

تعیین ضرایب نفوذ محدود کننده در استخراج کافئین و چهار گونه از آنتی اکسیدانهای برگ سبز چای ایرانی

علی ضیاءالدینی، عباس جعفری جید، علی ذاکری

پژوهشکده توسعه صنایع شیمیایی ایران، تهران

برگ سبز چای حاوی آنتی اکسیدانهای ضد سرطان می باشد که می توان پس از استخراج، از آنها در تولید داروهای ضد سرطان، محصولات غذایی عملگر و محصولات بهداشتی - آرایشی استفاده کرد. در این تحقیق به بررسی سینتیک و ساز و کار استخراج این آنتی اکسیدانها پرداخته شده است. برای این منظور، ضرایب نفوذ هر یک از کاتچینهای EGC, EGCG, EC, C و کافئین موجود در برگ سبز چای ایرانی در عملیات استخراج این مواد به کمک آب محاسبه شده است. بر اساس مدل بکار گرفته شده دو نوع ضریب نفوذ داخلی و خارجی برای انتقال جرم از برگ سبز چای مالش داده شده در نظر گرفته شده است که با توجه به نتایج و محاسبات انجام شده، ضریب نفوذ مرحله داخلی که در درون ذرات چای اتفاق می افتد نقش محدود کننده فرآیند استخراج را دارد. علاوه بر این، مقادیر دما و زمان بهینه استخراج این مواد به صورت: کافئین (۸۰ درجه سانتی گراد، ۲۰ دقیقه)، C (۹۰ درجه - سانتی گراد، ۸۰ دقیقه)، EC (۸۰ درجه سانتی گراد، ۲۰ دقیقه)، EGC (۸۰ درجه سانتی گراد، ۲۰ دقیقه)، EGCG (۹۰ درجه سانتی - گراد، ۴۰ دقیقه)، به دست آمد.

مقدمه

چای پرمصرف ترین نوشیدنی بعد از آب در دنیا می باشد [۱ و ۲]. منشاء چای (*Camellia Sinensis*) در چین به چندین هزار سال قبل بر می گردد [۳]. کافئین، اسکوربات و کاتچینها ترکیبات عملگر موجود در چای می باشند [۴]. به طور کلی، برگهای سبز چای حاوی ۳۶٪ پلی فنول می باشند که در این میان کاتچینها بیشترین سهم را دارا می باشند [۳]. کاتچینها که در عصاره آبی برگهای خشک *Camellia Sinensis* وجود دارند، موجب تلخ مزگی چای می شوند [۱]. اخیراً، به دلیل اثرات سودمندشان بر سلامتی و نیز خصوصیت آنتی اکسیدانی [۵]، ضد موتاژنی، ضد توموری و ضدسرطانی کاتچینها توجه زیادی را در جامعه علمی و در میان عموم مردم به خود جلب کرده اند [۶].

کاتچینها به چهار ماده اصلی EGC^3 ، ECG^4 ، EC^5 و $EGCG^6$ و چهار ماده فرعی GC^7 ، CG^8 ، C^9 و GCG^{10} که ایزومرهای چهار ماده اصلی مزبور هستند، تقسیم می شوند [۴، ۵].

* مسئول مکاتبات: Jafari.Jaid@acecr.ac.ir

³ (-) epigallocatechin

⁴ (-) epicatechin gallate

⁵ (-) epicatechin

⁶ (-) epigallocatechin-3-gallate

در این پژوهش، اثر دما و زمان بر میزان استخراج و غلظتهای چهار کانتچین از برگهای سبز چای مالش داده شده بررسی گردیده‌اند. سپس، نمودارهای آزمایشگاهی با یک مدل ریاضی مشتق شده از قانون دوم فیک مورد تحلیل قرار گرفتند و ضرایب نفوذ این ترکیبات تحت شرایط دمای عملیاتی مختلف در آب محاسبه شدند [۷].

