تشخيص المركبات الفينولية المستخلصة من الشاي بطريقتين الباردة والساخنة

عامرة محمد البلداوى رقيباء على جيجان جاسم محمد صالح
قسم علوم الاغذية والتقانة الاحيائية – كلية الزراعة – جامعة بغداد
مختبرات اللجنة الوطنية لتسجيل واعتماد المبيدات – وزارة الزراعة

المستخلص

استخلصت المركبات الفينولية من الشاى باستخدام الميثانول (80%) وبطريقتين السحق البارد والغليان بوجود مكثف عاكس . اعطت الطريقة الساخنة تركيزا اعلى من المركبات الفينولية الكلية(600 ملغم/ 100 غم) بالمقارنة مع الطريقة الباردة التي كانت بواقع (593.75 ملغم/100 غم) وبدا ذلك واضحا فى نتائج الفصل بطريقتى كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) وكروماتوكرافيا السائل عالي الكفاءة (HPLC)اذ كانت القمم اكثر ارتفاعا والبقع اكثر وضوحا بالمقارنة مع مستخلص الطريقة الباردة . كانت ابرز المركبات الفينولية المشخصة فى المستخلصين هي حامض Tannic وحامض Gallic.

The Iraqi Journal of Agricultural Sciences, 36(5) : 159 – 164, 2005 Al-Baldawi *et al.*

IDENTIFICATION OF PHENOLIC COMPOUNDS EXTRACTED FROM TEA BY HOT AND COLD METHODS

A. M .Albaldawi **R. A. Chechan** **J. M. Saleh**
Food Sci . and Biotechnology Dept. Pessticide Laboratovies
College of Agric. -Univ. of Baghdad Ministry of Agriculture

ABSTRACT

Phenolic compounds were extracted from black tea using methanol (80%) by two methods : 5 min. cold grinding and 15 min . reflux boiling.The hot method showed a higher concentration of total phenolics (600 mg / 100g) ,while the cold method showed decrease in concentration. to 593.75 mg/100 g . Detection of hot method extract by TLC and HPLC methods showed higher peaks and clearer spots in comparison with cold method extract. Tannic acid and Gallic acid were the most common detected phenolic compounds in both extracts.

المقدمة

تضم المركبات الفينولية الشائعة فى الانسجة النباتية عددا كبيرا من المركبات التى تختلف فى تركيبها الكيميائى وفعالياتها الوظيفية (3). فى الوقت الذى أوضحت دراسات سابقة ان لهذه المركبات اثرا ضارا لما تسببه من تغير لونى فى الاغذية فضلا عن ارتباطها بالبروتينات (7) والعناصر المعدنية المهمة كالحديد والنحاس (5) مسببة فى كلتا الحالتين انخفاضا فى القيمة الغذائية فقد اشارت دراسات اخرى الى اهمية هذه المركبات فى مقاومة التلف المايكروبى للانسجة النباتية (9).نتيجة لتوالى الدراسات حول هذه المركبات ثبت ان لها ادوارا مهمة تتضمن دورها مانعات طبيعية للاكسدة Natural antioxidants (11) وتاثيرها المضاد للمايكروبات (3) فضلا عن دورها كعوامل حماية ضد الاصابة ببعض الامراض السائده كامراض القلب والسرطان (6).

يتناول الفرد العراقى يوميا العديد من المصادر الغذائية الغنية بالفينولات كالفاكهه والخضر والتوابل والحبوب فضلا عن تناوله اليومى للشاى الذى يعد من اغنى المصادر بالمركبات الفينولية(5) .تاتى الفعالية الوظيفية لهذه المركبات من تركيبها الكيميائى المتضمن لحلقة اروماتية حاوية على واحد او اكثر من مجاميع الهيدروكسى hydroxyl groups ويؤدى تبلمر الجزيئات الصغيرة منها اما فى الانسجة النباتية او اثناء العمليات التصنيعة (كما هو الحال فى تخمير الشاى) الى تكوين بوليمرات كبيرة ذات اوزان جزيئية مرتفعة بحدود 5000 كيلودالتون. قسمت المركبات الفينولية الى الاحماض الفينولية Phenolic acids والفلافونويدات flavonoids والمركبات المتبلمرة

