استخلاص الكاتشين من الشاي الاخضر *Camellia sinensis*

Extraction of Catechin from green tea plants *Camellia sinensis*

عصام فاضل الجميلي ياسر عادل جبار* نزار ادور ناصر*

معهد الهندسة الوراثية والتقنية الاحيائية للدراسات العليا / جامعة بغداد

*كلية العلوم / الجامعة المستنصرية

Essam F. A. Al-Jumaily Yasir A.J.Al-abdli * Nazar E. Nasser*

Genetic Engineering and Biotechnology Institute for post graduate studies/ Baghdad University

*College of Science/ Al-Mustansiriya University

المستخلص

تم استخلاص الكاتشين (Catechin) من الشاي الاخضر *Camellia sinensis* بأستخدام طريقة الفصل بالتجزئة ، اذ تم الاستخلاص اولاً بالماء الحار ثم تجزئة المستخلص على مرحلتين الاولى خلطه مع الكلورفوم وبعدها تم الحصول عل الطبقة المائية ، ثم المرحلة الثانية خلطه مع خلات الاثيل للتخلص من المركبات الغير قطبية وقد تم الحصول على مادة بنية اللون غامقة تخلو من اللزوجة وهي مادة الكاتشين وقد تم تشخيصها والتاكد منها باستخدام الكواشف الكيمائية وكذلك تقنية الطبقة الرقيقة (TLC) وكانت مقدار الحركة النسبية للمركب 0.92 عند استخدام محاليل الفصل حامض الخليك: كلوروفورم (9:1) اما درجة الانصهار فقد بلغت 120م وقد تم تشخيص المركب باستخدام تقنية كروموتوغرافيا السائل الكفاية (HPLC) إذ ظهرت حزمة واحدة ، وكذلك بواسطة تقنية FTIR.

Abstract

Catechin was extracted from green tea *Camellia sinensis* by using liquid-liquid chromatography. Extraction was done using hot water and then fractionation of the extract in two-stages first mixed with chloroform; the aqueous layer was taken and the second step mixed with ethyl acetate to remove all the apolar compounds and dark brown colour substance was obtained nonviscous and this was supposed to be catechin compound. Catechin has been diagnosed by using chemical reagent; thin layer chromatography (TLC) and the relative front (Rf) was 0.92 when using the mobile phase acetic acid: chloroform (9:1). The melting point has reached 120^{o}C. The catechin was conducted by the use of high-performance liquid chromatography (HPLC) and was diagnosed by FTIR spectrum.

المقدمة

يعد الشاي احد اهم المشروبات الشعبية في العالم ويختلف التوزيع التجاري لاستهلاك الشاي بانواعه ، اذ يشكل استهلاك الشاي الاخضر والاسود حوالي (20 ،78)% من انتاجه على التوالي [1] ، يعود الشاي الاسود والشاي الاخضر للنبات نفسه *Camellia sinensis* الا انهما يختلفان في عملية الانتاج اذ تؤثر عمليات تحضير الشاي في محتواه من الفينولات المتعددة ، فبعد قطف الاوراق الفتية تذبل ثم تلف بشكل اسطوانة (rolled) وتخمر تخميرا كاملا وتخبز وتجفف لتحضير الشاي الاسود ، في حين تعرض الأوراق للبخار لتثبيط فعاليته انزيم البولي فينول اوكسيديز (PPO) ثم تجفف لتحضير الشاي الاخضر . اما النوع الثالث Oolong tea فيحضر برص الاوراق بعد تذبيلها وتخمر جزئيا ثم تجفف [2] . يفيد الشاي الاخضر في زيادة القدرة على مكافحة الأمراض ويخفض من مستوى الكوليسترول ويحافظ على سيولة الدم ويقاوم حدوث الجلطات ويحتوى الشاي الاخضرعلى نسبة جيدة من معدن الفلورين المعروف بمفعولة المقاوم لتسوس الأسنان ويكافح الأورام السرطانية إذ يمنع نمو الأوعية الدموية التي تغذى هذه الأورام عليها وتساعدها على البقاء والنمو ، ويتميز أيضا مفعوله المضاد للأكسدة أى المحافظه على الخلايا من المواد المدمرة ويعمل على خفض ضغط الدم المرتفع وذلك لأنه يؤدى لاسترخاء العضلات المتحكمة في درجة قبض الشرايين ، كما ويمتلك فعالية ضد مايكروبية [3] . تحوي اوراق الشاي مجاميع كيميائية عدة ، قسم منها مجاميع فعالة حيويا تتمثل بـ القلويدات البيورنية purine alkaloids التي تضم :