۲- مدل ریاضی

در مکانیزم انتقال جرم استخراج، جزء حل شونده متصل به شبکه جامد (توسط نیروهای فیزیکی یا شیمیایی) توسط انحلال به فاز حلال منتقل شده، سپس، مخلوط جزء حل شونده- حلال به سطح جامد نفوذ می‌کند و در نهایت از فیلم ساکن اطراف ذرات جامد عبور می‌کند تا به فاز حلال برسد.

از آنجا که محتویات ذرات جامد با زمان و فاصله تغییر می‌کند، ضریب نفوذ جزء حل شونده موجود در ذرات جامد را می‌توان با مشاهده تغییرات غلظت در مایع اطراف آن با زمان، تعیین کرد. به طور کلی انتقال جرم از فاز جامد به فاز مایع به دو مرحله تقسیم می‌شود. در مرحله اول (شستشو)، یک دوره استخراج با شدت ثابت و خیلی سریع وجود دارد که در آن انتقال جرم به صورت پایا می‌باشد و مقاومت فیلم، شدت انتقال جرم را محدود می‌کند. در مرحله دوم استخراج بسیار کمتر و به صورت ناپایا اتفاق می‌افتد. در این مرحله نفوذ در داخل ذرات جامد شدت فرآیند استخراج را محدود می‌کند. معمولاً نفوذ جزء حل شونده در داخل ذرات جامد به سمت حلال، مرحله محدود کننده انتقال جرم می‌باشد [۸].

نتایج به کمک یک مدل ریاضی که از قانون دوم فیک به دست آمده است، آنالیز شدند. این مدل بر فرضیات زیر مبتنی است [۹]:

- ۱- ذرات جامد به عنوان صفحات صاف با ضخامت $2L$ در نظر گرفته می‌شوند.
 - ۲- جزء فعال در ابتدا به طور یکنواخت در جامد وجود دارد.
 - ۳- محتوای جزء فعال در جامد با زمان و فاصله تغییر می‌کند.
 - ۴- استخراج جزء فعال در یک فرآیند دو مرحله ای با شدت ثابت و با کاهش شدت همراه است.
 - ۵- در سطح مشترک، تعادل ترمودینامیکی برقرار است.
 - ۶- جامد متخلخل به عنوان یک محیط شبه یکنواخت فرض می‌شود.
- معادله (۱) قانون دوم فیک را نشان می‌دهد:

$$D_j \left[\frac{\partial^2 C_j}{\partial x^2} \right] = \frac{\partial C_j}{\partial t} \quad (1)$$

که در آن C غلظت در داخل یک صفحه تخت، x فاصله از مرکز صفحه و t زمان را نشان می‌دهد. شرایط مرزی و اولیه به صورت زیر هستند:

$$t=0; -L \leq x \leq L; \quad C=C_0$$

$$t>0; x=\pm L; \quad C=C_i=0 \quad (\text{محتوای ثابت در سطح مشترک})$$

⁷ (+) gallate catechin

⁸ (-) catechin gallate

⁹ (+) catechin

¹⁰ (-) gallo catechin gallate

$$\left(\frac{\partial C}{\partial x}\right)_{t>0; x=0} = 0 \quad (\text{تقارن در سیستم})$$

تقریب قانون دوم فیک از گرادیان غلظت در درون ذرات مواد اولیه بعنوان نیروی محرکه استخراج به جای اختلاف در پتانسیل شیمیایی استفاده می‌کند. تمایل یک ترکیب برای تغییر فاز با پتانسیل شیمیایی اندازه گیری می‌شود بنابراین آنالیز دقیقتری با کمک پتانسیل شیمیایی قابل انجام است. با وجود این، در صورتی که از عصاره‌های خیلی رقیق استفاده شود می‌توان از روش فیک استفاده کرد.