*تاريخ استلام البحث 2004/8/14 ، تاريخ قبول البحث 2005/7/4

المعقدة (polyphenols) ذات الاوزان الجزيئية المرتفعة الناجمة من تبلمر الفلافونويدات بمفردها او من ارتباطها مع الاحماض الفينولية(2) وبالنتيجة فانها تكون غنية بمجاميع الهيدروكسي فضلا عن ازدياد فعاليتهاالوظيفية(1) . لقد وجد Hurell واخرون (5) ان لفينولات الشاى فعالية اكثر من فينولات القهوة فى ربط ايونات الحديد بالاعتماد على طبيعة الاستخلاص ولهذا فقد استهدف هذا البحث دراسة وتشخيص المركبات الفينولية فى المستخلص الكحولى للشاى والمحضر بطريقتين كمقدمة لدراسة خصائصها الوظيفية .

المواد وطرائق العمل

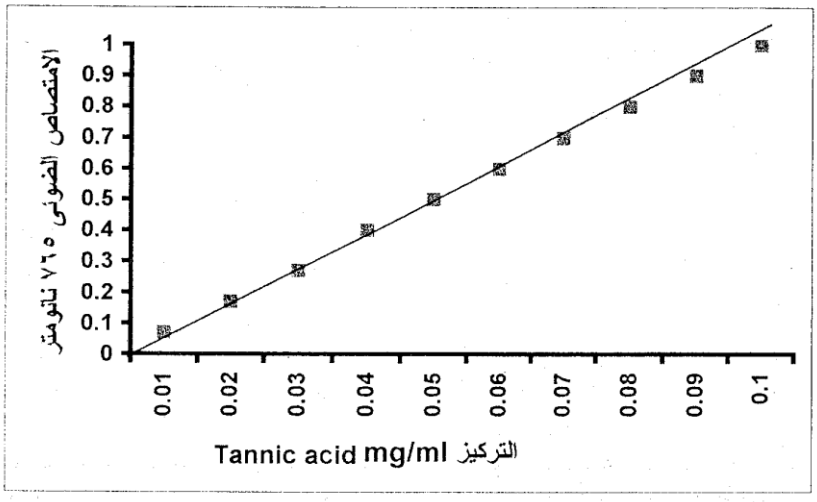
استعملت فى البحث عينات الشاى المتوفرة لدى وكلاء توزيع الحصص الغذائية وهو خليط من مناشئ مختلفة .

اجرى استخلاص المركبات الفينولية من عينة الشاى بحسب طريقة Yi واخرون (11) باستخدام الميثانول بتركيز 80% بطريقتين :-

أ-**الطريقة الباردة** : تم سحق 2غم من الشاى مع 10 مل من الميثانول 80 % فى هاون خزفى لمدة 5 دقائق ثم اجرى ترشيح المستخلص من خلال ورق ترشيح واتمان رقم 1 ثم بخر المذيب باستخدام جهاز المبخر الدوار وبدرجة حرارة 40 م .تم الاحتفاظ بالمستخلص الجاف فى قنينة زجاجية صغيرة محكمة الغلق وحفظ بالتجميد .

ب- ***الطريقة الساخنة*** : تم غليان 2غم من الشاى مع 10مل من الميثانول 80% باستخدام المكثف العاكس مدة 15دقيقة. ثم بعدها اجراء الترشيح وتبخير المذيب وحفظ النموذج كما فى الخطوة (أ).

تقدير الفينولات : تم تقدير تركيز الفينولات فى الشاى بحسب الطريقة الضوئية القياسية (10) باستخدام كاشف فولن Folin-Denis reagent وذلك بعد تخفيف المستخلصين المجففين باضافة 5 مل من الماء المقطر وبعد المزج والتجانس تم سحب 0.2 مل من كل مستخلص واضيف اليه 1مل من كاشف فولن فى انبوبة اختبار ثم اضيف 0.8 مل من كاربونات الصوديوم تركيزه 7.5% . بعد مزج الخليط جيدا باستخدام مازج الانابيب vortex تركت النماذج لمدة 30 دقيقة في جو المختبر بعدها تم قياس الامتصاص الضوئى على طول موجى 765 نانومتر. تم استخراج تركيز الفينولات بالملغم/مل من المستخلص من المنحنى القياسى . يبين الشكل (1)المنحنى القياسى لمحلول المركب الفينولى Tannic acid بعد تحضير محاليل منه بتراكيز تتراوح بين 0.01-0.1 ملغم/مل من الماء المقطر وقراءة الامتصاص الضوئى لها بعد سحب 0.2 مل من كل تركيز باتباع نفس الخطوات المذكورة انفا للطريقة ذاتها.



