بررسی فاکتورهای بیوشیمیایی و آنتی‌اکسیدان‌های برگرفته از چای ایرانی کلون ۱۰۰ و مطالعه آن بر سرطان روده بزرگ رده سلولی HCT-116 در موش *BALB/c*

شهرزاد رهنما[a]، آسا ابراهیمی[b*]، فروزنده محجوبی[c]، محمود خسرو شاهلی[d]، مهدی رهایی[e]

[a] *دانشجوی دکتری اصلاح نباتات، گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران*

[b] *استادیار گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران*

[c] *دانشیار گروه ژنتیک پزشکی، پژوهشکده ملی ژنتیک و زیست فن آوری، کرج، ایران*

[d] *استاد گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران*

[e] *دانشیار گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران*

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۱۰/۰۷ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۱۲/۰۴

https://dorl.net/dor/20.1001.1.20080123.1401.19.4.5.2 DOI:10.30495/jftn.2022.64970.11170

چکیده

مقدمه: چای یکی از محبوب‌ترین نوشیدنی‌ها در جهان است، حاوی ترکیباتی از آنتی‌اکسیدان‌ها و پلی‌فنول‌ها می‌باشد که برای سلامت انسان مفید است. چای یک محصول فراغذایی جهت پیشگیری و درمان بیماری‌های مختلف است. هدف از این پژوهش بررسی خواص آنتی اکسیدان‌ها و پلی‌فنل‌ها و میزان اثر بخشی عصاره هیدرومتانولی چای سفید بر روند رشد تومور سرطان کولون در موش *BALB/c* می‌باشد.

مواد و روش ها: عصاره برگ سه نوع چای سفید، سیاه و سبز از طریق سه روش استخراج آبی، متانولی و هیدرومتانولی بدست آمد. برای تعیین ظرفیت مهار رادیکال آزاد، آزمون DPPH انجام شد و محتوای فنلی عصاره‌ها با استفاده از روش فولین سیوکالتو سنجیده شد. موش‌های *BALB/c* با وزن اولیه یکسان با استفاده از رده سلولی *HCT-116* مدل سرطان کولون در آنها القاء شد، کلیه گروها تحت تیمار عصاره با دو دوز غلظت، کمترین دوز با میزان mg/kg ۱۵ و بیشترین دوز با میزان mg/kg ۱۵۰ قرارگرفتند. صفات مختلف در موش مورد بررسی قرار گرفت سپس آنالیز داده‌ها توسط مقایسه میانگین و آزمون یکطرفه انجام شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد عصاره انواع چای با روش استخراج هیدرومتانولی موثرترین عصاره از نظر میزان آنتی‌اکسیدانی می‌باشد و اختلاف معنی‌داری با سایر روش‌های عصاره‌گیری داشت. عصاره چای سفید بیشترین و قوی‌ترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی و بالاترین میزان مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد را نشان داد. نتایج مطالعات حیوانی نشان داد که اختلاف وزن ثانویه از اولیه در موش‌های دریافت کننده عصاره دوز بالا نسبت به موش‌های دریافت کننده دوز کم افزایش معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) دارد. همچنین اندازه تومور و قطر و وزن تومور در دوز بالا نسبت به دوز پایین کاهش معنی‌داری داشته است.

نتیجه‌گیری: در میان روش‌های مختلف عصاره‌گیری روش هیدرومتانولی در چای سفید بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و بالاترین کاتچین‌های اختصاصی را دارد و با توجه به نتایج عصاره چای سفید اثرات کاهش دهنده ای در روند و کنترل سرطان روده بزرگ در موش‌های مبتلا می‌تواند داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: *چای، رادیکال‌های آزاد، سرطان کولورکتال،کروماتوگرافی، کاتچین*