حل عمومی معادله فوق به روش سریهای فوریه منجر به معادله (۲) می‌شود:

(۲)

$$\frac{C - C_0}{C_i - C_0} = 1 - \left[\frac{4}{\pi} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{(-1)^n}{2n+1} \cos \frac{(2n+1)\pi x}{2L} \exp\left(-\frac{(2n+1)^2 \pi^2}{4L^2} Dt\right) \right]$$

که در آن C ، غلظت در هر لحظه در فاصله x از مرکز صفحه ($x=\pm L$) می‌باشد. با انتگرال گیری از غلظت بر روی ضخامت، مقدار جرم منتقل شده در هر لحظه (M) را می‌توان محاسبه کرد. جرم منتقل شده در لحظه t نسبت به کل جرم منتقل شده در زمان بی نهایت (M_{∞}) به صورت زیر می‌باشد:

$$\frac{M}{M_{\infty}} = 1 - \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} \exp\left(-\frac{(2n+1)^2 \pi^2}{4L^2} Dt\right) \quad (۳)$$

بعد از زمان کوتاهی، تمامی عبارات موجود در عبارت مجموع به غیر از عبارت اول آن، قابل اغماض می‌شوند، در نتیجه با فرض اینکه جرم منتقل شده از صفحه در لحظه t با غلظت در محلول (C) برابر است، معادله زیر به دست می‌آید [۸]:

$$\ln\left(\frac{C_{\infty}}{C_{\infty} - C}\right) = 0.210 + \frac{9.87Dt}{4L^2} \quad (۴)$$

هنگامی که نمودار $\ln\left(\frac{C_{\infty}}{C_{\infty} - C}\right)$ نسبت به زمان رسم شود، نقاط بر روی دو خط مستقیم متقاطع قرار می‌گیرند. اولین خط،

شیب نسبتاً تند و دومین خط شیب نسبتاً کند دارد. نقاط تقاطع منحنی های $\ln\left(\frac{C_{\infty}}{C_{\infty} - C}\right)$ نسبت به t برای مراحل تند و کند، نقاط انتقال^{۱۱} نامیده می‌شوند [۸،۹].

اوزبورن و کتز در سال ۱۹۴۴ میلادی با مطالعه بر روی استخراج دانه های سویا متوجه شدند که باید دو فرآیند نفوذ موازی تند و کند در درون ذره جامد در نظر گرفته شود [۱۰].

روش استفاده شده توسط آنها را می‌توان برای استخراج از ذرات مسطح به صورت معادله (۵) مورد استفاده قرار داد [۹].

$$\left(\frac{C_{\infty} - C}{C_{\infty}}\right) = \frac{8}{\pi^2} \left[f_1 \exp\left(-\frac{\pi^2 D_1 t}{4L^2}\right) + f_2 \exp\left(-\frac{\pi^2 D_2 t}{4L^2}\right) \right] \quad (۵)$$

که در آن:

f_1 و f_2 اجزائی از حل شونده می‌باشند که به ترتیب با ضرایب نفوذ D_1 و D_2 استخراج می‌شوند.

¹¹ Transition points

در مرحله استخراج با شیب تند، $f_1 \exp(-\frac{\pi^2 D_1 t}{4L^2})$ قابل صرف نظر می‌باشد، لذا رسم منحنی \ln تابع نسبت به زمان، مقادیر D_2 و f_2 را مشخص می‌کند (اگر C_∞ به طور مجزا مشخص شده باشد). از سوی دیگر، در مرحله استخراج با شیب کند، $f_2 \exp(-\frac{\pi^2 D_2 t}{4L^2})$ نزدیک به یک می‌شود و D_1 و f_1 را می‌توان مشخص کرد [۹۸].

۳- مواد و روشها

۳-۱- مواد

برگهای سبز چای مالش داده شده از مزرعه‌ای در فومن (با طول جغرافیایی ۴۹ درجه و ۲۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه و عرض ۳۷ درجه و ۱۲ دقیقه و ۳۰ ثانیه) تهیه شدند و مواد مرجع و استاندارد از شرکت سیگما خریداری شدند: کافئین (E0750)، EGCG (E4018)، EC (E4018)، ECG (E3893)، EGC (E3768).

تمامی حلالهای مورد استفاده به منظور انجام آزمایشها استخراج و آنالیز از شرکت مرک خریداری شدند. لازم به ذکر است که در این تحقیق از آب دوبار تقطیر شده استفاده شده است.

