بررسی و مقایسه ماده مؤثره اپی گالوکاتچین گالات در کالوس حاصل از کشت بافت گیاه دارویی (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) به روش نوین استخراج با پلیمر قالب مولکولی (MIP)

آذرم موحدی[1]، مازیار احمدی‌گلسفیدی[2]*، مهدی علیزاده[3]

[1]دانشجوی دکتری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران

[2]استادیار، گروه شیمی، دانشکده علوم، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران

[3]دانشیار، گروه کشاورزی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۹/۲/۲٤ تاریخ پذیرش: ۹۹/٦/۳۰

چکیده

به‌دلیل اهمیت ماده موثره اپی گالو کاتچین گالات[1] "EGCG "گیاه چای در صنایع دارویی و غذایی، در این تحقیق به منظور بررسی و مقایسه میزان EGCG در عصاره برگ جوان (دوبرگی)، مسن و کالوس گیاه، اقدام به جداسازی و اندازه‌گیری EGCG در عصاره کالوس به روش پلیمر قالب مولکولی[2] MIP گردید. در سال ۱۳۹۷ به جهت تولید و تحریک کال‌زایی، کالوس گیاه چای برداشت شده از منطقه غرب مازندران در محیط‌های کشت MS، SH و WPM با مقادیر مختلف از هورمون‌های گیاهی کشت شد. برگ و کالوس با متانول ۷۰ درصد به روش ماسراسیون عصاره‌گیری شدند. برای خالص سازی EGCG از عصاره کالوس، مقدار نانولوله‌ی چند دیواره و عامل‌دار کربن[3] (MWCNTs) در محدوده‌ی ۱۰-۱ میلی‌گرم، در ساخت CNTs-MIP بررسی و بهینه شد. EGCG در عصاره کالوس با CNTs-MIP، استخراج و میزان آن با کروماتوگرافی فاز مایع تعیین شد. نتایج نشان داد که بیشترین حجم کالوس در محیط WPM و بیشترین میزان EGCG در محیط SH با غلظت بهینه از هورمون‌های BA (2 mg/L), 2,4-D (0.5 mg/L)، مشاهده شد. افزودن ۸ میلی‌گرم از MWCNTs به ساختار پلیمر، میزان بیشتری از EGCG را استخراج نمود. EGCG در برگ جوان و مسن و کالوس گیاه به‌ترتیب ۳۷/۳٤، ۷/۱۹، ۰/۱۳ میلی‌گرم در گرم می‌باشد. میزان EGCG در کالوس با استفاده از CNTs-MIP، ۰/۹۱ میلی‌گرم در گرم محاسبه شد. با وجود مقدار کم EGCG در کالوس، با استفاده از CNTs-MIP مقدار این ماده با ضریب تغلیظ ۸ برابری قابل اندازه‌گیری و بیانگر کارایی این تکنیک می باشد.

واژه‌های کلیدی: اپی‌گالوکاتچین گالات، پلیمر قالب مولکولی، چای سبز، کالوس، کشت بافت

1. Epigallocatechin gallate
2. Molecularly Imprinted Polymer
3. Functional multiwall carbon nanotubes

*نویسنده مسئول: mazyarahmadigolsefidi@yahoo.com

مقدمه

گیاه چای با نـــام علمی *Camellia sinensis* (L.) Kuntze در حدود ۲۷۰۰ سال قبل از میلاد مسیح در چین کشت و مصرف می‌شده است. چای سبز حاوی ترکیبات پلی فنلی شامل اپی‌کاتچین[1] EC، اپی گالوکاتچین[2] EGC، اپی‌کاتچین گالات[3] ECG و اپی‌گالوکاتچین گالات[4] EGCG می‌باشد که اثرات درمانی آن به این ترکیبات مربوط می‌شود. اعتقاد بر این است که پلی‌فنل‌های موجود در چای سبز، مسئول اکثر فعالیت‌های آنتی اکسیدان، مهار پرولیفراسیون و اثر محافظتی (پیشگیری) هستند. چای سبز با مهار آنزیم لیپاز، باعث کاهش کلسترول، تری گلیسرید شده و از تصلب شرائین جلوگیری می‌کند و با اثر آنتی‌اکسیدانی و جذب رادیکال‌های آزاد در مهار تومور سرطانی نقش دارد. همچنین با تحریک فعالیت استئوبلاست در پوکی استخوان مؤثر است. به علاوه با تأثیر بر میزان دوپامین در بیماری پارکینسون اثر دارد. پیشگیری از سرطان، بیماری‌های قلبی- عروقی، درمان چاقی، عفونت‌های باکتریایی و ویروسی و اختلالات عصبی برای چای سبز گزارش شده است (Pizzorno, et al., 2016; Gruenwald et al., 2007; Ramawat, 2009 Braun et al., 2015). ترکیبات فنلی با فعالیت بیولوژیکی فراوان، از گسترده‌ترین تولیدات متابولیت‌های ثانویه هستند (Ghasemzadeh et al., 2011).

تولید متابولیت‌های ثانویه از طریق کشت مزرعه، دارای معایبی نظیر کاهش میزان کشت و تغییر میزان متابولیت‌ها به دلیل تغییر فصل یا محیط و جغرافیا است. از این رو کشت بافت گیاهی، برای تولید متابولیت‌های ثانویه توصیه می‌شود (Ramachandra et al., 2002). تولید ساده و قابل کنترل، جداسازی کارآمد و سریع، جلوگیری از تولید ترکیبات ناخواسته، تولید مقادیر زیادی از متابولیت ثانویه، امکان ردیابی متابولیکی در تغذیه‌ی حیوانات آزمایشگاهی با ترکیبات ثانویه نشاندار شده، حذف اثر فصلی در کشت بافت، از جمله مزایای تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت سلولی گیاهان به جای کشت زراعی می‌باشند (Karuppusamy, 2009). مفید بجنوردی و همکاران در سال ۲۰۱٦ بهینه سازی القاء کالوس برای تولید افدرین را در شرایط کشت بافت بررسی کردند (MofidBojnordi et al., 2016). جین و همکاران در سال ۲۰۱۲، مبادرت به القاء کالوس از ریزنمونه‌ی ساقه گیاه *Sericostoma pauciflorum* و تولید متابولیت‌های ثانویه بیواکتیو نظیر بتا- سیتواسترول و کافئیک اسید جداسازی و شناسایی شدند (Jain et al., 2012).

روش جذب متداول برای استخراج EGCG از چای سبز معمولاً حاوی بسیاری از اجزای نامطلوب دیگر است، این روش‌ها قدرت انتخابی کمی دارند و اثرات مفید EGCG را کاهش می‌دهند. برای حفظ میزان اثرات EGCG ، افزایش قدرت جذب انتخابی ضروری است (Xueqing et al., 2017). روش‌های موجود برای استخراج و غنی‌سازی EGCG به‌دلیل نیاز به حلال و زمان زیاد برای به دست آوردن کاتچین با خلوص بالا، به مطالعات گسترده‌ی احتیاج دارد (Zhang et al., 2013). در سال‌های اخیر، میکرو استخراج فاز جامد SPME[5] با استفاده از روش پلیمر قالب مولکولی MIP[6]، برای تغلیظ و استخراج انتخابی ترکیبات متابولیکی توسعه یافته است. میکرواستخراج فاز جامد بر پایه‌ی فیبر توخالی که با نانولوله‌ی کربن[7] CNT تقویت شده است یکی از تکنیک‌های MIP

1. Epicatechin
2. Epigallocatechin
3. Epicatechin gallate
4. Epigallocatechin gallate

5. Solid- Phase Micro Extraction
6. Molecularly Imprinted Polymer
7. Carbon Nanotube

است که به‌دلیل خواص فیزیکی و شیمیایی فوق‌العاده CNTs به عنوان ماده‌ی جاذب استخراج و برای غلبه بر محدودیت‌های تکنیک‌های استخراج معرفی شده‌اند (Alothman et al., 2018; Es'haghi et al., 2010). در مطالعه‌ای، پلیمر مبتنی بر آکریلات با استفاده از تکنیک سُل- ژل سنتز و با CNTs تقویت شده و برای استخراج مقدار ترکیبات خاص در نمونه‌های طبیعی مورد استفاده قرار گرفت (Ahmadi- Golsefidi et al., 2012).