شكل 1. المنحنى القياسى لتقدير الفينولات بالطريقة الضوئية باستخدام حامض Tannic

تم استخراج تركيز الفينولات بالملغم /100غم من عينة الشاي بحسب المعادلة التالية:

$$\text{التركيز (ملغم/100 غم)} = \frac{\text{التركيز من المنحني القياسي (ملغم/مل) x التخفيف}}{\text{وزن العينة}} \times 100$$

فصل المركبات الفينولية فى مستخلص الشاى بطريقة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC

اتبعت طريقة Lea(8) فى فصل المركبات الفينولية التى تم استخلاصها من الشاى بالطريقتين الباردة والساخنة وذلك بتحضير محاليل بتركيز 2% مذابة بالميثانول (80%) للمستخلصين المجففين وللمركبات الفينولية القياسية الاتية :

Caffeic acid ,Tannic acid, 3,4dihydroxybenzoic acid ,Catechol Gallic acid

تم وضع نقاط بحجم 5 مايكروليتر من النماذج القياسية ومستخلصات الشاى على سطح مادة الطور الثابت للطبقة الرقيقة سليكا جل ثم تركت بقع النماذج لتنتشر صعودا مدة 3 ساعات فى داخل كابينة تحتوى على خليط المذيبات (الاسيتون:تولوين:حامض الفورميك) بالنسب (10:30:60)، بالتتابع وبعد اتمام عملية الفصل الصاعد جففت الطبقة الرقيقة بالهواء وتم الكشف عن البقع المفصولة بتسليط الاشعة فوق البنفسجية عليها فى داخل كابينة خاصة وحساب قيمة Rf للبقع الفصولة بحسب المعادلة:

$$Rf = \frac{\text{المسافه التي تحركتها البقع (بالملمتر)}}{\text{المسافة التي تحركها المذيب(بالملمتر)}}$$

فصل المركبات الفينولية فى مستخلص الشاى بوساطة جهاز الكروماتوكرافى السائل عالي الكفاءة HPLC

استخدم جهاز الكروماتوغرافى السائل عالى الكفاءة HPLC فى فصل المركبات الفينولية المستخلصة بالطريقتى الباردة والساخنة وذلك باستخدام عمود الطور المعكوس ODS (18>) بابعاد 5×250 ملم ثم تشخيص المركبات المفصولة باستعمال كشاف الاشعة المرئية – فوق البنفسجية (UV- Visible)على طول موجى 254 نانومتر وباستخدام الطور المتحرك ميثانول :ماء مقطر :حامض الخليك بالنسبة الحجمية 8:42:50 ،بالتتابع تم تحضير محاليل بتركيز 1ملغم /2 مل من الكحول المثيلى تركيزه 80% من المستخلصات المجففة والنماذج القياسية للفينولات وهى: Catechol , Tannic acid ,Caffeic acid, Gallic acid لزرقها في الجهاز.

النتائج والمناقشة

استخلاص وتقدير تركيز المركبات الفينولية فى مستخلصات الشاي

بسبب وفرة مجاميع الهيدروكسى فى تركيب الفينولات فان المذيبات القطبية كالماء والكحول تعد من بين اكثر الوسائل المناسبة للاستخلاص ويعد الميثانول من افضل المذيبات للاستخلاص الكمى لعدد من المركبات الفينولية مثل الكاتكين catechin والايبى كالوكاتكين epigallo catechin (11) وهى من مركبات الفينولات المعقدة التى يتوقع ارتفاع تركيزها في الشاي الاسود الذي تعرض لعملية تخمير وبالتالي ارتفعت نسبة المركبات الفينولية المتبلمرة ذات الاوزان الجزيئية المرتفعة فيه (5) .ان استخدام محلول ميثانول يحتوى على نسبة 20% من الماء يساعد في فصل الفينولات الكلية .ويبين جدول1 ان الطريقة الباردة اعطت تركيزا مقداره593.75 ملغم /100غم شاي بينما اعطت الطريقة الساخنة ناتجا اعلى نسبياً (600 ملغم /100غم شاي)