۳-۲- روش آزمایش

آزمایشهای استخراج از برگ سبز چای مالش داده شده در ارلنهای ۲۵۰ میلی لیتری انجام شدند، به این صورت که در هر یک از آزمایشها ۴ گرم برگ سبز چای له شده با کمک ۲۰۰ میلی لیتر آب دوبار تقطیر شده در شرایط دما و زمان مختلف مورد استخراج قرار گرفت. طراحی آزمایشها براساس روش فاکتوریل کامل در دماهای (۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰) درجه سانتیگراد و زمانهای (۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰) دقیقه انجام شد. نمونه‌های حلال ابتدا با کمک فیلتر ۰/۴۵ میکرون فیلتر شدند و سپس با کمک دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مورد آنالیز قرار گرفتند که شرایط آنالیز مطابق با روش وانگ و همکارانش می‌باشد [۱۱].

۴- نتایج و بحث

۴-۱- سینتیک استخراج

در تحقیق حاضر، تاثیر دما بر سینتیک استخراج آنتی‌اکسیدانهای برگ سبز چای ایرانی مورد مطالعه قرار گرفته است. بعلاوه، محاسبات به گونه‌ای انجام شد که ضرایب نفوذ برای ترکیبات پلی‌فنولی و کافئین چای در حین استخراج از برگهای چای سبز مالش داده شده، برای هر دو مرحله استخراج تند و کند تعیین شوند. این دو مرحله شامل یک مرحله شدت ثابت همراه با یک مرحله با شدت کم شونده می‌باشند که ضرایب نفوذ در آنها به ترتیب $D_{تند}$ و $D_{کند}$ می‌باشند. این دو خصوصیت را می‌توان با رسم نمودارهای لگاریتم طبیعی غلظت (معادله ۵) نسبت به زمان، نشان داد.

با توجه به شکل (۱) واضح است که در تمامی موارد، در شروع فرآیند، میزان استخراج (بازدهی استخراج) به سرعت افزایش می‌یابد و سپس از شدت آن کاسته می‌شود. تغییرات شدید اولیه را می‌توان به بازیافت جزء حل شونده از سطح گیاه و مرحله آرام بعدی را به استخراج جزء حل شونده ذخیره شده در فضاهای داخلی گیاه نسبت داد.

۴-۲- تاثیر دما بر سینتیک استخراج

معمولاً دما اثر مثبت بر بازدهی و شدت استخراج دارد، البته در صورتیکه دما خیلی بالا نباشد چون در دماهای بالا بعضی از مواد فعال تجزیه می‌شوند.

به منظور بررسی تاثیر دما بر سینتیک استخراج پلی فنولها و کافئین از چای، غلظت این ترکیبات در محلول استخراج در دماهای ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰ و ۹۰ به عنوان تابعی از زمان رسم شدند (شکل ۱). پارامترهای محاسبه شده فرآیند نفوذ برای مراحل تند و کند، با استفاده از معادله (۵) محاسبه و در جدول (۱) ارائه شده اند.

همانطور که مشاهده می شود، در بازه دمایی مورد بررسی، هیچکدام از اجزاء موجود در چای تجزیه نشدند. نتایج به دست آمده نشان می دهند که با افزایش دما بازدهی استخراج کاتچین (C) افزایش می یابد (شکل ۱-الف). علاوه بر این، با افزایش دما، از ۵۰ تا ۷۰ درجه سانتیگراد $D_{تند}$ و $D_{کند}$ ثابت و از ۷۰ تا ۹۰ درجه سانتیگراد افزایش می یابد (شکل ۲). بازدهی استخراج EGCG نیز مانند کاتچین (C) با افزایش دما شدیداً افزایش می یابد (شکل ۱-ه). لازم به ذکر است که $D_{تند}$ مربوط به این ماده با افزایش دما از ۵۰ تا ۶۰ درجه شدیداً کاهش می یابد و سپس ثابت می ماند و $D_{کند}$ مربوط به آن در فاصله دمایی ۶۰ تا ۷۰ درجه افزایش می یابد و سپس به مقدار اولیه باز می گردد (شکل ۲). همان گونه در شکل (۱-ب) مشاهده می شود، با افزایش دما از ۵۰ تا ۸۰ درجه سانتیگراد بازدهی استخراج EGC نیز افزایش می یابد در حالی که با افزایش بیشتر دما تا ۹۰ درجه بازدهی کاهش می یابد.