در این مطالعه به‌دلیل اهمیت ماده مؤثره EGCG موجود در گیاه چای در کاربردهای مختلف در صنایع دارویی و غذایی و خالص‌سازی آن و با توجه به عدم سهولت دسترسی دائم به گیاه با کیفیت ثابت و پارامترهایی چون تغییرات فصل، نوع برداشت، کنترل شرایط خشک کردن و حمل گیاه به محل موردنظر و هزینه‌های آن‌ها و با توجه به ماتریس پیچیده گیاه جهت خالص‌سازی، به کشت بافت گیاه چای مبادرت شده و از تکنیک پلیمر قالب مولکولی برای استخراج EGCG از عصاره کالوس استفاده شد و با مقدار EGCG در عصاره برگ جوان (دوبرگی) و مسن مقایسه گردید. همچنین استخراج این ماده مؤثره با استفاده از پلیمر قالب مولکولی تقویت شده با نانولوله‌های کربن برای اولین بار، صورت گرفت که یک روش نوین در زمینه استخراج ترکیبات طبیعی محسوب می‌شود.

مواد و روش‌ها

کشت بافت: بوته‌های نمونه‌ی چای از مرکز تحقیقات نشتارود تنکابن تهیه و در فصل بهار برگ‌های جوان تک گره و ساقه برداشت شد و بر طبق دستورالعمل ارائه شده توسط علیزاده (Alizadeh, 1390)، پس از شستشو با آب شهری و شوینده‌های تجاری، در محلول قارچ‌کش با غلظت ۰٫۲ گرم در لیتر به مدت دو ساعت ضدعفونی و سپس چندین بار شستشو با آب مقطر (کملب، بلژیک) به زیر هود لامینار (ژال تجهیز، ایران) حمل و مجدد با سدیم هیپوکلریت ۶۰ درصد به مدت ۲۵ دقیقه و آبکشی با آب مقطر و شستشو با الکل (۷۰ درصد) و مجدد با آب مقطر، برگ‌ها به ۳ تا ٤ قسمت برش شد و درون ظرف کشت محتوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت MS[1]، SH[2] و WPM[3] (تهیه شده طبق پروتکل)، حاوی غلظت هورمون‌های بهینه‌سازی شده بنزیل آدنین[4] BA (2 mg/L)، دی‌کلروفنوکسی‌استیک اسید[5] 2,4-D (0.5 mg/L) (Ducheffa co, Netherland) و زغال فعال mg/L ۲۰۰ که اتوکلاو (ایران ابزار، ایران) و سپس سرد شده بودند، کشت انجام شد. نمونه‌ها در اتاق کشت با دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری و پس از حدود ٤ هفته کالوس جمع‌آوری و خشک شده و پس از توزین، عصاره‌گیری شد.

عصاره‌گیری: عصاره‌گیری مطابق روش ISO14502-2:2005(E) با کمی اصلاحات انجام شد. ۲۵۰ میلی‌گرم پودر برگ جوان (دوبرگی)، برگ مسن و کالوس به‌صورت مجزا، با ۵ میلی‌لیتر متانول ۷۰ درصد به‌مدت ۳۰ دقیقه روی همزن مغناطیسی هم خورد. مخلوط حاصل به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و محلول حاصل در یک بالن ۱۰ میلی‌لیتری حجم رسید. عصاره‌ها برای استخراج و آنالیز در یخچال نگهداری شدند.

سنتز MIP برای استخراج EGCG: مطابق روش تیان و همکارانش (Tian et al., 2012) با کمی اصلاحات، ۰/۵ میلی‌مول از متاکریلیک اسید[6] MAA (مرک- آلمان) به یک ظرف شیشه‌ای کوچک منتقل

1. Murashige & Skoog Medium
2. Shenck & Hildebrandt Medium
3. Lioyld G. and McCown Medium
4. Benzyl Adenine
5. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid
6. Methacrylic acid

شده و ۳ میلی‌مول اتیلن گلایکول دی متاکریلات EGDMA[1] (مرک-آلمان) به آن اضافه شده و با ۲ میلی‌لیتر استونیتریل مخلوط می‌شود. در این مرحله، ۰/۰۱ میلی‌مول از استاندارد EGCG (سیگما- آلدریچ، آمریکا) به مخلوط فوق افزوده و حل می‌شود. سپس ۵ میلی‌گرم نانو لوله‌ی چند دیواره و عامل‌دار کربن[2] FMWCNTs (پژوهشگاه صنعت نفت، ایران) افزوده شده و ۲۰ دقیقه در حمام اولتراسوند (مدل Unident Geneve سری Micro 10) قرار می‌گیرد. در این مرحله، ۳۰ میلی‌گرم آزوبیس (۲-متیل پروپیونیتریل)[3] AIBN (آکروز، بلژیک) افزوده شده و پس از حل شدن، به‌مدت ۱۰ دقیقه همزمان با گاززدایی با جریانی از گاز نیتروژن، در حمام اولتراسوند قرار گرفت و سپس ظرف حاوی مواد واکنش به‌مدت ۱۰ دقیقه به‌سیستم خلأ متصل شد. در نهایت درب ظرف هوابند شده و به‌مدت ٢٤ ساعت در حمام ٦۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا پلیمر تشکیل شود. پس از گذشت این مدت، پلیمر در آون ۸۰-۷۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد و پس از خنک شدن، از ظرف شیشه‌ای خارج شده و پودر می‌شود. پودر پلیمر به یک بشر ۲۵ میلی‌لیتری منتقل شده و دو بار، هر بار با ۱۰ میلی‌لیتر متانول به مدت ۲۰ دقیقه، روی همزن مغناطیسی قرار می گیرد تا عملیات خروج تمپلیت[4] از MIP انجام شود. در نهایت پودر حاصل در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد در آون خشک می‌شود. پلیمر بدون قالب مولکولی[5] NIP با همان روش فوق، بدون افزودن استاندارد اپی‌گالوکاتچین گالات سنتز شد.

بهینه‌سازی مقادیر CNT در عملکرد MIP جهت استخراج EGCG: به‌منظور تعیین بهترین شرایط عملیات جذب و استخراج EGCG و بررسی اثر CNT بر کارایی MIP، مقادیر مختلف از غلظت FMWCNTs در محدوده ۱ تا ۱۰ میلی‌گرم طی فرآیند ساخت MIP اضافه گردید. مقادیر CNT در ۵ مقدار مختلف ۱۰، ۸، ۵، ۲، ۱ میلی‌گرم در سنتز پلیمر مورد بررسی قرار گرفتند.