Key words: Green tea, Catechin, HPLC, TLC

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

الكافيين caffeine الذي يوجد بنسبة تتراوح بين (2.5 4.5):% من الوزن الجاف [4] ، والتربينات الثلاثية Triterpene ، والفلافونات Flavanols التي تمثل الكاتشينات Catechins الجزء الرئيس فيها ، بالاضافة الى ذلك يحتوي الشاي الاخضر على المعادن والفيتامينات مثل الفلورايد والبوتاسيوم والالمنيوم وفيتامين C وفيتامين A وفيتامين E [5] ، تلعب الفينولات المتعددة للشاي دورا مهما في العديد من الفعاليات الحيوية ، فقد وجد ان لكاتشينات الشاي الاخضر و Epigallocatechin gallate (EGCG) فاعلية لمعادلة الجذور الحرة تزيد بمقدار (25،100) مرة عن الفعالية المضادة للاكسدة لفيتامين C وE على التوالي [6] . تهدف الدراسة الحالية الى استخلاص مادة الكاتشين من الشاي الاخضر والتي تشكل نسبة عالية من مكوناته .

المواد وطرائق العمل

تم الحصول على الشاي الاخضر من الاسواق المحلية بشكل مسحوق من الاوراق المجففة المحفوظه داخل اكياس مغلفة وهذا النوع من الشاي الاخضر صيني المنشأ وتمت تعبئته في سوريا – دمشق . صنف النبات من قبل الاستاذ الدكتور علي حسين الموسوي ، قسم علوم الحياة /كلية العلوم / جامعة بغداد إذ أكد بان النبات هوالشاي الاخضر والاسم العلمي له *Camellia sinensis* . أما مركب الكاتشين القياسي Catechin Standard فقد تم الحصول عليه من شركة Sigma .

تحضير المستخلص المائي الحار

حضر باذابة 50 غم من المسحوق النباتي في 500 مل ماء مقطر مغلي بدرجة حرارة 100 م وترك عشرة دقائق ، بعدها رشح خلال اوراق ترشيح واتمان رقم (1) . ركز المستخلص بوساطة جهاز المبخر الدوار لحين الحصول على سائل كثيف بعدها وضع في الحاضنه بدرجة 37 م لمدة 48 ساعة للحصول على المسحوق الجاف للمستخلص ، ثم وضع في أنبوبة محكمة الغلق وحفظ في الثلاجة لحين الاستعمال .

الكشف عن بعض المكونات الفعالة في المستخلص المائي الحار لاوراق الشاي الاخضر

تم الكشف عن بعض المكونات الفعالة في المستخلص المائي الحار لاوراق الشاي الاخضر فقد تم الكشف عن الفينولات والقلويدات ووفقا للطرائق الموصوفه من قبل [7] والراتنجات والصابونينات وفقا للطرائق الموصوفة من قبل Shihata [8] والكلايكوسيدات حسب الطريقة الموصوفه من قبل الشيخلي وجماعته [9] والترتبينات والستيرويدات ووفقا للطرائق الموصوفه من قبل [10] والتانينات حسب الطريقة الموصوفه من قبل [7] و الفلافونات حسب الطريقة الموصوفه من قبل [11] و الكومارينات حسب الطريقة الموصوفه من قبل [12] و الزيوت الطيارة حسب الطريقة الموصوفه من قبل [13] .