با توجه به شکل (۲) $D_{کند}$ برای EGC از ۵۰ تا ۷۰ درجه ثابت و سپس با افزایش دما به میزان کمی کاهش می یابد. این در حالی است که $D_{تند}$ مربوط به این ماده تقریباً ثابت می باشد. از نمودار تغییرات غلظت EC (شکل ۱-ج) نسبت به زمان در دماهای مختلف مشاهده می شود که با افزایش دما از ۵۰ تا ۷۰ درجه بازدهی استخراج افزایش سپس از ۷۰ تا ۸۰ درجه کاهش و با بالاتر بردن دما دوباره بازدهی کاهش می یابد. نمودار $D_{تند}$ مربوط به این ماده نیز با افزایش دما تغییر چندانی را نشان نمی دهد، ولی $D_{کند}$ با افزایش دما از ۸۰ تا ۹۰ درجه به میزان قابل ملاحظه ای کاهش می یابد (شکل ۲).

نمودار تغییرات غلظت کافئین نسبت به زمان و دما افزایش بازدهی استخراج این ماده را با افزایش دما تا ۸۰ درجه و سپس کاهش بازدهی تا ۹۰ درجه را نشان می دهد (شکل ۱-د). علاوه بر این، همانطوری که نمودارهای $D_{تند}$ در شکل (۲) نشان می دهند، $D_{کند}$ برای کافئین در فاصله دمایی ۸۰ تا ۹۰ درجه کاهش می یابد و $D_{تند}$ نیز تقریباً ثابت می باشد. جدول (۱) ضرایب نفوذ محاسبه شده مربوط به اجزاء تشکیل دهنده چای را در دماهای مختلف نشان می دهد.

۵- نتیجه گیری

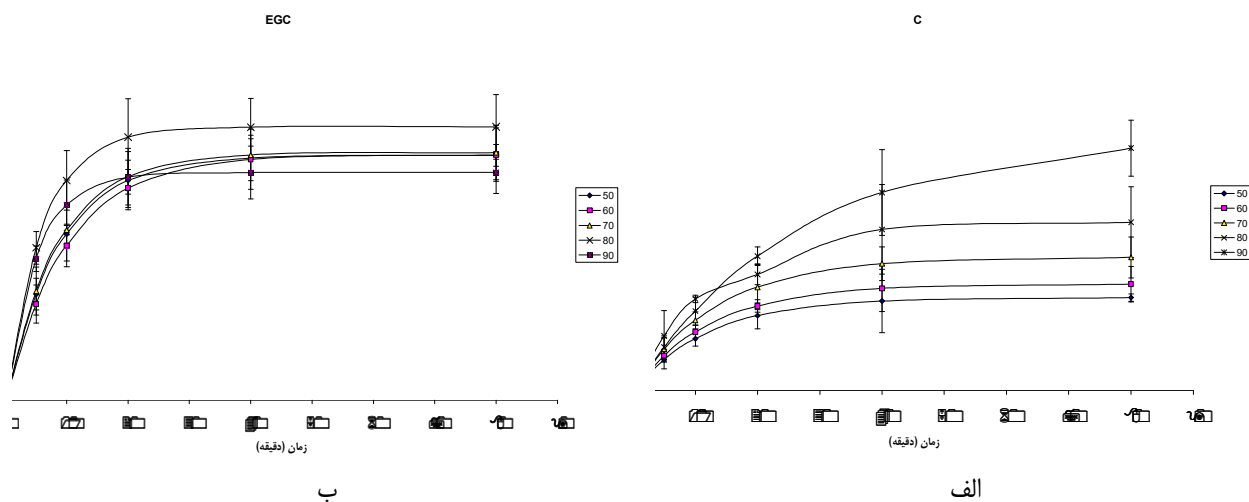
اطلاعات به دست آمده در مطالعه حاضر نشان می دهند که برگهای چای سبز مالش داده شده، غنی از پلی فنولهای مورد مطالعه و کافئین می باشند. مطالعات سینتیکی و نتایج تحلیلهای ریاضی نتایج آزمایشهای استخراج انجام شده، نشان می دهند که نفوذ درون ذره ای عامل تعیین کننده شدت استخراج می باشد. لذا، قطر ذرات گیاه، یک عامل تاثیر گذار بر سینتیک فرآیند استخراج می باشد. نتایج به دست آمده شرایط بهینه برای استخراج هر کدام از مواد فوق را به کمک آب به شرح زیر نشان می دهند: C (۹۰ درجه، ۸۰ دقیقه)، کافئین (۸۰ درجه، ۲۰ دقیقه)، EC (۸۰ درجه، ۲۰ دقیقه)، EGC (۸۰ درجه، ۲۰ دقیقه)، EGCG (۹۰ درجه، ۴۰ دقیقه).