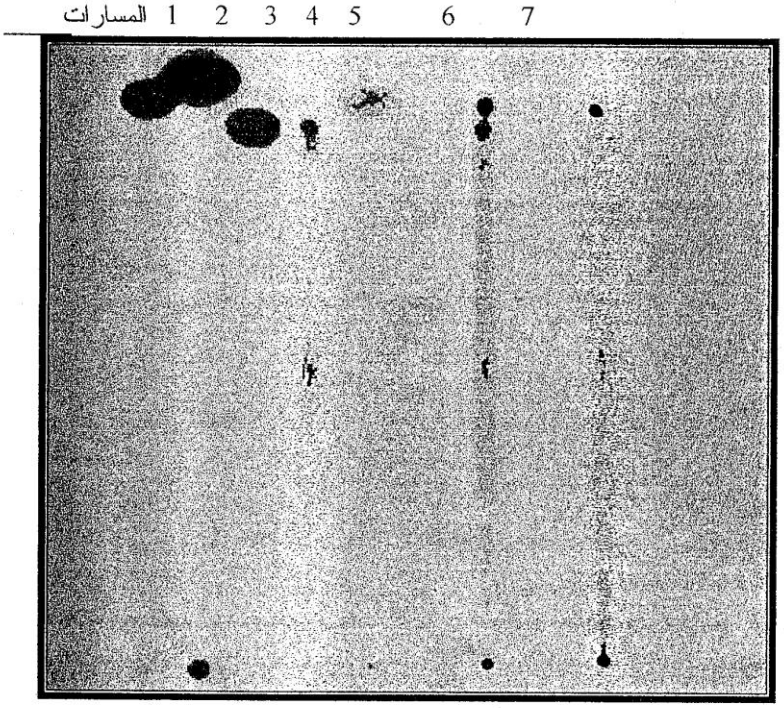
جدول 1. تركيز الفينولات الكلية المستخلصة من الشاي بطريقتين

الطريقة			
الباردة		بعد الغليان	
ملغم/100غم شاي	ملغم/لتر مستخلص	ملغم/100غم شاي	ملغم/لتر مستخلص
593.75	475	600	480

من المتوقع ان يكون ناتج الاستخلاص بالطريقة الباردة اقل مقارنة مع الطريقة الساخنة الا ان الطريقة الباردة ربما تكون اكثر كفاءة في المحافظة على طبيعة المركبات الفينولية فى الوقت الذى ربما تسبب الطريقة الساخنة مع زيادة الفترة الزمنية للغليان اكسدة المركبات الفينولية وفقدانها بعض خصائصها المهمة (11).

فصل المركبات الفينولية قى الشاى بكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC

اظهرت البقع المنفصلة للمركبات الفينولية القياسية وبقع مستخلص الشاي لونا بنيا واضحا بتعرضها للضوء مع مرور الوقت بعد انتهاء عملية الفصل وهذا مطابق لما بينه Lea(8) الذي استخدم نفس نظام مذيبات الفصل (الاستون :تولوين:حامض الفورميك). يوضح الشكل (2) طبيعة انفصال بقع المركبات الفينولية القياسية وبقع مستخلصات الشاي على سطح الطبقة الرقيقة اذ اعطت بقعة حامض Caffic (المسار1) المنفصلة تألقا واضحا تحت الاشعة فوق البنفسجية



شكل 2 . فصل المركبات الفينولية القياسية (1: caffeic acid ،2:catechol ،3:gallic acid 4: tannic acid 5: 3,4 dihydroxy benzoic acid) وفصل مستخلص الشاي (6: بالطريقة الساخنة،7: بالطريقة الباردة) بوساطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) وباستخدام خليط المذيبات الصاعد (الاستون :تولوين :حامض الفورميك) بالنسب (60: 30 :10)