فصل مركبات (catechin) الفعالة Separation of catechin compound

استخلصت وفصلت المركبات الفعالة الرئيسة (catechines) من أوراق الشاي الأخضر تبعاً للطريقة الموصوفة من قبل [7] . والتي تضمنت مرحلتين ، في المرحلة الاولى خلط 50غم من اوراق الشاي الاخضر المجففه مع 500 مللتر من الماء المقطر ، بعدها وضع في الحمام المائي بدرجة 50م ولمدة اربعة ساعات ، بعدها رشح الخليط باستعمال ورق ترشيح واتمان رقم (1) .

اما المرحلة الثانية فتتضمن تنقية المستخلص المركز من المركبات غير القطبية باضافة الكلوروفورم الى المزيج في قمع فصل بنسبة 1:1 (حجم مستخلص : حجم الكلوروفورم) ، وخلط المزيج جيدا وترك لمدة ساعة لانفصال طورين إذ يمثل الطور العلوي الطبقة المائية ، والطور السفلي يعود لطبقة الكلورفورم . بعدها نقلت الطبقة العلويه لوعاء نظيف ، وتم التخلص من الطبقة السفلى (طبقة الكلورفورم) ، تمت تنقية الطبقة العليا من المركبات ذات القطبية الواطئة بأضافة خلات الاثيل الى الطبقة في قمع فصل بنسبة 1:1 (حجم مستخلص : حجم خلات الاثيل) . خلط المزيج جيدا وترك لمدة 24 ساعة لانفصال طورين إذ يمثل الطور العلوي طبقة خلات الاثيل ، والطور السفلي تمثل الطبقة المائية ، بعدها تم التخلص من الطبقة العليا (طبقة خلات الاثيل) وجمعت الطبقة السفلى(طبقة النموذج) وتم تبخيره بالمبخر الدوار (Rotary evaporater) بدرجة حرارة 50م لاجل تركيزه الى ثلث حجمه الاصلي . وتم تجفيفها باستخدام المجفد Lyophilizer للحصول على مسحوق بني غامق .

الكشف الكيميائي عن مركب الكاتشين

تم اجراء الكواشف الكيميائية الاتية للتاكد من مركب الكاتسين فقد اجري الكشف عن مركب التانينات والفلافونات والفينولات والتربينات والستيرويدات وفق الطرق الموصوفه في الفقرة السابقه .

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

الكشف عن مركب الكاتشين (Catechin) باستخدام تقنية كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة Thin Layer Cromatography :

أتبعت الطريقة التي ذكرها [7] طريقة صفائح الطبقة الرقيقة Thin layer chromatography (TLC) وهذه الصفائح هي طبقة رقيقة من الالمنيوم مطلية بطبقة من هلام السليكا Silica gel من نوع 254nm بأبعاد (20x20) سم وسمك (0.2) ملم والمجهزة من شركة (Fluka) حاوية على مادة متفلورة عند تعريضها لمصدر أشعة فوق بنفسجية . وضع الانموذج اسفل الصفيحة على شكل بقع صغيرة باستعمال انابيب شعرية . وباستعمال نظام الفصل المكون من :

حامض الخليك : كلوروفورم بنسبة 1:9 ، بعدها فحصت الصفائح تحت مصدر للاشعة فوق البنفسجية عند الطول الموجي (254) نانوميتر . حسبت قيمة R_f للبقع المفصولة لكلا المحلولين وحسب المعادلة :

$$R_f = \frac{\text{المسافة التي قطعها الانموذج}}{\text{المسافة التي قطعها المذيب}}$$

قياس درجة الانصهار Melting point

تم فحص درجة الانصهار الكاتشين بوساطة استخدام جهاز درجة الانصهار Melting Point Apparatus.

تشخيص مركب الكاتشين بوساطة تقنية (FTIR)

تم عمل قرص من الـ (KBr) للمركب المنقى الكاتشين وأخذ الطيف له ، وتم مقارنته مع المركب القياسي .

تشخيص مركب الكاتشين بوساطة تقنية جهاز كروموتوغرافيا السائل عالي الكفاية High-Performance liquid Chromatography

تم تشخيص المركب الكاتشين باستخدام جهاز كروموتوغرافيا السائل عالي الكفاية في وزارة الصناعة والمعادن / شركة ابن سينا العامة وحسب الطريقة الموصوفة من قبل [14] وتحت الظروف الاتية: نوع العمود C18 وطول العمود (0.460×25) نانوميتر ومعدل الجريان 0.4 مليليتر / دقيقة ، اما الطور المتحرك فكان الاسيتونايتريت وحامض الخليك (30:70) .