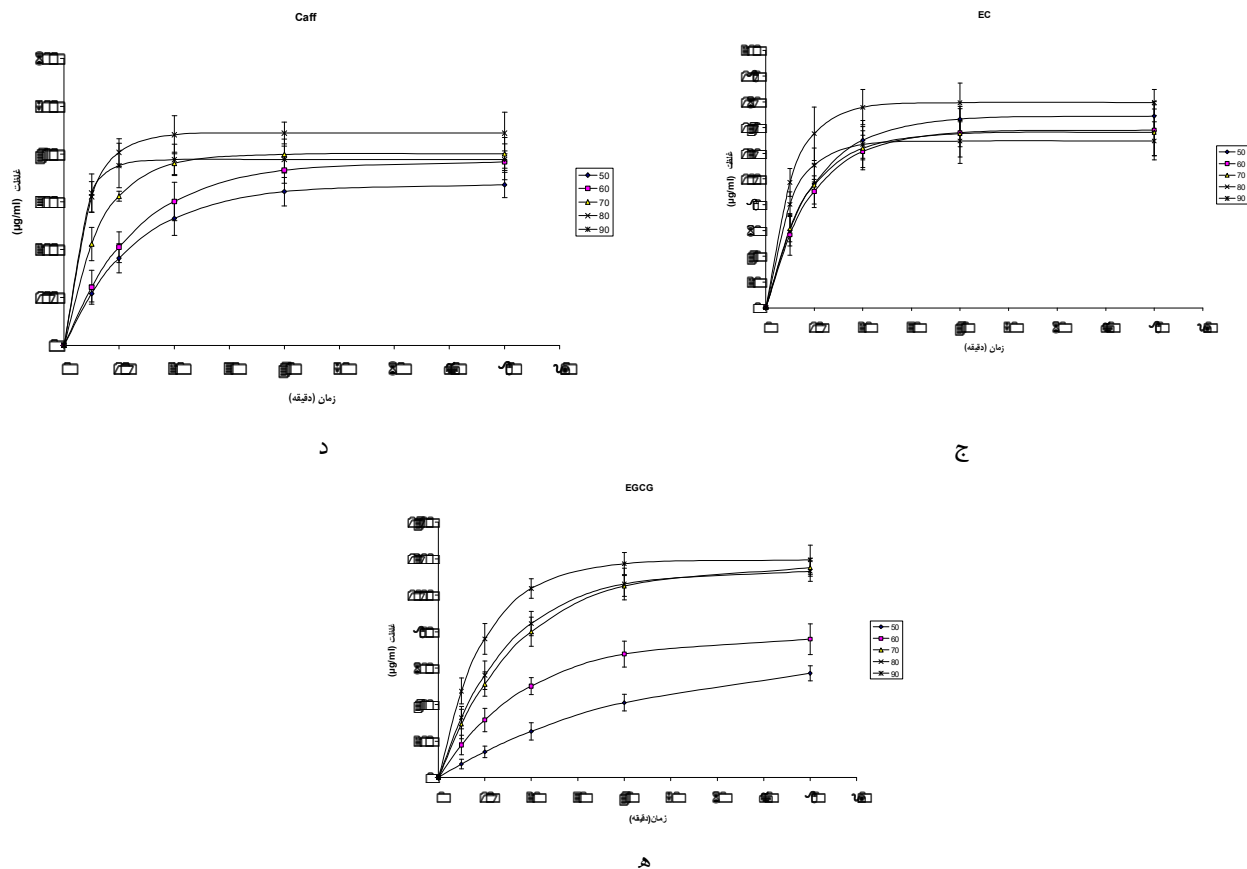
علاوه بر این، ضرایب نفوذ برای مراحل تند و کند محاسبه شدند که در جدول (۱) و شکل (۲) نسبت به دما ارائه گردیده اند.