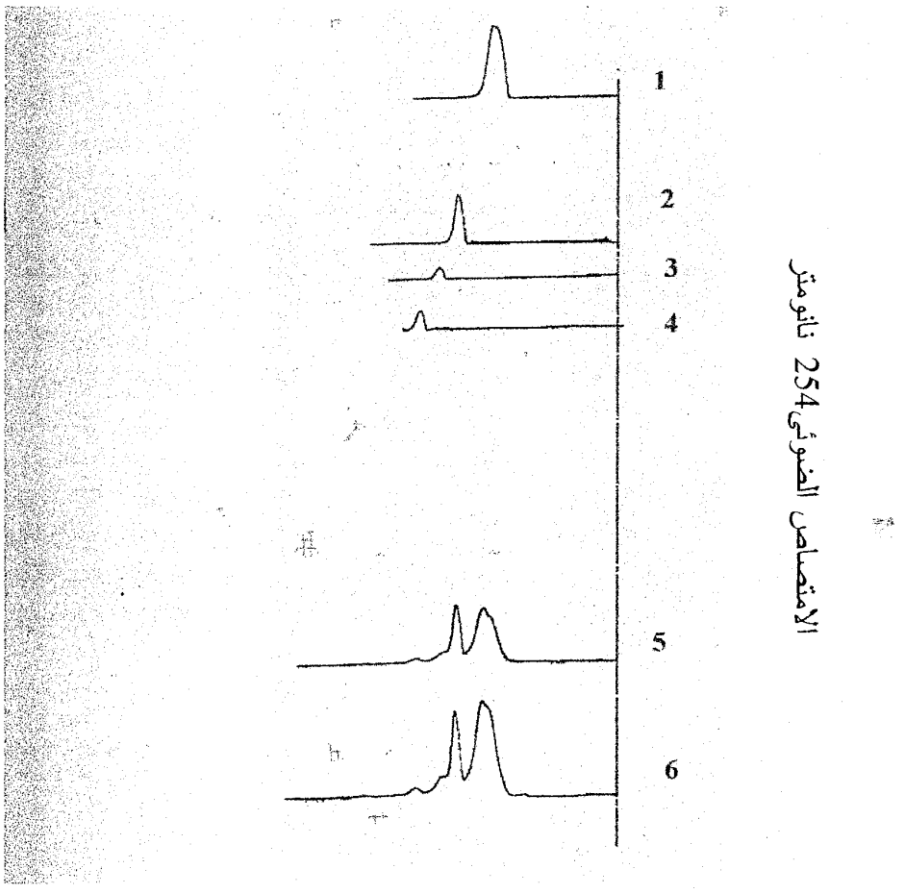
كما اظهرت واحدة من البقع المنفصلة لمستخلص الشاى بالطريقتين الباردة والساخنة تألقا مماثلا وكان لهذه البقعة المتالقة قيمة Rf مطابقة لقيمة حامض caffeic (جدول2) .

جدول 2. قيم Rf لبقع المركبات الفينولية القياسية والبقع المنفصلة من مستخلص الشاي المحضر بالطريقة الباردة والساخنة لكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة

النماذج القياسية	Rf البقع	مستخلص الشاي	Rf البقع
Gallic acid	0.83	بالطريقة الباردة	0.45
Tannic acid	0.45		0.85
	0.83		
Catechol	0.90	الطريقة الساخنة	0.45
Caffeic acid	0.85		0.78
3,4dihydroxy benzoic acid	0.86		0.83
			0.85

اما بقعة حامض Tannic القياسية فقد انفصلت الى بقعتين الأولى ذات Rf واطئ (0.45) (جدول 2) للدلالة على الوزن الجزيئى المرتفع لهذا المركب المعقد وقد ظهرت في مستخلصين. اما البقعة الثانية فقد ظهرت في مستخلص الشاي بالطريقة الساخنة بينما لم تظهر في مستخلص الشاي بالطريقة الباردة وهى ذات قيمة Rf مطابقة لقيمة Rf حامض Gallic القياسي (جدول 2) .ان هذا يؤكد ماذكره Hurell واخرون(5) من احتواء الشاي على نسبة مرتفعة من جزئيات حامض Gallic المؤسترة مع الكلوكوز والتى يمثل حامض Tannic. كما ظهر في فصل مستخلص الشاي بالطريقة الساخنة بقعة مجهولة لها قيمة Rf (0.78) (جدول 2) لم يتم استخلاصها بالطريقة الباردة .لقد بينت عملية الفصل بكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة تشابها بين المستخلصين مع بيان كفاءة عملية الاستخلاص الحرارى في اعطاء وضوحا في البقع المنفصلة وزيادة في عددها ،كما لم تظهر طريقة الفصل بكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة او نظام المذيب المستخدم وجود مركبات اخرى كالكاتيول او 3,4 dihydroxybenzoic acid والتى تعد مركبات فينولية ممثلة للجزيئات ثنائية الهيدروكسى التي يتوقع وجودها في مستخلص الشاي.

فصل المركبات الفينولية في الشاي بجهاز كروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة HPLC



شكل 3. الفصل بكروماتوغرافيا السائل عالى الكفاءةHPLC باستخدام كشاف (uv- visible) على طول موجى 254 نانومتر لمستخلص الشاى بالطريقة الباردة (5) والساخنة (6) وباستخدام المركبات الفينولية القياسية : (1)tannic acid ، (2) gallic acid، (3) catechol، (4) caffeic acid .

يبين شكل (3) تشابها في طبيعة انفصال المستخلصين والتي تتطابق مع القمم الواضحة للنماذج القياسية المستخدمة تبين من الشكل ظهور قمتين بارزتين من Tannic acid وgallic acid في المستخلصين وهذا يؤكد ما ذكره Hurrell واخرون(5) من توافر المركبات المعقدة ذات الاوزان الجزئية المرتفعة في الشاي الاسود والناجمة عن ارتباط gallic acid مع باقي المركبات الفينولية ، الا ان مخطط انفصال مستخلص الطريقة الساخنة للمركبات الفينولية اظهر ارتفاعا واضحا في قمتي الحامضين tannic و gallic بالمقارنة مع مستخلص الطريقة الباردة ، كذلك اظهر مستخلص الطريقة الساخنة قمة صغيرة مجهولة لم تظهرها الطريقة الباردة وهذا يشير الى ان الطريقة الساخنة تساعد في استخلاص المركبات الفينولية (شكل 3).

ان احتواء مستخلص الشاي بالطريقتين على المركبات الفينولية الغنية بمجاميع الهيدروكسي المتجاورة في المواقع (2,1) او(4,3) على الحلقة الاروماتية كما هو الحال في الكاتيكول (1,2 dihydroxy benzene) و gallic acid (3,4,5 trihydroxy benzoic acid) و cafficacid (3,4 dihdroxy cinnamic acid) فضلا عن وجود معقد tannic acid وهو المركب الفينولي الذى يحتوى على 10 جزئيات من gallic acid مرتبط باصرة استرية (1) كما اظهرت طريقتا الفصل المتبعتين في هذه البحث ان جميع هذه المركبات تمتاز بقابليتها الكلابية (chelating ability) (4) مما يعطى دلالة واضحة على الاهمية الوظيفية لهذه المستخلصات التى ربما يمكن اثباتها فى بحوث لاحقة.

المصادر

1-Brune , M ., L. Rossander and L. Hallberg. 1989. Iron absorption and phenolic compounds: Importance of different phenolic structures . European J . Clin. Nut. 43: 547-558

2-Clifford ,M.N. and J.R. Ramirez. 1991. Phenols and caffeic acid in wet processed coffee beans and coffee pulp. Food Chemistry 40: 35- 42

3-Fennema ,O.R. 1996 Food Chemistry. Marcel Dekker ,INC

4-Hudson ,B.J and J.I. Lewis .1983. Polyhydroxy flavonoid antioxidants for edible oils structural criteria for activity . Food Chem. 10:47-55

5- Hurrell, R.F. , Reddy and J. D. Cook. 1999. Inhibition of non –heme iron absorption in man by poly phenolic-containing beverages.British J. of Nutrition 81: 289-295.

6- Kinsella, J.E, E.N . Frankel , J.B. .German and J. Kanner .1993. Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods . Food Technol . 47:85-89 .

7- Lahiry ,N.L. ,L.D. Satterlee , H.W.Hsu and G .W . Wallace. 1977.Characterization of the chlorogenic acid binding fraction in leaf protein concentration.J. Food Sci. 42: 83-85.

8- Lea, A.G .1978 . The Phenolics of ciders : oligomeric and polymeric procyanidins. J.Sci.Food Agric . 29: 471-477

9- Malmberg, A. and O .Theander .1984. Free and Conjugated phenolic acids and aldehyes in potato tubers . Swedish J. Agric.Res . 14:119-125

10- Swain ,T. and W.E. Hillis .1959 .The Phenolic Constituents of Prunus domestica 1. The Quantitative analysis of phenolic constituents. J . Sci. Food Agric. 10:63-68

11-Yi , O, A.S .Meyer and E.N . Frankel.1997.Antioxidant activity of grape extracts in a lecithin liposome system.J.Am.O.Chem.S. 74:10:1301-1307 .