النتائج والمناقشة

تتواجد الكاتشينات في الشاي الأخضر بغزارة وتعد من المواد الفعالة ضد الخلايا السرطانية Carcinogenesis كما تعد عامل مؤكسد قوي [3] . تم فصل مركب الكاتشين عن باقي المركبات على مرحلتين بأستخدام طريقة الفصل بالتجزئة (سائل سائل) . إذ اعتمد نظام الفصل بالتوزيع بصورة أساسية على الفروق في درجة القطبية بين المركبات المراد فصلها ولاسيما أن درجة القطبية هي العامل الرئيس الذي يتحكم في درجة الذوبان فنظام التوزيع يعتمد على درجة ذوبان مركبات الأنموذج بين سائلين مختلفين بالقطبية ، فعند خلط النموذج مع الكلوروفورم والماء المقطر في هذه التجربة لغرض فصل المركبات الغير قطبية عن المركبات القطبية حيث يعد مركب الكاتشين قطبيا [3] . سوف تكون حصيلة الكلوروفورم جميع المركبات غير القطبية أو بعيدة بدرجة قطبيتها عن مركب الكاتشين أما الماء سوف يذوب فيه مركب الكاتشين وبعض المركبات القريبة جداً منه بالقطبية أو مشابه له . اما المرحلة الثانية تضمنت خلط النموذج المتحصل عليه في المرحلة الاولى مع خلات الاثيل ايضا لتنقية مركب الكاتشين من المركبات الغير قطبية او ذات القطبية الواطئة . فقد تم الحصول على مادة بنية اللون غامقه جداً تخلو من اللزوجة بعد تركيز الطبقة المائية بجهاز المبخر الدوار . تم الكشف التمهيدي للمادة المتحصل عليها (بنية اللون غامقة) بأستعمال تقنية TLC وباستعمال نظام الفصل المكون من (حامض الخليك : كلوروفورم) (9:1) . اذ وجد أن المادة المستحصل عليها من خطوات الاستخلاص وبالمسافة النسبية للهجرة (R_f) 0.92 وهي مطابقة للمركب القياسي كما في الشكل (1) إذ تم ظهور بقعة داكنة اللون وهي دليل على أنها مركب الكاتشين (Catechin) بحسب ماجاء به [16،15] . اثبتت هذه المادة المفصولة من نبات الشاي الاخضر قابليتها على الذوبان في الكحول والماء وعدم ذوبانها في خلات الاثيل و الكلوروفورم ، كما اثبتت هذه المادة قابليتها على التفاعل مع كلوريد الحديديك لون ازرق مخضر، وكانت درجة انصهاره (120) م ، حيث كانت مساوية لقيمة درجة انصهار المركب القياسي .

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

شكل(1): الكشف التمهيدي لمركب الكاتشين(TLC)

1. المركب القياسي 2.المركب المنقى

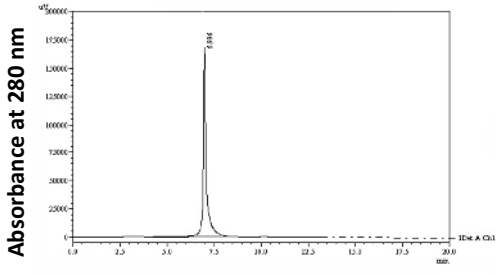
الكشف الكيميائي عن مركب الكاتشين

بعد الحصول على ناتج التنقية والمتضمن الجزء الاول ، اعتمدت هذه الاختبارات لاجل تحديد طبيعة المجاميع الفعالة في المادة المنقاة مثل: (الفينولات المتعددة ، التربينات ، التي تضمنت التانينات ، الفلافونات) لذا اجريت العديد من الكشوفات الكيمائية النوعية لهذه المركبات في الجزءين ، وكانت النتائج موجبة للطبقة المائية بالنسبة لكشوفات الفينولات والتانينات والفلافونات ، اما بالنسبة للتربينات والستيرويدات فقد اعطت نتائج سالبة جدول (1) .