۶- سپاسگزاری

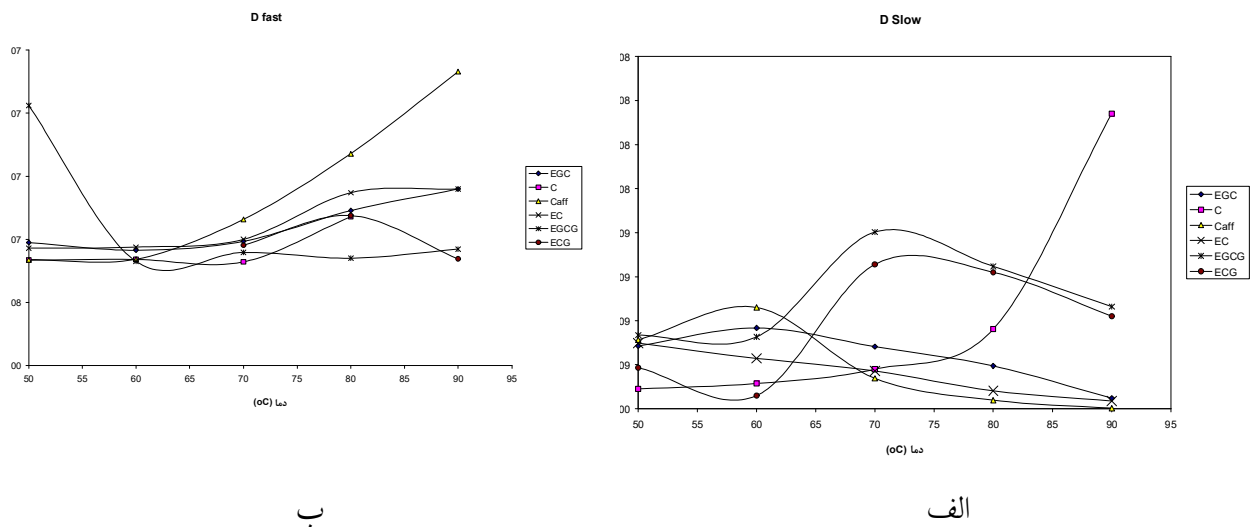
بدینوسیله از حمایتهای معاونت پژوهش و فناوری جهاد دانشگاهی جهت اجرای این پروژه قدردانی و تشکر به عمل می آید.

- [1] Wang H., Provan G. J., Helliwell K., 2000, Tea flavonoids: their functions, utilization and analysis, Trends Food Sci. Technol, 11.152-160
- [2] Goto T., Yoshida Y., 1999, Simultaneous analysis of individual Catechins and Caffeine in green tea, Meth. Enzymol, 299-107-113.
- [3] Uzunalic A. P., Skerget M., Knez Z., Weinreich V., Otto F., Gruner S., 2005, Extraction of active ingredients from green tea (*Camellia sinensis*): Extraction efficiency of major Catechins and Coffeine, Food chemistry, 96,4 , 597-605.
- [4] Yoshida Y., Kiso M., Goto t., 1999, Efficiency of the extractim of Catechins from green tea, Food chemistry, 67, 429-433.
- [5] Bauzinet L., labbe D., Tremblay A., 2007, production of green tea EGC- and EGCG- enriched fractions by a two- step extraction procedure, Separation and purification technology, 56, 53-56.
- [6] Chang, S. J., Lin, P. Z., Ding, L., Hu, X. Z., Oguni, I., Hara, Y., 1991, Inhibition of green tea extract on mutagenicity and carcinogenicity, In Proc. Of the Int'l symp. on tea Sci., 195-199.
- [7] Crank, J., 1975, the mathematics of diffusion. Oxford: oxford university Press.
- [8] Hojnik, M., Skerget, M., Knez, Z., 2008, Extraction of lutein from Marigold flower petals- experimental kinetics and Modelling, LWT-Food science and Technology, doi: 10.1016/j.lwt.2007.11.017.
- [9] Herodez, S. S., Hadolin, M., Skerget, M., Knez, Z., 2003, Solvent extraction study of antioxidant from balm (*Melissa officinalis* L.) leaves, Food Chemistry, 80, 272-282.
- [10] Osburn, J. O., Katz, D.L., 1944, Structure as a Variable in the application of diffusion theory to extraction. Transactions of the American Institute of chemical Engineers, 40,511-531.
- [11] Wang, H., Helliwell, K., You, X., 2000, Isocratic Elution system for the determination of Catechins, Caffeine and Gallic acid in green tea using HPLC, Food Chemistry, 68, 115-121