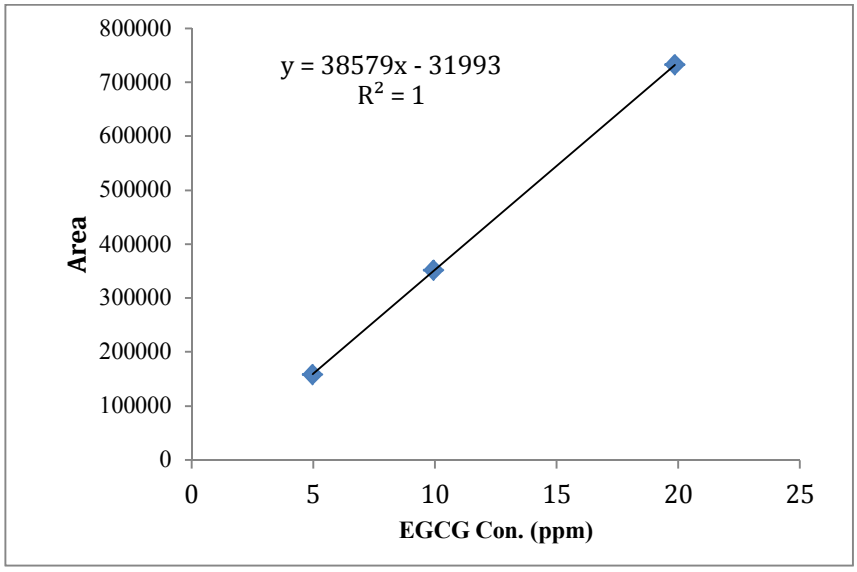
استخراج EGCG توسط پلیمر قالب مولکولی تقویت شده با نانولوله کربن[6] (CNTs-MIP): ۰/۱ گرم از MIP با ۱۰ میلی‌لیتر از محلول استاندارد EGCG 10ppm، مخلوط شده و به‌مدت ۲۰ دقیقه با همزن مغناطیسی مخلوط می‌شود، سپس صاف می‌شود. سپس پودر روی صافی پس از خشک شدن در هوای آزاد، با ۲ میلی‌لیتر متانول به‌مدت ۲۰ دقیقه در حمام اولتراسوند واشویی می‌شود. محلول واشویی از پودر جدا شده و برای آنالیز نگهداری می‌شود. محلول واشویی و محلول استاندارد مورد استفاده، پس از عبور از فیلتر نایلونی به کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا HPLC[7] تزریق می‌شوند.

آماده‌سازی نمونه کالوس و استخراج EGCG توسط CNTs-MIP: ۰/۱ گرم از CNTs-MIP با ۱۰ میلی‌لیتر از عصاره‌ی کالوس، مخلوط شده و به مدت ۲۰ دقیقه با همزن مغناطیسی مخلوط می‌شود، سپس صاف شده و پودر روی صافی پس از خشک شدن در هوای آزاد، با ۲ میلی‌لیتر متانول به‌مدت ۲۰ دقیقه در حمام اولتراسوند واشویی می‌شود. محلول واشویی از پودر جدا شده و برای آنالیز نگهداری می‌شود.

آنالیز HPLC: آنالیز EGCG با یک سیستم HPLC متعلق به شرکت Knauer آلمان، مجهز به پمپ استیل ml ۱۰ مدل K-1001، و دتکتور UV مدل K-2600 انجام شد. جداسازی مواد بر روی ستون Uncleosil-

1. Ethylene glycol dimethacrylate
2. Functional multiwall carbon nanotubes
3. Azobis (2-methylpropionitrile)
4. Template
5. Non-imprinted molecularly polymer
6. Carbon nanotube –molecularly imprinted polymer
4. High performance liquid chromatography

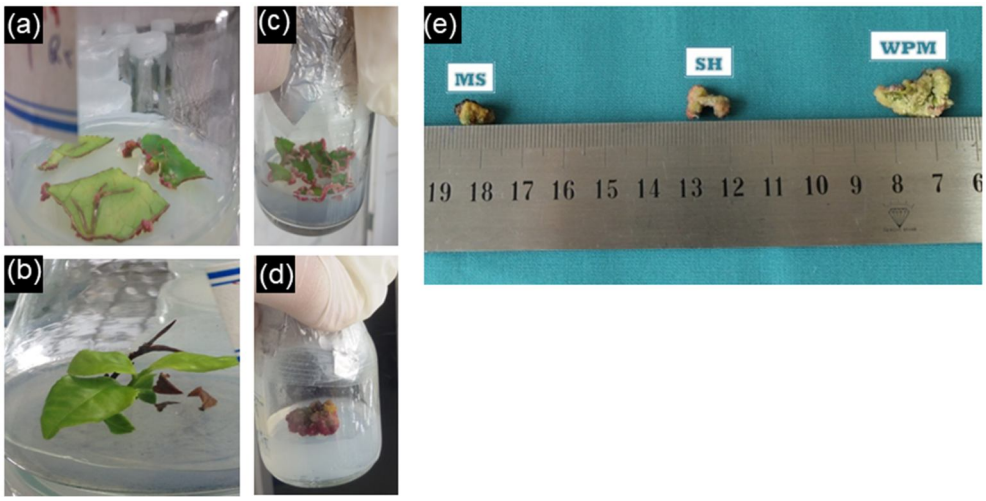
(250× 4.6 mm, 3-5 micrometer)100, ODS C18 صورت گرفت. کروماتوگرام‌ها با نرم‌افزار EZChrom Elite V.3.1.7 ثبت، تجزیه و تحلیل شدند. فاز متحرک شامل استونیتریل و فسفریک اسید ۰/۱٪ وزنی- حجمی در آب، به صورت گرادیان از ۸٪ تا ۲۲٪ استونیتریل طی ۳۵ دقیقه، یک دقیقه ایزوکراتیک در ۲۲٪ استونیتریل، شویش گرادیان از ۲۲٪ تا ۸٪ استونیتریل طی ۹ دقیقه و ۵ دقیقه ایزوکراتیک در ۸٪ استونیتریل با سرعت جریان یک میلی‌لیتر بر دقیقه صورت گرفت. کلیه‌ی حلال‌های مورد استفاده، گرید HPLC بودند. آشکارسازی ترکیبات در طول موج ۲۸۰ نانومتر انجام گرفت. کلیه نمونه‌ها پیش از تزریق از فیلتر نایلونی ۰/٤٥ µm عبور داده شده و ۲۰µl تزریق شدند. منحنی کالیبراسیون EGCG با استفاده از محلول استاندارد در محدوده‌ی غلظتی ۲۰-۵ ppm رسم گردید که بر این اساس معادله y= 38579X- 31993 با ضریب رگرسیون از غلظت EGCG بر حسب سطح زیر پیک آن R^2=1 حاصل شد (شکل ۱).