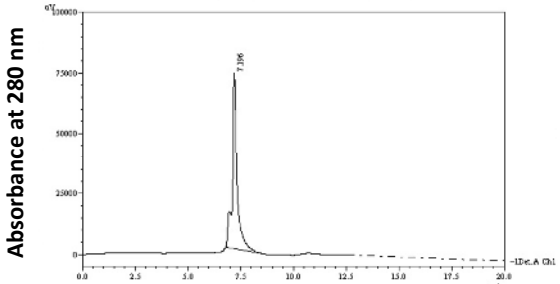
جدول (1): الكشف الكيمائي للمركبات الفعالة في المستخلص المائي الحار لأوراق الشاي الاخضر

المركبات الفعالة	دليل الكشف	مستخلص الشاي الاخضر
الفينولات	لون ازرق مخضر	+
التانينات	راسب هلامي	+
الفلافونات	لون ازرق مخضر لون بني محمر	+
التربينات والستيرويدات	لون بني (تربين) وبعد تركه فترة لون ازرق داكن(ستيرويد)	_ _

كروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة HPLC تم معرفة درجة نقاوته بإستخدام تقنية كروموتوغرافيا السائل الفائق الكفاية (HPLC) ، حيث استردت مكونات المستخلص من عمود C-18 (0.46×25cm) 5µmلكروماتوغرافيا السائل الفائق الكفاءة باستخدام الطور المتحرك والمتكون من الاسيتونايتريل وحامـــــض



شكل (2): تقنية كروموتوغرافيا السائل عالي الكفاية HPLC في قياس امتصاصيه (Catechin)المستخلص من الشاى الاخضر



شكل (3) : تقنية كروموتوغرافيا السائل عالي الكفاية HPLC في قياس امتصاصية (Catechin) القياسي

الخليك وبنسبة (30:70) لمدة (θ 20) دقيقة بظهور قمة واحده لمركب الكاتشين (Catechin) المنقى مما يشير

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

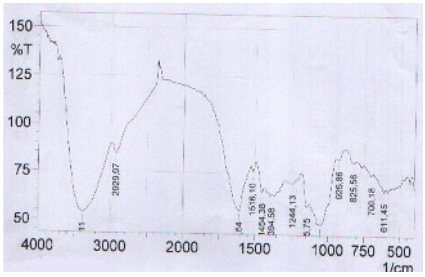
الى عدم وجود مركبات اخرى معه وكان وقت ظهور مركب الكاتشين المنقى عند الدقيقة (6.996) مطابق لوقت ظهور المركب القياسي لمركب الكاتشين (Catechin)عند الدقيقة (7.196) وكما موضح بشكل (2،3) . حيث كانت نسبة المركب المنقى 100% وكانت النسبة مطابقة لنسبة المركب القياسي . ان هذه النتيجة تؤكد الكشوفات السابقة الخاصة بنقاوة (Catechin) لكشف التأكيد TLC والكشف النوعي بأستعمال جهاز المطياف الضوئي ونلاحظ ان (Catechin) المنقى كان على درجة عالية من النقاوة بالمقارنة مع المركب القياسي . ويرجع هذا المدى الواسع من التباين في تركيز الفينولات المتعددة (الكاتيكينات) الى عوامل عدة تتضمن: المناخ ، وموسم اقتطاف الاوراق ، والممارسات الزراعية للنبات وبستنته ، فضلا عن نوع النبات وعمره [1] .