شکل ۱ - تغییرات غلظت کاتچینها و کافئین نسبت به زمان و دما در محلول استخراج
 الف) کاتچین (C) ب) EGC ج) EC
 د) کافئین (EGCG)



شکل ۲ - تغییرات ضرایب نفوذ مربوط به مراحل تند و کند هر یک از کاتچینها و کافئین نسبت به دما
 الف) تغییرات ضرایب نفوذ مرحله کند نسبت به دما
 ب) تغییرات ضرایب نفوذ مرحله تند نسبت به دما

جدول ۱- ضرایب نفوذ محاسبه شده کاتچینها و کافئین و تغییرات آنها نسبت به زمان

	دما (درجه سانتیگراد)	D_{int} ($cm^2 s^{-1}$)	D_{ext} ($cm^2 s^{-1}$)
EGC	50	2.86E-09	9.75E-08
EGC	60	3.67E-09	9.14E-08
EGC	70	2.83E-09	9.85E-08
EGC	80	1.94E-09	1.23E-07
EGC	90	4.80E-10	1.40E-07
C	50	9.00E-10	8.37E-08
C	60	1.15E-09	8.41E-08
C	70	1.79E-09	8.22E-08
C	80	3.62E-09	1.18E-07
C	90	1.34E-08	1.25E-07
Caff	50	3.14E-09	8.40E-08
Caff	60	4.60E-09	8.44E-08
Caff	70	1.38E-09	1.16E-07
Caff	80	3.90E-10	1.68E-07
Caff	90	2.70E-11	2.33E-07
EC	50	2.99E-09	9.31E-08
EC	60	2.29E-09	9.39E-08
EC	70	1.71E-09	1.00E-07
EC	80	8.14E-10	1.37E-07
EC	90	3.57E-10	1.40E-07
EGCG	50	3.35E-09	2.06E-07
EGCG	60	3.27E-09	8.26E-08
EGCG	70	8.02E-09	8.97E-08
EGCG	80	6.47E-09	8.52E-08
EGCG	90	4.63E-09	9.23E-08

Determination of limiting diffusivity coefficients in extraction of caffeine and four types of antioxidants from Iranian green tea leaves

Abstract

Green tea leaves contain anti-cancer antioxidants which can be used in drug, food, hygienic and cosmetic products. In this article, the extraction mechanism and kinetics of these components are investigated. Therefore, Diffusion coefficients of C, EC, EGC, EGCG and Caffeine of Iranian green tea leaves in water were calculated. A two diffusion coefficient model (Internal and external) was used for mass transfer modeling of the system. According to the results, the intra-particle diffusion step is the rate-controlling step of the extraction process. Furthermore, the optimum extraction conditions (temperature and time) of these components were determined as the following: Caffeine (80 °C, 20 min), C (90 °C, 80 min), EC (80 °C, 20 min), EGC (80 °C, 20 min) and EGCG (90 °C, 20 min).

Keywords: Iranian green tea leaves, Catechin, Caffeine, Extraction, Diffusion Coefficient