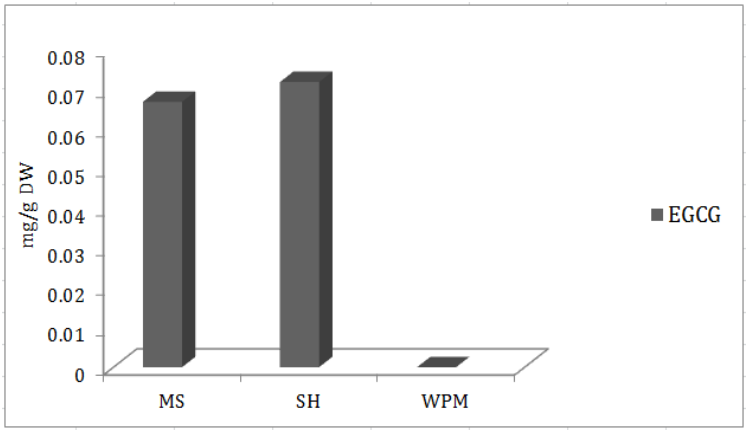
شکل ۱: منحنی کالیبراسیون استاندارد اپی‌گالوکاتچین‌گالات

نتایج

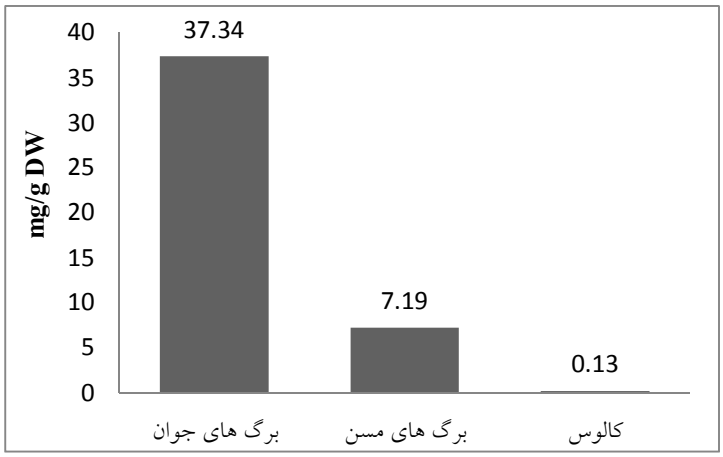
کشت بافت: همانطور که در شکل ۲(a-d) قابل مشاهده است، در کشت بافت گیاه چای سبز، برش‌هایی که از نمونه برگ‌های جوان و در فصل بهار تهیه شده بودند در زمان کوتاهتر و با میزان بیشتری کالوس تولید کردند. با توجه وجود ترکیبات فنلی و قهوه‌ای شدن محیط کشت، انجام کشت در دمای پایین و ساعات آغازین روز و با استفاده از زغال فعال، نتیجه بهتری حاصل شد. با توجه به شکل ۲e، در سه محیط کشت MS, SH, WPM بیشترین میزان رشد کالوس در محیط WPM پس از حدود ٤ هفته مشاهده شد. همانطور که در شکل۳ قابل مشاهده است، در محیط‌های مذکور با غلظت بهینه‌ی هورمونی BA (2 mg/L), 2,4-D (0.5 mg/L)، زغال فعال ۲۰۰mg/L، بیشترین میزان EGCG در محیط SH مشاهده شد.



شکل ۲: القاء کالوس گیاه چای در محیط‌های مختلف. (a) ریز نمونه برگ (b) ریز نمونه ساقه یا تک گره (c) کالوس‌زایی (d) واکشت کالوس (e) مقایسه حجم کالوس در سه محیط کشت



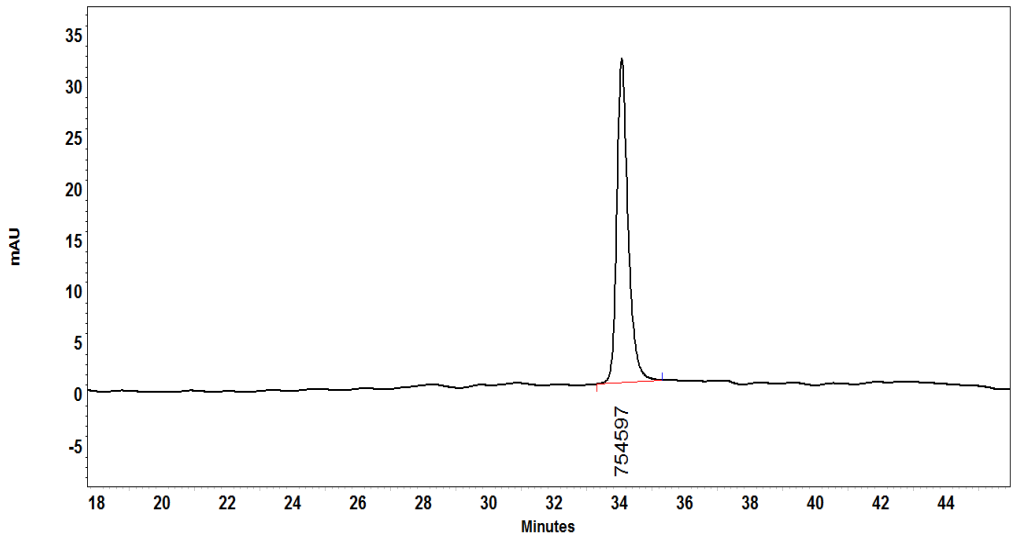
شکل۳: نتایج HPLC برای اندازه‌گیری EGCG (میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) عصاره کالوس چای در محیط‌های کشت پایه



شکل ٤: نتایج HPLC برای اندازه‌گیری EGCG (میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) عصاره‌های برگ و کالوس چای

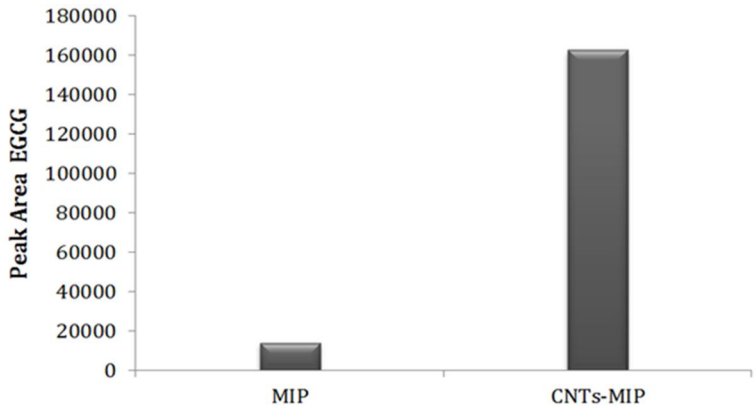
مقایسه میزان EGCG در عصاره‌های برگ و کالوس: میزان EGCG در عصاره‌های حاصل از برگ جوان (دوبرگی)، برگ مسن و کالوس چای، با استفاده از منحنی استاندارد EGCG تعیین گردیدند. شکل ٤ مقدار قابل توجه EGCG را در برگ‌های جوان دوبرگی نسبت به برگ مسن و کالوس نشان می‌دهد.

بهینه‌سازی استخراج EGCG توسط CNTs-MIP: میزان EGCG در نمونه‌های حاصل از مراحل مختلف بهینه سازی، با استفاده از منحنی استاندرد حاصل از تزریق محلول‌های استاندرد EGCG تعیین گردیدند. کروماتوگرام HPLC مربوط به استاندارد EGCG جهت محاسبه غلظت در شکل ٥ مشاهده می‌شود.