تشخيص مركب الكاتشين بوساطة تقنية (FTIR)

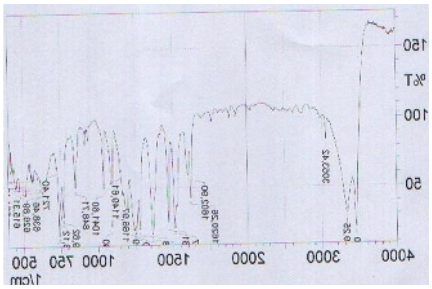
تَمّ تشخيص المركب الكاتشين بعد استخلاصه من نبات الشاي الأخضر بوساطة الـ (FTIR) واظهر القمم التشخيصية المميزة الاتية:

- 3387 (cm^{-1}) قمة عرضية تعود لامتصاص مجاميع (OH) الكحولية.
- 2929 (cm^{-1}) ، 2890 قمتان واضحتان تعود لامتصاص مجموعة (C-H) الالفاتية.
- 3060 (cm^{-1}) قمة متداخلة مع قمة OH تعود لامتصاص مجموعة (C-H) الاورماتية.
- 1612 (cm^{-1}) ، 1516 قمتان تعود لامتصاص مجموعة (C=C) الاورماتية.
- 1049(cm^{-1}) قمة واضحة تعود لامتصاص مجموعة (C-O-C) الايثرية. نلحظ من طيف الـ(IR)

لمركب الكاتشين وجود تطابق بينه وبين مركب الكاتشين القياسي وهذا يؤكد عزل المركب بنقاوة عالية ، وكما موضح في الشكلين (4،5) .



شكل (4): طيف الـ (FTIR) لمركب الكاتشين المستخلص في هذه الدراسة



شكل (5): طيف الـ(FTIR) لمركب الكاتشين القياسي

المصادر

1. Jung,Y.D. and Ellis, L.M.(2001). Inhibition of tumor invasion and angiogenesis by epigallocatechin gallate (EGCG), a major component of green tea. Int. J. Exp. Path., 82, 309-316.
2. Brown,M.D. (1999). Green Tea *(Camellia Sinensis*) Extract and its Possible Role in Prevention of Cancer. Altern. Med. Rev, 4(5): 360-370.
3. Jin, Y.;Jin, C. H. ; and Row, K. H. (2006). Separation of catechin compounds from
4. Different teas. Center for Advanced Bioseparation Technology, Department of Chemical
5. Engineering, Inha University, Incheon, Korea. Biotechnology Journal 1(2): P 209-213.
6. Kim,S.H. and Lee, C.S.(1992). The effect of caffeine on diethylnitrosamine initiated hepatic altered foci in a midterm induction system. *In vivo.* P6:223-226.
7. PDR for Herbal Medicine (1998). (1st ed). Medical economic company Monvale, Newjersy, pp: 701.

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

8. Miller, A. L.(1996). Antioxidant Flavonoids: Structure, Function and Clinical Usage. Alt. Med. Rev. 1(2): 103-111.
9. Harbone, J. B. (1984). Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plant analysis. 2nd ed., Chapman and Hall. London. P: 288.
10. Shihata, I.M. (1951). A pharmalogical study of Anagllis arvensis. M.D. Vet. Thesis, Cairo University.
11. الشيخلي ، محمد عبد الستار و العزاوي ، فريال حسن وفياض ، حسن (1993) . الكيمياء التحليلية ، الجامعة المستنصرية ، ص 320 323 .
12. Al-Abid, M.R. (1985). Zurrzusamme mse turungder Abschla B membrane in *Phoenix dactylifera*. Wurzburg University. Wuzzburg, F.R. of Germany.Pp: 153-140.
13. Cannell, P. (1998). How to Approach the isolation of Natural products – 1st ed Human – press. inc.
14. Geisman, T. A. (1962). Chemistry of Favonoids Compounds. Macmillan Co. New York. Pp. 90-101.
15. Indian Herbal Pharmacopoeia (1998). Ajoint Publication of Reagional Research Laboratory, council of Scientific and industrial research. Jammatawi.Vol.1: Pp.1-10.
16. Jin, Y.;Jin, C. H. and Row, K. H. (2006). Separation of catechin compounds from different teas. Center for Advanced Bioseparation Technology, Department of Chemical Engineering, Inha University, Incheon, Korea. Biotechnology Journal 1(2): P 209-213.
17. Row, K. H. and Jin, Y. (2006). Recovery of Catechin compounds from Korean tea by solvent extraction. Bioresource Technology, 97, (5): pp. 790-793.
18. Mukhtar, A. and Ahmed, N. (2000). Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health. Am. J. Clin. Nutr., 1:16985 – 17025.

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional