10): الفعالية المضادة للاكسدة لمشتقات الكايتوسان الناتجة من تفاعلات ميلارد المعاملة على درجة حرارة 121°م لمدة 1/4 ساعة.

المصادر

1. Brewer, J.M. (1974). Preparation of materials Pp: 5-88 In: Brewer, J.M.; Pesce, A.J. and Ashwor, R.B.. (Eds.). Experimental techniques in biochemistry. practice. Hall, Inc. Englewood cliffs. New Jersey. 325pp.
 2. Chang, H.L.; Chen, Y.C. and Tan, F. J. (2011). Antioxidative properties of a chitosan-glucose Maillard reaction product and its effect on pork qualities during refrigerated storage. Food Chemistry, 124: 589-595.
 3. Chung, Y.C.; Kuo, C.L.; and Chen, C.C. (2005). Preparation and important functional Properties of water-soluble chitosan produced. Biological Agricultural and Chemistry, 45(3): 735-739.
 4. Dash, M.; Chiellini, F.; Ottenbrite, R. M. and Chiellini, E. (2011). Chitosan-a versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications.
- وقد اظهرت النتائج اختلاف قيمة الفعالية المضادة للاكسدة لمشتقات الكايتوسان باختلاف نوع السكر واختلاف المعاملات الحرارية وهذا ما اكده Shih *et al.* [12] فقد علل هذا الاختلاف باختلاف قابلية ارتباط الأصرة الهيدروجينية القوية لمشتقات الكايتوسان المختلفة مع نوع السكر المرتبط بجزيئات الكايتوسان، وقد توافقت النتيجة مع [11] Phisut and Jiraporn اللذين لاحظا زيادة الفعالية المضادة للاكسدة مع زيادة وقت التسخين لمشتقات الكايتوسان الناتجة من تفاعل ميلارد وقد اعطى المشتق (G100-7) ساعة اعلى فعالية مضادة للاكسدة مقارنة بالمشتق (M100-7) ساعة وقد فسروا هذه النتيجة بتكوين نواتج كبيرة ومختلفة لنواتج تفاعلات ميلارد خلال التسخين لمحلول كايتوسان - كلوكوز.

- leaves. through Maillard reaction. Bioresource Technology, 96(13): 1473-1482.
11. Phisut, N. and Jiraporn, B. (2013). Characteristics and antioxidant activity of Maillard reaction products derived from chitosan-sugar solution. International Food Research Journal, 20(3): 1077-1085.
12. Shih, P.W.; Pai, P.L. and Jen, H.M.K. (2006). Antioxidant activity of aqueous extracted of selected plants. Food Chemistry, 99 : 775-783.
13. Xie, W.; Xu, P. and Liu, Q. (2001). Antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 11: 1699-1701.
14. Xing, R.E.; Liu, S.; Guo, Z.Y.; Yu, H.H. ;Wang, P.B.; Li, C.P.; Li, Z. and Li, P.C. (2005). Relevance of molecular weight of chitosan and its derivatives and their antioxidant activities in vitro. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 13(5): 1573-1577.
15. Ying, C.; Chung, C. F. and Chin, F. (2006). Preparation and characterization of water-soluble chitosan produced by Maillard reaction Fisheries Science, 72: 1096-1103.
16. Yu, A. N. and Zhang, A. (2010). Aroma compounds generated from thermal reaction of L-ascorbic acid with L-cysteine. Science Direct (Food Chemistry) 121:1060-1065.
- Progress in Polymer Science, 36(8): 981-1014.
5. Feng, Y.W and Xia, W.S. (2011). Preparation, characterization and antibacterial activity of water-soluble O-fumaryl-chitosan. Carbohydrate Polymers, 83(3): 1169-1173.
6. Jerkovic, I.; Carlo, I.G. ; Gugic, M. and Bubalo, D. (2010). Composition of Sulla (*Hedysarum coronarium* L.) honey solvent extractives determined by GC/MS: norisoprenoids and other volatile organic compounds. Journal Molecules, 15 : 637-638.
7. Kamil, J. Y.; Jeon, Y. and Shahidi, F. (2002). Antioxidative activity of chitosans of different viscosity in cooked comminuted flesh of herring (*Clupea harengus*). Food Chemistry , 79: 69-77 .
8. Knaul, J. Z.; Hudson, S. M. and Creber K. A. (1999). Crosslinking of properties chitosan fibers with dialdehydes: Proposal of anew reaction mechanism. Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics, 37: 1079-1094.
9. Liao, F.H.; Shieh, M.J.; Chang, N.C and Chien, Y.W. (2007). Chitosan supplementation lowers serum lipids and maintains normal calcium, magnesium, and iron status in hyperlipidemic patients. Nutrition Research, 27(3):146-151.
10. Osawa, T. and Namiki, M. (1981). A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of Eucalyptus

**Preparation of water soluble Chitosan derivatives by
Millard reaction and identify its by GC-MS and Test its as
antioxidant**

Munir A. J. Al-Tai , Ali H. Abed-Al-Kareem and Alya J. A. Al-Saad*

Department of Food Science, College of Agriculture, University of Basrah, Iraq

***e-mail: alyaalsaad63@yahoo.com**

Abstract: Chitosan prepared from Chitin that extracted from shrimp shell (*Penaeus semisulcatus*) by removal acetyl group from Chitin by chemical methods, water soluble chitosan derivatives prepared by interaction Chitosan with two types of reducing sugars by Millard reactions at 121 °c for 1/4 hour by autoclaving, Chitosan derivatives resulting from the interaction carried symbols (G td, M td), where t was reaction temperature, d reaction time, either symbols (G and M) represents the sugar (glucose and maltose) respectively, the derivatives identify by GC-MS, the results shows the derivative (chitosan -glucose) (G121-1/4) hour contain 5 compounds, While the derivative (chitosan- maltose) (M121-1/4) hour contain 2 compound ,It was identify the molecular formula, molecular weight and the percentage of the area and the time of detention for each compound of these compounds. Determined the antioxidant activity of its and the result shows that the derivative(G121-1/4) hour was more significant than (M121-1/4) hou and have 85.80% of antioxidant activity, while the derivative (M121-1/4) hour have 80.30% .

Key words: Chitosan Derivatives, Millard Reaction , GC-MS, Antioxidant.