شکل ٥: کروماتوگرام HPLC مربوط به استاندارد اپی‌گالوکاتچین‌گالات

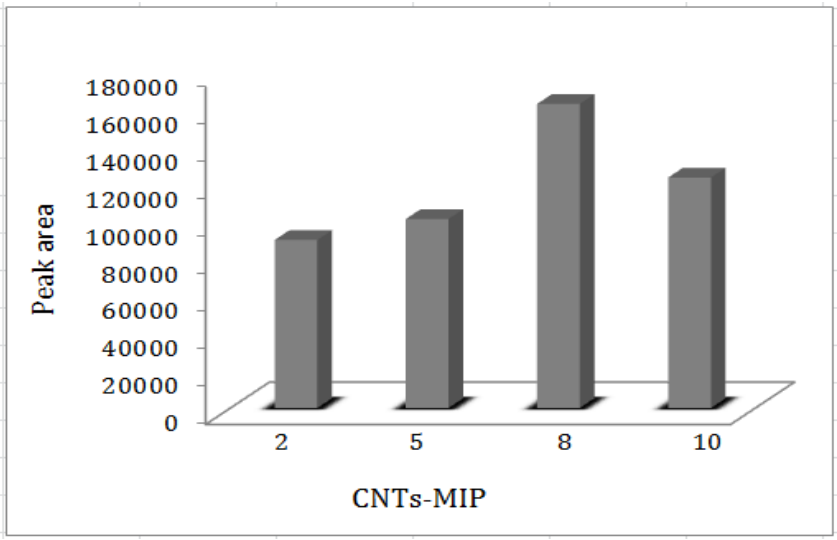
با توجه به نتایج، ورود نانولوله چند دیواره و عامل‌دار کربن در ساختار MIP اثر قابل ملاحظه‌ای بر کارایی استخراج دارد (شکل ٦).



شکل ٦: بررسی اثر نانولوله کربن بر کارایی MIP در استخراج EGCG

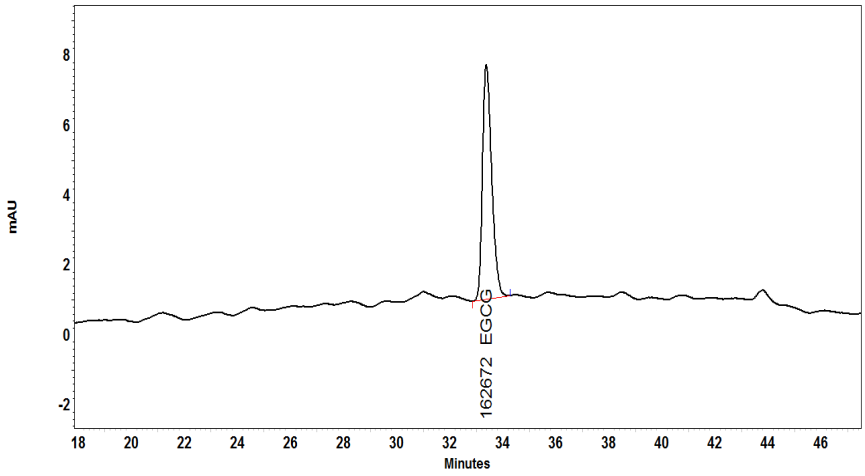
بهینه‌سازی میزان CNT در MIP بر کارایی استخراج EGCG: نتیجه کروماتوگرام‌های حاصل از محلول واشویی از CNTs-MIPهای تهیه شده با مقادیر ٢، ٥، ٨، ١٠ میلی‌گرم FMWCNTs در شکل ٧

ارائه می‌گردد. بر این اساس، ۸ میلی‌گرم نانولوله کربن به ازای یک گرم MIP، بهترین نسبت وجود CNT در MIP می‌باشد و بالاترین استخراج را به دست می‌دهد.



شکل ۷: مقایسه نتایج بهینه‌سازی میزان نانولوله کربن در ساخت MIP

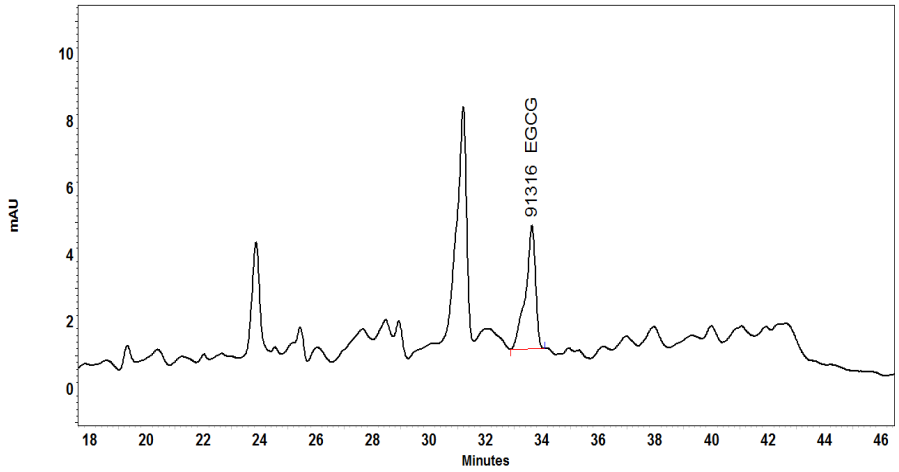
کروماتوگرام حاصل از محلول واشویی از بهینه‌سازی میزان FMWCNTs در شکل ۸ ارائه می‌گردد.



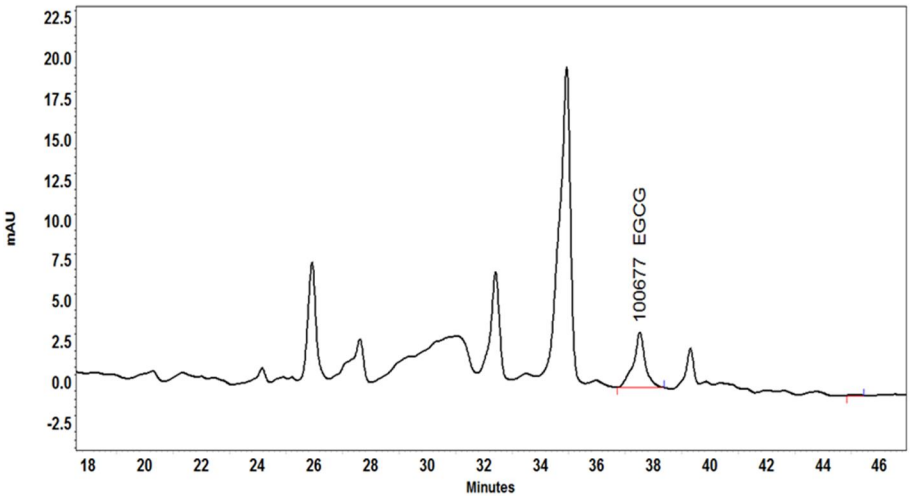
شکل ۸: کروماتوگرام HPLC محلول واشویی توسط CNTs-MIP تهیه شده با ۸ میلی‌گرم FMWCNTs (مقدار بهینه). پیک EGCG مربوط به EGCG واجذب شده از سایت‌های CNTs-MIP در حلال می‌باشد که از محلول استاندارد EGCG توسط CNTs-MIP جذب شده است.

نتایج حاصل از استخراج EGCG توسط CNTs-MIP از نمونه کالوس: مقدار EGCG موجود در عصاره‌های کالوس خشک و تر، به‌وسیله CNTs-MIP، جذب و در حلال مجزایی واجذب گردید و کارایی CNTs-MIP، برای استخراج EGCG به‌وسیله آنالیز HPLC تعیین گردید. بدین‌منظور، محلول واشویی، محلول باقی مانده عصاره پس از استخراج با CNTs-MIP و عصاره‌ی کالوس پیش از استخراج،

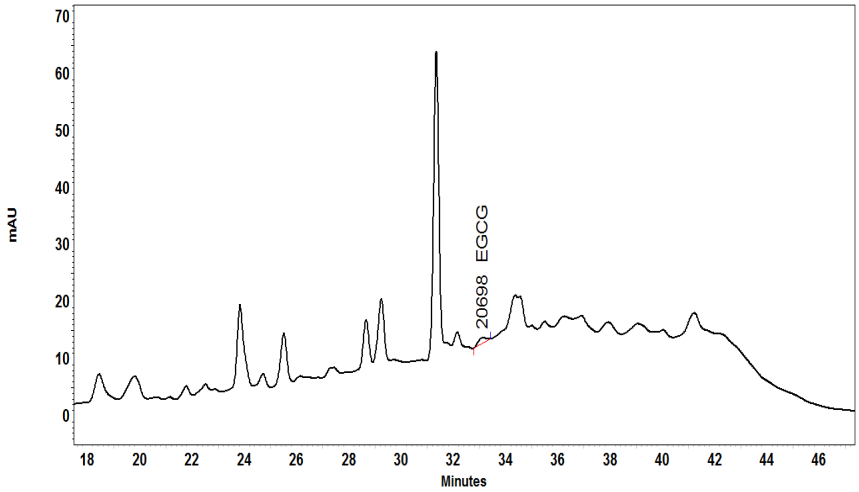
آنالیز شدند. سطح زیر پیک EGCG در محلول واشویی کالوس‌های تر و خشک به‌ترتیب ۹۱۳۱۶ و ۱۰۰۶۷۷ در مقایسه با سطح زیر پیک EGCG در عصاره کالوس‌های تر و خشک به‌ترتیب ۲۰۶۹۸ و ۵٤۵۹۸ کارایی تجزیه‌ای CNTs-MIP را برای استخراج، تخلیص و پیش تغلیظ EGCG از کالوس گیاه چای نشان می‌دهد (شکل‌های ۱۲-۹). جدول ۱ میزان غلظت EGCG در محلول واشویی و عصاره کالوس خشک و تر را نشان می‌دهد.



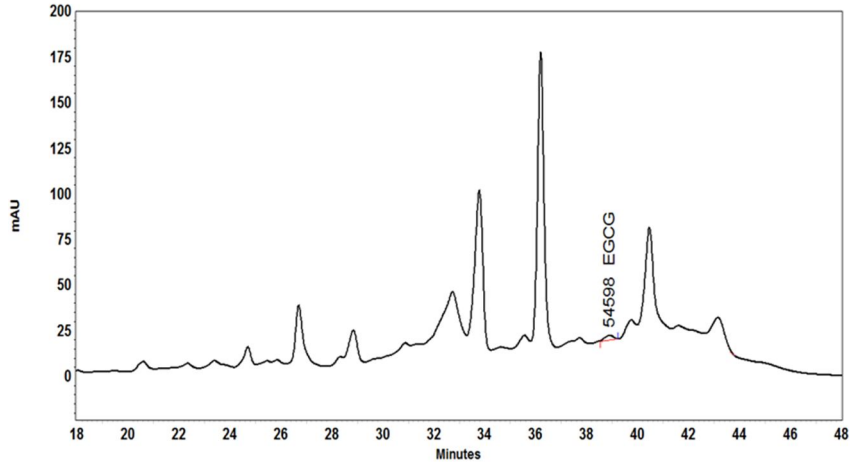
شکل ۹: کروماتوگرام HPLC مربوط محلول واشویی حاصل از استخراج، تخلیص و پیش تغلیظ EGCG از عصاره کالوس تر توسط CNTs-MIP. EGCG موجود در عصاره، در سایت‌های CNTs-MIP جذب شده و سپس در متانول به‌عنوان حلال واشویی، واجذب می‌شود.



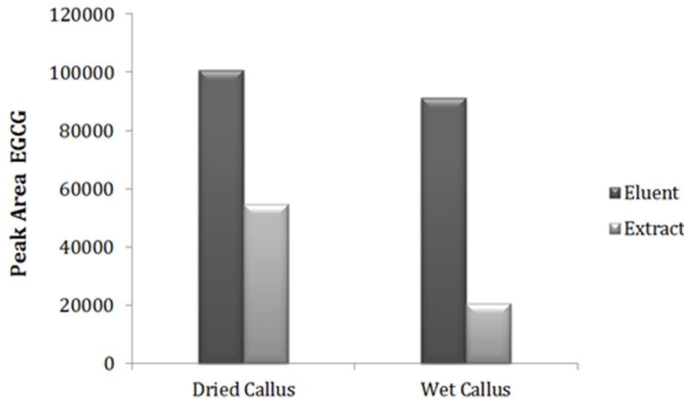
شکل ۱۰: کروماتوگرام HPLC محلول واشویی حاصل از استخراج، تخلیص و پیش تغلیظ EGCG از عصاره‌ی کالوس خشک توسط CNTs-MIP. EGCG موجود در عصاره، در سایت‌های CNTs-MIP جذب شده و سپس در متانول به‌عنوان حلال واشویی، واجذب می‌شود.



شکل ۱۱: کروماتوگرام HPLC عصاره کالوس تر پیش از استخراج با CNTs-MIP



شکل۱۲: کروماتوگرام HPLC عصاره کالوس خشک پیش از استخراج با CNTs-MIP



شکل ۱۳: مقایسه میزان EGCG در محلول واشویی و عصاره کالوس خشک و تر

جدول ۱: غلظت EGCG برحسب ppm در محلول واشویی و عصاره کالوس خشک و تر

نمونه‌ها	کالوس خشک		کالوس تر	
	محلول واشویی از کالوس خشک	عصاره‌ی کالوس خشک	محلول واشویی از کالوس تر	عصاره‌ی کالوس تر
EGCG	۳/٤٤	۲/۲٤	۳/۱۹٦	۱/۷۰

بحث

مطالعاتی بر روی کشت بافت گیاه چای، انجام شده است که اغلب در محیط MS اقدام به کالزایی نموده‌اند. نیکُلاو و همکاران به بررسی اثر غلظت‌های NAA (6×10^{-5}, و 2,4-D (2×10^{-4}, 2×10^{-5}, 2×10^{-6}) روی رشد کالوس و تولید ترکیبات فنلی در محیط کشت کالوس گیاه چای پرداخته و بیان کردند رشد کالوس و میزان ترکیبات فنلی در غلظت 2,4-D (2×10^{-5}) قابل توجه بوده است (Nikolaeva et al., 2009). همچنین خلیق و همکارانش ، با سه واریته از چای Qi- Men, Jue- Keng, Ruopi اقدام به کالزایی از کشت ساقه و برگ و پرچم در محیط MS کردند. در واریته Qi- Men، بهترین کالزایی از ریز نمونه‌ی برگ در محیط MS حاوی BA (0.1 mg/l) و (1.5 mg/l) BAP مشاهده شد که به رنگ زرد بودند (Khaliq et al., 2002). موتایا و همکارانش نیز، از برگ‌های گیاه چای در محیط MS حاوی BA (5mg/l)، کالوس‌های تردی به‌دست آوردند. سپس با کشت این کالوس‌ها در محیط حاوی IAA (5mg/l) + 2,4-D (2 mg/l) + BAP (2 mg/l) + Kin (2 mg/l)، به بررسی تولید متابولیت‌های ثانویه پرداختند (Muthaiya et al., 2013). باسوکی به منظور تولید اپی‌گالوکاتچین گالات از کشت بافت، اقدام به بررسی محیط کشت MS و تکنیک مناسب کرد. هدف کلی در آن تحقیق، دستیابی به تکنیک تولید EGCG از کشت بافت بود. تولید کالوس از جوانه‌های برگ گیاه چای در محیط‌های مختلف انجام و سپس واکشت کالوس‌ها در محیط مناسب و در انتها وجود EGCG در کالوس مورد بررسی قرار گرفت. باسوکی محیط MS با غلظت‌های مختلف NAA (0,5 mg/l) + 2IP (0,5 mg/l)، 2,4-D (1 mg/l) + Kin (1 mg/l) و 2,4-D (0.5mg/l) + BAP (1 mg/l) استفاده شد (Basuki, S., 2011). در این تحقیق، کالزایی در محیط MS با روش‌های به کار رفته در مطالعات فوق نتایج مناسبی به همراه نداشت و با وجود تغییر غلظت و نوع هورمون‌ها، رشد کالوس مناسب نبود. از این رو کالزایی، در دو محیط SH و WPM بررسی شده و پس از مشاهده رشد کالوس در این دو محیط، غلظت و نوع هورمون‌ها بهینه شد. نتیجه بررسی میزان رشد کالوس و ماده مؤثره EGCG نشان داد که کالوس چای در محیط WPM بیشترین رشد را داشت اما بیشترین میزان EGCG در محیط SH مشاهده شد.

با توجه به تأیید وجود EGCG توسط باسوکی (Basuki, S., 2011) در کالوس چای و به دلیل مقدار کم این ماده در کالوس (شکل ٤) نیاز به روش مناسبی برای تغلیظ و تخلیص می‌باشد. باوجودی که تیان و همکارانش از تکنیک MIP جهت استخراج و خالص سازی EGCG در برگ چای سبز، استفاده کردند (Tian et al., 2012). اما استفاده از این تکنیک برای استخراج EGCG از عصاره کالوس انجام نشده بود. از این رو پس از ایجاد اصلاحاتی در روش تیان جهت ساخت MIP، به دلیل عملکرد عالی CNTs در جذب مواد و برای غلبه بر محدودیت‌های تکنیک‌های استخراج (Alothman et al., 2018)، اثر ورود CNTs در ساختار پلیمر برای استخراج EGCG از عصاره کالوس، برای

اولین بار بررسی شد. به دلیل مشاهده تأثیر قابل ملاحظه در افزایش کارایی MIP (شکل ٦) که به دلیل افزایش سطح جذب پلیمر و بنابراین افزایش تعداد سایت‌های جذبی، بهینه‌سازی میزان FMWCNTs در ساختار پلیمر، جهت دستیابی به بالاترین ضریب تغلیظ، انجام شد که با افزایش میزان FMWCNTs تا ۸ میلی‌گرم، میزان استخراج ماده مؤثره سیر صعودی داشته و پس از آن با افزایش میزان FMWCNTs، به‌دلیل جایگزینی این ماده در سایت‌های جذبی، کاهش استخراج مشاهده شد. در نهایت، EGCG موجود در عصاره کالوس با استفاده از CNTs-MIP بهینه شده، استخراج شد. با توجه به نتایج حاصل از آنالیز عصاره‌های کالوس و محلول‌های واشویی حاصل از استخراج با CNTs-MIP، علاوه بر کاهش تداخلات ناشی از ماتریس عصاره کالوس در مرحله‌ی آنالیز، ضریب تغلیظ حداقل ۸ برابری در استفاده از CNTs-MIP برای استخراج EGCG از عصاره‌های کالوس حاصل گردید.

نتیجه‌گیری نهایی

این تحقیق بر مبنای مقایسه مقادیر EGCG در کالوس حاصل از بهینه‌سازی محیط‌های کشت بافت گیاه *Camellia sinensis* (L.) Kuntze به کمک تنظیم کننده‌های رشد گیاهی در محیط کشت‌های پایه MS، SH و WPM، با رویکرد روش جدید استخراج EGCG از گیاه چای، به‌عنوان ترکیب آنتی‌اکسیدان مهم با کاربرد در صنایع غذایی، دارویی، آرایشی- بهداشتی، بر پایه‌ی تشکیل فاز جامد قالب مولکولی استوار می‌باشد. در این روش جاذب بر اساس اسید متاکریلیک سنتز شد. ماهیت مولکول‌ها در ساخت محل‌های اتصال در ساختمان پلیمر نقش اساسی در دستیابی به بهترین جذب آنالیت، انتخاب مناسب اندازه پلیمر، شکل مولکولی و اندازه‌ی نانو ذرات دارد. برای افزایش درصد جاذب از غلظت بهینه‌ی نانولوله کربن استفاده شد. نتایج آنالیز HPLC موارد ذکر شده را تأیید می‌کند.

استفاده از فاز جامد استخراج کننده با استفاده از تکنیک قالب مولکولی حمایت شده با نانو لوله‌ی کربن CNTs-MIP برای اولین بار است که مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته است. این مطالعه نشان داد استخراج و پیش تغلیظ EGCG بر اساس فاز جامد قالب مولکولی تقویت شده با نانو لوله‌ی کربنی امکان‌پذیر بوده و نتایج حاکی از آن است که مقدار بهینه از نانو لوله‌ی کربنی در ساخت پلیمر قالب مولکولی، بر میزان راندمان استخراج EGCG از کالوس حاصل از کشت بافت گیاه چای مؤثر است. با پیشنهاد توسعه و بهبود این روش در استخراج سایر ترکیبات، می‌توان در سایر گیاهان نیز مطالعه و تحقیق صورت گیرد.

سپاسگزاری

نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از شرکت داروسازی گیاه اسانس دکتر سلیمانی- گرگان به‌دلیل مساعدت در تأمین هزینه‌های آن و همچنین دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان اعلام می‌دارند.

References

1. Ahmadi-Golsefidi, M., Es'haghi, Z., and Sarafraz-Yazdi, A. 2012. Design, synthesis and evaluation of a molecularly imprinted polymer for hollow fiber- solid phase microextraction of chlorogenic acid in medicinal plants. Journal of Chromatography A, 1229: 24-29.
2. Alizadeh, M. 1390. A user manual on Plant tissue culture and micropropagation, Nowruz Publications, Gorgan, 322p.

3. Alothman, Z.A., and Wabaidur, S.M. 2018. Application of carbon nanotubes in extraction and chromatographic analysis: A review. Arabian Journal of Chemistry, 1-19.
4. Bansal, S., Choudhary, S., Sharma, M., Kumar, S.S., Lohan, S., Bhardwaj, V., Syan, N., and Jyoti, S. 2013. Tea: A native source of antimicrobial agents. Food Research International, 53 (2): 568-584.
5. Basuki, S. 2011. Produksi Epigallocatechin Gallate Pada Kultur in vitro Kalus *Camellia sinensis* Sebagal Kandidat Pangan Fungsional. Journal Tecknologi Pangan, 5(2):92-100.
6. Beltz, L.A. 2009. The effects of the green tea polyphenol epigallocatechin gallate on the central nervous, endocrine, and innate immune systems. 137-152. In: Ramawat, K.G., (ed.). Herbal Drugs: Ethnomedicine to Modern Medicine. Springer, India, 402p.
7. Braun, L., Cohen, M., 2015. Herbs & natural supplements, An evidence-based guide. Elsevier, Australia, 1362p.
8. Chopade, V.V., Phatak, A.A., Upaganlawar, A.B., and Tankar, A.A. 2008. Green tea (*Camellia sinensis*) chemistry, traditional, medicinal uses and its pharmacological activities-a review. Pharmacognosy Reviews, 2 (3): 157-162.
9. Es'haghi, Z., Ahmadi- Golsefidi, M., Saify, A., Tanha, A.A., Rezaeifar, Z., and Alian-Nezhadi, Z. 2010. Carbon nanotube reinforced hollow fiber solid/ liquid phase microextraction: A novel extraction technique for the measurement of caffeic acid in *Echinacea purpurea* herbal extracts combined with high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A, 1217: 2768–2775.
10. Es'haghi, Z., Rezaeifar, Z., Rounaghi, G.H., Nezhadi, Z.A., and Ahmadi-Golsefidi, M. 2011. Synthesis and application of a novel solid-phase microextraction adsorbent: hollow fiber supported carbon nanotube reinforced sol-gel for determination of phenobarbital. Analytica Chimica Acta, 689(1): 122-8.
11. Ghasemzadeh, A., and Ghasemzadeh, N. 2011. Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. Journal of Medicinal Plants Research, 5(31): 6697-6703.
12. Gruenwald, J., Brendler, T., and Jaenicke, C. 2007. PDR For herbal medicines. Thomson Healthcare Inc, U.S.A, 1026p.
13. Hussain, M.S., Fareed, S., Ansari, S., Rahman, M.A., Ahmad, I.Z., and Saeed, M. 2012. Current approaches toward production of secondary plant metabolites. Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences, 4 (1): 10-20.
14. International Standard, 2005, ISO 14502-2(E), Switzerland, 23p.
15. Jain, S.C., Pancholi, B., and Jain, R. 2012. In-vitro Callus Propagation and Secondary Metabolite Quantification in *Sericostoma pauciflorum*. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 11(4): 1103-1109.
16. Karuppusamy, S. 2009. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures. Journal of Medicinal Plants Research, 3(13): 1222-1239.
17. Khaliq, A., Rashid, H., and Quraishi, A. 2002. Tissue culture studies of Tea (*Camellia sinensis* L.). Pakistan Journal of Agricultural Research, 17 (3): 297-301.
18. MofidBojnordi, M., Aghdasi, M., Mianabadi, M., and Nadaf, M. 2016. Optimization of callus induction and ephedrine production in *Ephedra major*. Journal of Plant Researches (Iranian Journal of Biology), 29 (1): 199-209.
19. Muthaiya, M.J., Nagella, P., Thiruvengadam, M., and Mandal, A.K.A. 2013. Enhancement of the Productivity of Tea (*Camellia sinensis* L.) Secondry Metabolites in Cell Suspension Cultures Using Pathway Inducers. Journal of Crop Science and Biotechnology, 16(2): 143-149.
20. Naz, A., Parween, R., Farheen, R., Kishwar, F., and Anwar, A. 2018. Infusion extracts of commercially available tea bag samples.

FUUAST Journal of Biology, 8(1): 147-152.

21. Nikolaeva, T.N., Zagoskina, N.V., and Zaprometov, M.N. 2009. Production of phenolic compounds in callus cultures of tea plant under the effect of 2,4-D and NAA. Russian Journal of Plant Physiology, 56 (1): 45-49.
22. Pizzorno, J.E., Murray, M.T., Joiner-Bey, H. 2016. The clinical's handbook of natural medicine. Elsevier Inc, U.S.A, 992p.
23. Ramachandra, R.S., and Ravishankar, G.A. 2002. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advances, 20: 101–153.
24. Reygaert, W.C. 2014. The antimicrobial possibilities of green tea. Frontiers in Microbiology, 5: 434.
25. Tian, M., Zhang, H., Row, K.H, 2012. Solid- Phase extraction of catechin compounds from green tea by catechin molecular imprinted polymers . Asian Journal of Chemistry. 24 (10): 4606-4610.
26. Watson, R., and Preedy, V.R. 2008. Botanical medicine in clinical practice. CABI, London, 915p.
27. Xueqing, Y., Yingjun, J., and Nana, Y. 2017. The effective and selective separation of (-) – epigallocatechin gallate. The Journal of Food Science and Technology, 54 (3): 770-777.
28. Zhang, H., Xu, F., Duan, Y.; Luo, X., Zhang, C., Yan, Y., Sun, G., and Sun, X. 2013. Selective adsorption and separation of (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) based on silica gel surface molecularly imprinted polymers. IERI Procedia, 5: 339-343.

Evaluation and comparison of the active ingredient epigallocatechingallate in callus obtained from culture of medicinal plant tissue of *Camellia sinensis* L. Kuntze by modern extraction method with Molecularly Imprinted Polymer (MIP)

Movahedi, A.[1], Ahmadi Golsefidi, M.[2*], Alizadeh, M.[3]

[1]Ph.D student, Department of Biology, Faculty of sciences, Gorgan branch, Islamic Azad University, Gorgan, Iran.

[2] Assistant Professor, Department of chemistry, Faculty of sciences, Gorgan branch, Islamic Azad University, Gorgan, Iran.

[3]Accossiate Professor, Department of Horticultural Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

Received: 2020-5-13 ; Accepted: 2020-9-20

Abstract

Due to the importance of the active ingredient epigallocatechin gallate (EGCG) in tea plant in pharmaceutical and food industries, the amount of EGCG in young leaf, old leaf and callus extract was measured and compared. EGCG in callus extract was isolated and measured by Molecularly Imprinted Polymer (MIP) technique in 2019 in Giah Essence Phytopharm Company. In order to induce callus production, callus of tea plant harvested from the western region of Mazandaran province was cultured in WPM, SH, MS media with different amounts of plant hormones. Leaves and callus extracted with 70% methanol by maceration method. For optimization of extraction and purification, various quantities of functional multiwalled-CNTs 1-10 mg were used for production of CNTs-MIP. EGCG of callus extract was extracted with CNTs-MIP and its amount was determined with HPLC. The highest volume of callus in WPM medium and the highest amount of EGCG in SH medium was observed with optimized concentrations of hormones BA (2 mg/l), 2, 4_D (0.5 mg/l). The highest content of EGCG was extracted by adding 8 mg of MWCNTs in the polymer structure. EGCG in young and old leaves and callus were 37.34, 7.19 and 0.13 mg/g of dried weight, respectively. By CNTs-MIP, the obtained EGCG content in callus was 0.91 mg/g. Despite the low amount of EGCG in callus, using CNTs-MIP, the amount of this substance are measureable with a concentration coefficient of 8 times and indicates the efficiency of this technique.

***Keywords*:** Callus, EGCG, *Camellia sinensis* L., MIP, Tissue Culture

*Corresponding author; mazyarahmadigolsefidi@yahoo.com