

استخلاص الكاتشين من الشاي الاخضر *Camellia sinensis* Extraction of Catechin from green tea plants *Camellia sinensis*

نزار ادور ناصر*

ياسر عادل جبار*

عصام فاضل الجميلي

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* باستخدام طريقة الفصل بالتجزئة ، اذ تم الاستخلاص اولاً بالماء الحار ثم تجزئة المستخلص على مرحلتين الاولى خلطه مع الكلورفورم وبعدها تم الحصول على 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 والتأكد منها باستخدام الكواشف الكيميائية وكذلك تقنية الطبقة الرقيقة (TLC) وكانت مقدار الحركة النسبية للمركب 0.92 عند استخدام محلول الفصل حامض الخليك: كلورفورم (9:1) اما درجة الانصهار فقد بلغت 120م وقد تم تشخيص المركب باستخدام تقنية كروماتوغرافيا السائل الكفائية (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°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 تخميراً كاملاً وتخيز وتجفف لتحضير الشاي الاسود ، في حين تعرض الاوراق للبخار لتنشيط فعاليته انزيم البولي فينول اوكسيداز (PPO) ثم تجفف لتحضير الشاي الاخضر . اما النوع الثالث Oolong tea فيحضّر برص الاوراق بعد تذليلها وتخمر جزئياً ثم تجفف [2] . يفيد الشاي الاخضر في زيادة القدرة على مكافحة الأمراض ويخفض من مستوى الكوليسترول ويحافظ على سيولة الدم ويقاوم حدوث الجلطات ويحتوي الشاي الاخضر على نسبة جيدة من معدن الفلورين المعروف بمفعولة المقاوم لتسوس الأسنان ويكافح الأورام السرطانية إذ يمنع نمو الأوعية الدموية التي تغذي هذه الأورام عليها وتساعد على البقاء والنمو ، ويتميز أيضاً بمفعوله المضاد للأكسدة أي المحافظ على الخلايا من المواد المدمرة ويعمل على خفض ضغط الدم المرتفع وذلك لأنه يؤدي لاسترخاء العضلات المتحكمة في درجة قبض الشرايين ، كما ويمتلك فعالية ضد مايكروبية [3] . تحوي اوراق الشاي مجاميع كيميائية عدة ، قسم منها مجاميع فعالة حيويًا تتمثل بـ القلويدات البيورنية purine alkaloids التي تضم :

Key words: Green tea, Catechin, HPLC, TLC

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 ، بالإضافة 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 (100،25) مرة عن الفعالية المضادة للاكسدة لفيتامين C و E 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 المحفوظة داخل اكياس مغلقة 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 هو الشاي 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 بواسطة جهاز المبخر الدوار لحن الحصول على سائل كثيف بعدها وضع في الحاضنة 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 الموصوفة من قبل [7] والراتنجات والصابونينات وفقا للطرائق الموصوفة من قبل Shihata [8] والكلايكوسيدات حسب الطريقة الموصوفة من قبل الشيخلي وجماعته [9] والتربينات والسترويدات ووفقا للطرائق الموصوفة من قبل [10] والتانينات حسب الطريقة الموصوفة من قبل [7] و الفلافونات حسب الطريقة الموصوفة من قبل [11] و الكومارينات حسب الطريقة الموصوفة من قبل [12] و الزيوت الطيارة حسب الطريقة الموصوفة من قبل [13] .

فصل مركبات (catechin) الفعالة Separation of catechin compound

استخلصت وفصلت المركبات الفعالة الرئيسة (catechines) من اوراق الشاي الاخضر تبعاً للطريقة الموصوفة من قبل [7] . والتي تضمنت مرحلتين ، في المرحلة الاولى خلط 50غم من اوراق الشاي الاخضر المجففة 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 الكلورفورم الى المزيج في قمع فصل بنسبة 1:1 (حجم مستخلص : حجم الكلورفورم) ، وخطل المزيج جيدا وترك لمدة ساعة لانفصال طورين إذ يمثل الطور العلوي الطبقة المائية ، والطور السفلي يعود لطبقة الكلورفورم . بعدها نقلت الطبقة العلوية لوعاء نظيف ، وتم التخلص من الطبقة السفلى (طبقة الكلورفورم) ، تمت تنقية الطبقة العليا من المركبات ذات القطبية الواطئة بأضافة خلاص الاثيل الى الطبقة في قمع فصل بنسبة 1:1 (حجم مستخلص : حجم خلاص الاثيل) . خلط المزيج جيدا وترك لمدة 24 ساعة لانفصال طورين إذ يمثل الطور العلوي طبقة خلاص الاثيل ، والطور السفلي تمثل الطبقة المائية ، بعدها تم التخلص من الطبقة العليا (طبقة خلاص 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 للتأكد من مركب الكاتشين فقد اجري الكشف عن مركب التانينات والفلافونات والفينولات والتربينات والسترويدات وفق الطرق الموصوفة في الفقرة السابقة .

الكشف عن مركب الكاتشين (Catechin) باستخدام تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة Thin Layer Chromatography :

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 للأشعة فوق البنفسجية عند الطول الموجي (254) نانوميتر . حسب قيمة R_f للبقع المفصولة لكلا المحلولين وحسب المعادلة :

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

المسافة التي قطعها المذيب

قياس درجة الانصهار Melting point

تم فحص درجة الانصهار الكاتشين بواسطة استخدام جهاز درجة الانصهار Melting Point Apparatus . تشخيص مركب الكاتشين بواسطة تقنية (FTIR)

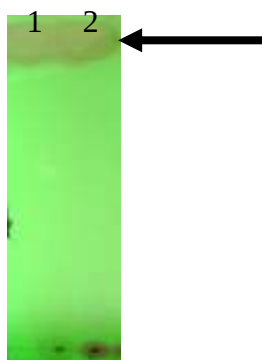
تم عمل قرص من الـ (KBr) للمركب المنقى الكاتشين وأخذ الطيف له ، وتم مقارنته مع المركب القياسي .

تشخيص مركب الكاتشين بواسطة تقنية جهاز كروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة High-Performance liquid Chromatography

تم تشخيص المركب الكاتشين باستخدام جهاز كروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة في وزارة الصناعة والمعادن / شركة ابن سينا العامة وحسب الطريقة الموصوفة من قبل [14] وتحت الظروف الآتية: نوع العمود C18 وطول العمود (0.460×25) نانوميتر ومعدل الجريان 0.4 مليلتر / دقيقة ، اما الطور المتحرك فكان الاسيتونائيتريت 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 باستخدام 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 الانموذج 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 قطبياً [3] . سوف تكون حسيطة 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 لتتفكك مركب الكاتشين من المركبات الغير قطبية او ذات القطبية الواطنة . فقد تم الحصول على مادة بنية اللون غامقه جداً تخلص من اللزوجة بعد تركيز الطبقة المائية بجهاز المبخر الدوار . تم الكشف التمهيدي للمادة المتحصل عليها (بنية اللون غامقة) باستعمال 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 ما جاء به [15،16] . 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 الحديدك لون ازرق مخضر، وكانت درجة انصهاره (120) م ، حيث كانت مساوية لقيمة درجة انصهار المركب القياسي .



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

1. المركب القياسي 2. المركب المنقى

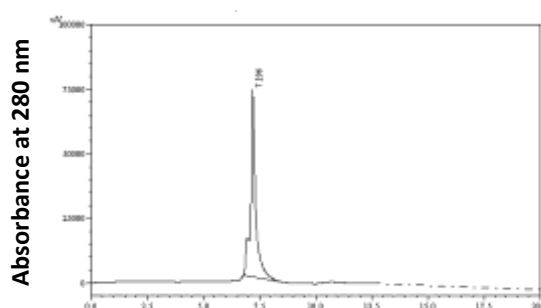
الكشف الكيميائي عن مركب الكاتشين

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 الكيميائية 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) .

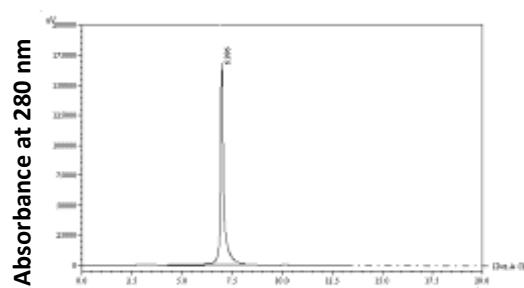
جدول (1): الكشف الكيميائي للمركبات الفعالة في المستخلص المائي الحار لأوراق الشاي الاخضر

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

كروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة HPLC تم معرفة درجة نقاوته باستخدام تقنية كروماتوغرافيا السائل الفائقة الكفاءة (HPLC) ، حيث استردت مكونات المستخلص من عمود C-18 (0.46×25cm) 5µm كروماتوغرافيا السائل الفائقة الكفاءة باستخدام الطور المتحرك والمكون من الاسيتونايتريل وحامض



شكل (3) : تقنية كروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة HPLC في قياس امتصاصية (Catechin) القياسي



شكل (2): تقنية كروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة HPLC في قياس امتصاصية (Catechin) المستخلص من الشاي الاخضر

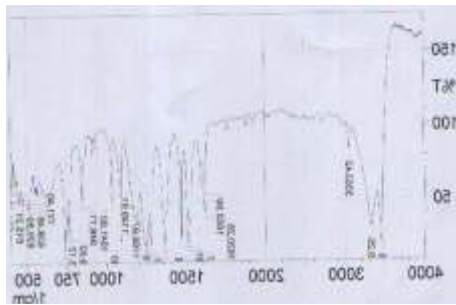
الخليك ونسبة (30:70) لمدة (20-0) دقيقة بظهور قمة واحدة لمركب الكاتشين (Catechin) المنقى مما يشير

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 (3،2) . حيث كانت نسبة المركب المنقى 100% وكانت النسبة مطابقة لنسبة المركب القياسي . ان هذه النتيجة تؤكد الكشف 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] .

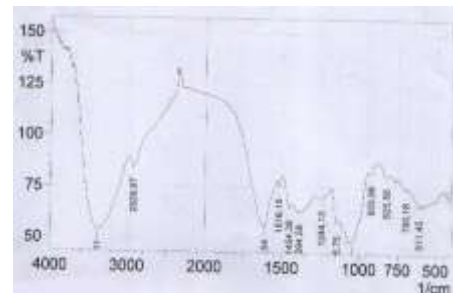
تشخيص مركب الكاتشين بوساطة تقنية (FTIR)

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

- 3387 cm^{-1} قمة عرضية تعود لامتصاص مجاميع (OH) الكحولية.
- 2929 cm^{-1} ، 2890 cm^{-1} 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 cm^{-1} قمتان تعود لامتصاص مجموعة (C=C) الاورماتية.
- 1049 cm^{-1} قمة واضحة تعود لامتصاص مجموعة (C-O-C) الاثرية. نلاحظ 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 (5): طيف الـ (FTIR) لمركب الكاتشين القياسي



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

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, Newjersey, pp: 701.

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 pharmlological study of Anagllis arvensis. M.D. Vet. Thesis, Cairo University.
11. الشبخلي ، 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 Scientifiic 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.