* نویسنده مسئول مکاتبات email: dr.asaebrahimi@gmail.com

مقدمه

گیاهان طیف وسیعی از ترکیبات شیمیایی تولید می‌کنند که ظاهرا نقش مستقیمی در رشد آن‌ها ندارند، این ترکیبات متابولیت ثانویه نامیده می‌شوند آلکالوئید، ترپنوئید، فلاونوئیدها، رنگدانه‌ها و تانن‌ها، اجزای مهمی از این ترکیبات هستند. متابولیت‌های ثانویه اثرات بیولوژیکی مانند ضد التهابی، ضد سرطان، ضد بارداری و اثرات مختلف بر روی سلول‌های خون، لیپید و سیستم قلبی عروقی دارند. در درمان‌های مشترک سرطانی با یافتن ترکیبات ثانویه از محصولات طبیعی و گیاهان دارویی، پیشرفت‌های مختلف گزارش شده است (Wesam *et al*., 2017). چای منبع طبیعی کافئین، تئوفیلین، تیانین و آنتی اکسیدان‌ها است و به دلیل وجود متابولیت‌های ثانویه گسترده در برگ‌های خود، از جمله پلی فنول‌ها، تیانین و روغن‌های فرار، فواید سلامتی زیادی برای انسان به همراه دارد (Shi *et al*., 2011). رادیکال‌های آزاد مولکول‌های بسیار فعالی هستند که در طی تنفس سلولی و متابولیسم طبیعی تولید می‌شوند و گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) ارتباط نزدیکی با فرایندهای فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی دارند. گونه‌های اکسیژن فعال می‌تواند به عنوان مولکول‌های سیگنالی تنظیم کننده فعالیت‌های اساسی سلولی مانند: رشد سلول و پاسخ‌های سازگار سلولی عمل کند (Hazel and Roebuck, 2001). هنگامی که تعادل بین تجمع ROS و روند آنتی اکسیدانی بدن از بین برود، باعث ایجاد استرس اکسیداتیو و آسیب به سلول‌ها و بافت‌ها می‌شود و باعث بیماری‌های مختلف می‌شود (Mao *et al*., 2017).

چای، به عنوان یک گیاه یکساله، متعلق به خانواده theaceae با نام علمی *Camellia sinensis L.* است و خاستگاه آن متعلق به چین، تبت و ژاپن می‌باشد (Hilal, 2017). چای به عنوان یکی از ۳ نوشیدنی اصلی در جهان، همراه با قهوه و کاکائو در نظر گرفته می‌شود. چای‌ها به طور گسترده ای به عنوان یک نوشیدنی روزانه در چین و همچنین در بسیاری از کشورها پذیرفته می‌شوند. از زمان‌های بسیار قدیم، چای به عنوان یک محصول بهداشتی یا دارویی برای پیشگیری و درمان بیماری‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گرفته است. مطالعات قبلی فواید بی‌شمار چای را نشان داده است، مانند فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، باکتریواستاتیک و ضد سرطانی و تنظیم کننده متابولیسم لیپیدها است (Zhaoming *et al*., 2020). برگ چای به عنوان عناصر تقویت کننده سیستم ایمنی شناخته شده است که ترکیبات چای شامل: آلکالوئیدها، پلی فنول‌ها، اسیدهای آمینه، پلی‌ساکاریدها، مواد فرار، ویتامین‌ها، لیپیدها و عناصر معدنی است (Somsong *et al*., 2020). چای بدلیل خواص ضد میکروبی، ضد باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی، جهت کاهش سطح کلسترول خون و برای کاهش خطرات قلبی- عروقی و همچنین خطر ابتلا به سرطان شناخته شده است (Yadav *et al*., 2020). مهمترین پلی‌فنول‌های غالب در برگ‌های چای گروه کاتچین‌ها می‌باشند که شامل: اپی گالوکاتچین گالات (EGCG)، اپی‌گالوکاتچین (EGC)، اپی‌کاتچین گالات (ECG)، گالوکاتچین (GC) و اپی‌کاتچین (EC) است (Wu *et al*., 2012). سایر پلی‌فنول‌ها مانند: فلاونول‌ها از جمله کوئرستین، کامپرول و میریسیتین و همچنین گلیکوزیدها می‌باشند که آن‌ها نیز در برگ‌ها، گل‌ها و محصولات چای یافت می‌شوند اما در مقادیر کمتری نسبت به کاتچین‌ها وجود دارند (Jiang, *et al*., 2015). از بین کاتچین‌ها (فلاوان-۳- ال) نوعی آنتی‌اکسیدان که از مهمترین فلاونول‌ها به شمار می‌رود. فراوان‌ترین و فعال‌ترین کاتچین موجود در چای سبز (از نظر فعالیت آنتی اکسیدانی) اپی‌گالو کاتچین گالات می‌باشد (Komes *et al*., 2010). پلی‌فنول‌های چای یک آنتی‌اکسیدان موثر است که می‌تواند با مهار رادیکال‌های آزاد و تنظیم فعالیت انواع مختلف اکسیدازها در بدن، از بیماری‌ها پیشگیری و آن‌ها را معالجه کند. این ناشی از ساختار هیدروکسیل فنولی است که در آن الکترون اثر دارد. توانایی اتصال یون هیدروژن تضعیف می‌شود و بنابراین احتمال جدا شدن آن بیشتر است، بنابراین یون هیدروژن فعال رادیکال‌های آزاد و گونه‌های اکسیژن فعال دیگر را خنثی می‌کند و رادیکال‌های آزاد را از بین می‌برد (Zuo *et al*., 2018).شواهد روشنی وجود دارد که نشان می‌دهد رادیکال‌های آزاد با پیشرفت بیماری‌هایی مانند آترواسکلروز، آمفیزم و سرطان همراه هستند (Hayashi and Iguchi, 2018). پلی فنول‌های چای یکی از مواد طبیعی است که خطر ابتلا به سرطان را کاهش می‌دهد، زیرا خواص آنتی‌اکسیدانی قوی خود را که بر مکانیزم‌های مولکولی در آنژیوژنز، متاستاز و تنظیم مرگ سلول اثر

می‌گذارد به اثبات رسیده است. مطالعات اپیدمیولوژیک نشان داده است که مصرف پلی‌فنول‌ها پیری را به تأخیر می‌اندازد و به پیشگیری و درمان سرطان و بیماری‌های تخریب عصب، قلب و عروق و عروق مغزی کمک می‌کند (Kumar *et al.*, 2017). سازوکاری که پلی‌فنل‌های چای و اثرات آنتی‌اکسیدانی آن ایجاد می‌کنند شامل افزایش فعالیت آنزیم‌های ضد اکسیدانی، مهار پراکسیداسیون لیپید، جذب رادیکال‌های آزاد می‌باشد (Yokozawa *et al.*, 2002). مطالعات نشان داده است که پلی‌فنول‌های چای به افزایش تعداد باکتری‌های مفید در روده خوک‌ها، کاهش کلستریدیوم و کاهش مدفوع و آمونیاک کمک می‌کند. به این ترتیب، کنترل مواد حاوی نیتروژن با مواد دفعی حیوانات برای حفاظت از محیط زیست و ارتقاء کشاورزی سالم مهم است (Hara *et al.*, 1998).

لذا هدف از مطالعه حاضر بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی و پلی فنولی انواع چای (سفید، سیاه و سبز) با روش‌های مختلف عصاره‌گیری (آبی، هیدرومتانولی و متانولی) و بررسی عصاره هیدرومتانولی چای سفید بر وزن بدن و روند رشد تومور در سرطان روده بزرگ در موش *BALB/c* می‌باشد.

مواد و روش‌ها

- تهیه نمونه چای

نمونه‌های تهیه شده چای سفید، سیاه و سبز (*C. Sinensis* (*L.*)) متعلق به توده کلون ایرانی ۱۰۰ در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت، برگ‌های جوان گیاه چای از باغستان‌های چای واقع در استان گیلان جمع آوری گردید و فرآیند تخمیر و فرآوری برگ‌های چای سیاه، سبز و سفید در کارخانه‌های فرآوری چای با نظارت پژوهشکده چای صورت گرفت. برگ‌های خشک انواع چای پس از تخمیر و آماده سازی توسط ازت مایع به صورت پودر بدست آمد که پودرهای بدست آمده برای آزمایشات و مراحل بعدی در تیوپ‌های استخراج در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

- عصاره‌گیری نمونه

عصاره گیری برگ‌های چای سیاه، سبز و سفید با توجه به دستورالعمل پروتکل ۱- ۱۴۵۰۲- ISO (استاندارد عصاره‌گیری تایید شده توسط سازمان ملی استاندارد کشور) با کمی تغییرات با ۳ روش عصاره‌گیری متانولی، آبی و هیدرو متانولی با استفاده از ۳ حلال آب مقطر ۲ بار تقطیر شده، متانول ۷۰ درصد و ترکیب آب مقطر – متانول ۷۰ درصد صورت پذیرفت. عصاره‌ها به وسیله فریزدرایر تغلیظ و سپس در آون با حرارت ۴۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند و به صورت پودر درآمدند. پودرهای حاصل جهت انجام آزمایشات بعدی در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

۱- نحوه عصاره گیری متانولی

جهت عصاره‌گیری به روش متانولی، ۱۰ گرم پودر برگ‌های چای (سفید، سیاه و سبز) را با ۲۰۰ میلی‌لیتر متانول ۷۰ درصد مخلوط شد. نمونه‌ها به مدت ۲ساعت به دستگاه بن ماری ۷۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند و در مرحله بعد نمونه‌ها به دستگاه اولترا سونیک منتقل و به مدت ۷-۵ دقیقه عمل سونیکیشن بر روی نمونه‌ها صورت پذیرفت و نمونه‌ها پس از صاف شدن با قیف بوخنر و کاغذ صافی واتمن شماره یک، توسط دستگاه روتاری (دستگاه تقطیر در خلاء) در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد تلغیظ شد و سپس عصاره تغلیظ شده در سطح پلیت‌های شیشه‌ای به صورت ورقه نازک پخش و سپس به آون تحت خلا (C40) منتقل گردید. عصاره تلغیظ شده تا زمان مصرف در فریزر ۱۸- سانتی گراد نگهداری شد (Ozkan *et al.*, 2007).

۲- نحوه عصاره گیری با آب مقطر

در روش مذکور برگ‌های خشک شده چای (چای سیاه، سبز و سفید) را توسط ازت مایع و هاون به صورت پودر شده تهیه شد و سپس به میزان ۱۰ گرم از هر نمونه به همراه ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به تیوب‌های استخراج اضافه شد و در نهایت سایر مراحل عصاره گیری همانند دو روش متانولی صورت پذیرفت.

۳- عصاره گیری با روش هیدرومتانولی

در این روش عصاره‌گیری از ترکیب آب مقطر – متانول ۷۰ درصد به نمونه‌های پودر شده به میزان ۰/۵ گرم نمونه‌های پودری برگ‌های چای اضافه شد. ۵ میلی لیتر

متانول ۷۰ درصد با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد و ۵ میلی‌لیتر آب مقطر دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به نمونه‌های برگ موجود در تیوپ‌های استخراج اضافه شد و پس از دو ساعت بن ماری ۷۰ درجه سانتی‌گراد عصاره چای توسط کاغذ صافی واتمن صاف گردید، سپس عصاره بدست آمد به دستگاه روتاری منتقل گردید تا عصاره تلغیظ گردد و در سایر مراحل مانند روش عصاره گیری متانولی انجام شد.

- **تعیین محتوای پلی فنولی کل (TPC)**

جهت اندازه‌گیری ترکیبات فنولی از معرف فولین سیوکالتو استفاده گردید (McDonald *et al.*, 2001) معرف فولین ۱ به ۱۵ با آب مقطر رقیق شد. روش سنجش جهت اندازه‌گیری و سنجش فنل کل از روش Pandjaitan و همکاران (۲۰۰۵) و Ebrahimzadeh و همکاران (۲۰۰۸) استفاده شد.

محتوای فنول کل انواع عصاره چای سیاه، سبز و سفید با استفاده از معرف فولین – سیوکالچو توسط دستگاه (UNICO UV 2100) مدل UV-Vis اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. به نیم میلی لیتر از عصاره‌ها (مقدار ۰/۰۰۵ گرم پودر نمونه در ۱ میلی‌لیتر متانول)، ۲ میلی لیتر واکنشگر فولین سیوکالچو ۱۰ درصد و پس از ۵ دقیقه، ۲ میلی لیتر از محلول ۵ درصد کربنات سدیم به آن اضافه شد. لوله‌های آزمایش را بعد از تکان دادن درون حمام آب با دمای ۴۰ درجه سانتی گرد قرار گرفته شد و پس از گذشت تقریبا ۳۰ دقیقه جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۰ نانومتر خوانده شد. جهت رسم منحنی استاندارد از اسید گالیک استفاده شد (Wojdylo *et al.*, 2007). میزان کل ترکیبات فنلی موجود در عصاره با استفاده از معادله بدست آمده از منحنی استاندارد محاسبه و رسم گردید (نمودار ۱)، نتایج بر حسب میلی گرم اسید گالیک در هر گرم عصاره بیان شد. آزمایش‌ها در سه تکرار انجام و میانگین آن‌ها گزارش شد.

- **روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالاHPLC**

در این روش تمامی نمونه با استفاده از دستگاه HPLC با مشخصات دستگاه بنام Shimadzu با آشکارساز UV-VIS با طول موج ثابت (مدل LC10AD VP)، و انژکتور نمونه Rheodyne با یک حلقه نمونه ۲۰ میکرولیتری بررسی شد. ستون کروماتوگرافی C18 (۳۰۰ میلی‌متر x 3.9 میلی متر ID x 5µm) و سرعت جریان فاز متحرک ۱ میلی لیتر در دقیقه و تشخیص با اندازه گیری جذب UV در طول موج ۲۸۰ نانومتر انجام شد. فاز متحرک از آب، استونیتریل، متانول، اتیل استات و اسید استیک یخبندان (۸۹:۶:۳:۱:۱ v/v/v/v/v) تشکیل شده بود (Merck، آلمان). از نرم افزار Star v6.3 (Varian) برای پردازش داده استفاده شد روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا از جمله روش‌های کروماتوگرافی برای جداسازی مواد به شمار می‌آید و این جدایش بر اساس بر هم کنش نمونه با فازهای ساکن و متحرک انجام می‌گیرد، جهت اندازگیری مقدار کل کاتچین‌ها در عصاره‌های مختلف چای آماده شده از طریق انواع مختلف عصاره گیری، برای انجام آزمون طبق روش شرح داده شده در استاندارد ملی ایران به شماره ۲-۸۹۸۶، دستگاه HPLC و با استفاده از حلال‌های ذکر شده با خلوص بالا تهیه و آماده سازی شد که همزمان با محلول‌های استانداردگالیک اسید و اپی کاتچین در طول موج ۲۷۸ نانومتر با ستون اختصاصی آزمون و تعیین مقدار آنها طبق استاندارد ملی مربوط با ۳ تکرار انجام شد (National Standard Organization of Iran, No 2., 2007).

- **بررسی اثر آنتی اکسیدانی به روش DPPH:**

فعالیت‌های مهار رادیکال آزاد با استفاده از روش DPPH (فعالیت‌های آنتی اکسیدانی) با کمی تغییرات در روشانجام شد (Vignoli *et al.*, 2011). بدین ترتیب برای تمام عصاره‌ها با استفاده از روش اسپکتروفتومتری میزان جذب رادیکال‌های آزاد در هر نمونه تعیین شد. یک میلی لیتر از عصاره با ۵ میلی لیتر DPPH مخلوط شد (۵۰۰ میکرو مولار در محلول متانول، مربوط به ۱۰۰ میکرومولار با PH=۷/۴) به مدت ۱ دقیقه عمل ورتکس روی تیوب‌ها انجام شد و سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در تاریکی (با فویل آلومینیوم پیچیده شده) به مدت ۳۰ دقیقه (برای تکمیل واکنش) انکوبه شد. جذب در ۵۱۷ نانومتر بر روی اسپکتروفتومتر UV-Vis پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در تاریکی اندازه‌گیری شد. سرانجام، جذب نمونه‌ها در مقابل نمونه استاندارد که اسید اسکوربیک بود قرائت شد و با توجه به فرمول زیر مقدار درصد جذب رادیکال‌های آزاد در هر

نمونه محاسبه شد. درصد مهار فعالیت با استفاده از معادله زیر تعیین شد:

درصد جذب رادیکال آزاد = (Ac-As)/Ac×100

در این معادله Ac و As به ترتیب جذب کنترل و جذب نمونه می‌باشد.

- مطالعات حیوانی

- گروه‌های تحت تیمار

تعداد ۱۵ عدد موش ماده بالب سی با سن تقریبی ۶ الی ۸ هفته و وزن تقریبی ۲۳-۲۵ گرم از انیستیتو پاستور تهران خریداری شدند و در شرایط استاندارد نگهدری حیوانات آزمایشگاهی (۱۲ ساعت تاریکی/۱۲ ساعت روشنایی، غذای پلت استاندارد و دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند.

در مرحله عملی تحقیق بر روی موش‌ها، ۱۵ سر موش به‌صورت تصادفی به ۳ گروه (n=۵) تقسیم شدند که گروه‌ها شامل: یک گروه شاهد سرطانی و دو گروه سرطانی تحت تیمار با ۲ غلظت مختلف عصاره هیدورمتانولی عصاره چای سفید ۱۵۰ mg/kg و ۱۵ mg/kg و قرارگرفتند و روزانه در یک زمان یکسان به مقدار ۰,۲ میلی لیتر از عصاره را دریافت نمودند.

- القای تومور

پس از اینکه موش‌ها به وزن تقریبی ۲۵ گرم رسیدند، موش‌ها را بیهوش نموده و با عمل جراحی کوچک در ناحیه شکمی رده سلولی را در بافت روده بزرگ موش‌ها به میزان ۳×۱۰^{۵} در هر موش تزریق شد (wojdylo *et al.*, 2007). پس از گذشت تقریبا ۲۸ روز برجستگی تومورها در ناحیه شکمی قابل شناسایی بود و پس از اتمام کامل آزمایشات تومورها را کاملاً به صورت استریل از بدن موش‌ها خارج شدند و در فرمالین ۱۰ درصد نگهداری شد و بافت جدا شده کبد و روده بزرگ موش به یخچال۲۰- درجه سانتی گراد منتقل گردید.

- اندازگیری وزن موش‌ها

اندازه‌گیری وزن موش‌ها در دو مرحله انجام گرفت، مرحله اول پس از تزریق سلول سرطانی به موش‌ها و در ۲۸ روز انجام گرفت و مرحله دوم به مدت دو هفته، هنگام تزریق عصاره هیدرومتانولی چای سفید که روزانه به صورت گاواژ انجام می‌گرفت، صورت پذیرفت در نهایت در این دو مرحله وزن موش‌ها اندازگیری شد.

- اندازگیری رشد تومور و وزن تومور

پس از ۲ هفته بعد از اینکه موش‌ها در دستگاه بوسیله اتر بیهوش شدند، تومورها از بدن خارج شد و وزن آن‌ها محاسبه شد و همچنین قطر و اندازه تومورها بوسیله کولیس اندازگیری شد.

- تجزیه و تحلیل آماری

از انواع برگ‌های چای مورد مطالعه سه نمونه برداشت و آزمایش‌های مختلف برای هر نمونه سه بارتکرار گردید. داده‌های بدست آمده از این مطالعه به صورت کامل ساده تصادفی با ۳ تکرار صورت گرفت. برای انجام آنالیز واریانس داده‌ها براساس Anova با کمک نرم‌افزار Graphpad Prisme 9 و spss و مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی در سطح اطمینان ۵ درصد و یک درصد انجام شد و برای رسم نمودارها از Excel 2019 و برنامه Prisme Graphpad 9 استفاده شد. نتایج هر یک از گروهها برحسب میانگین ± انحراف معیار تعریف شد و پارامترهای آماری نظیر میانگین، انحراف معیار، دامنه تغییرات، حداقل، حداکثر و ضریب تغییرات محاسبه گردید.

یافته‌ها

- ترکیبات پلی فنولی کل

مقایسه میانگین میزان ترکیبات فنولی استخراج شده در انواع چای کلون ۱۰۰، بر حسب میلی گرم گالیک اسید در جدول ۱ آورده شده است. مقدار ترکیبات پلی‌فنلی کل به روش فولین سیو کالچو و بر مبنای منحنی استاندارد اسید گالیک (R^2=0.8981,Y=0.4455x+0.072) با حضور و بدون حضور سدیم کربنات محاسبه گردید که به ترتیب محتوای پلی‌فنولی کل در نمودارهای ۱ و ۲ لحاظ شده است. اندازه‌گیری پلی فنول کل در انواع چای با دقت نسبتاً بالایی نسبت به استاندارد گالیک اسید انجام شده است.

- میزان پلی فنول کل در انواع چای کلون ۱۰۰ با روش فولین سیوکالچو

محتوای پلی‌فنولی کل در انواع مختلف چای از جمله،

سیاه، سبز وسفید کلون ۱۰۰ بوسیله روش‌های عصاره‌گیری آبی، متانولی و هیدرومتانولی اندازگیری شد و نتایج بدست آمده در جدول ۱ آورده شده است. کلیه نتایج با توجه به روش عصاره‌گیری تفکیک شده است. در روش عصاره‌گیری هیدرومتانولی، نتیجه پلی فنولی چای سفید با (P<۰/۰۱) ۲۵/۶۴±۰/۳۳ میلی‌گرم گالیک اسید اکیووالانت در هر گرم از وزن خشک و پس از آن چای سبز با (P<۰/۰۱) ۲۱/۱۶±۰/۳۶ میلی‌گرم گالیک اسید اکیووالانت در هر گرم از وزن خشک برگ دارای بالاترین محتوای پلی‌فنولی کل در ساختار خود بودند.

در مورد روش آبی نتایج بیان داشت که چای سفید با (P<۰/۰۵) ۱۹/۶۱±۰/۳۶ میلی‌گرم گالیک اسید اکیووالانت در هر گرم از وزن خشک برگ می باشد که تفاوت معنی داری در میزان پلی فنول کل در میان چای سبز و سیاه به روش عصاره‌گیری آبی مشاهده نشد، در ادامه نتایج نشان داد که در انواع مختلف عصاره چای از جمله روش عصاره‌گیری متانولی، محتوای پلی‌فنولی کل در چای سفید به میزان (P<۰/۰۵) ۱۲/۳۴±۰/۰۲۹ میلی‌گرم گالیک اسید اکیووالانت در هر گرم از وزن خشک دارای اختلاف معنی دار با دیگر انواع دیگر چای(سبز و سیاه) نمی‌باشند. کمترین میزان پلی فنول کل در عصاره چای سیاه در روش متانولی به میزان (P<۰/۰۵) ۹/۴۳±۰/۰۳۹ میلی‌گرم گالیک اسید اکیووالانت در هر گرم از وزن خشک محاسبه شده است.

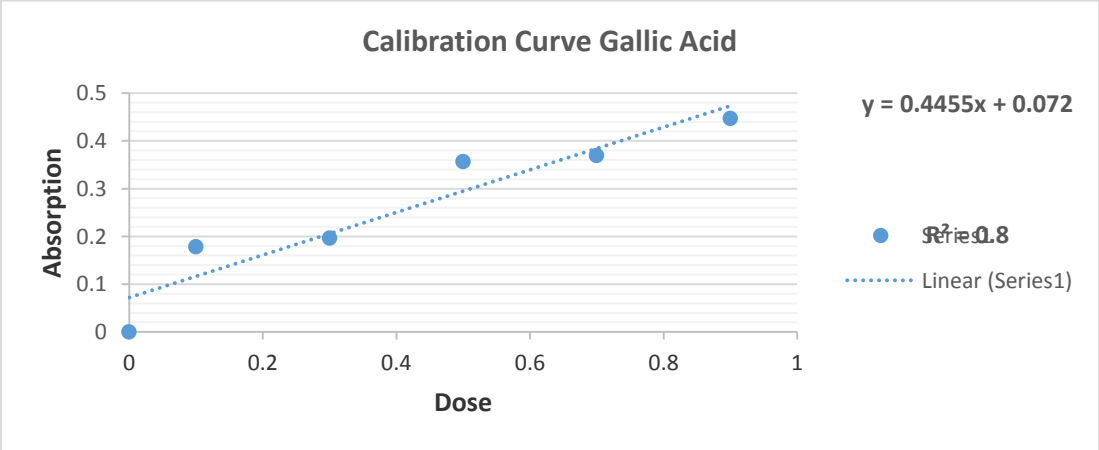


Figure 1- Calibration curve and Gallic acid line equation for clone 100 tea samples

شکل ۱- منحنی کالیبراسیون و معادله خط اسید گالیک برای کلون ۱۰۰ نمونه چای

جدول ۱- مقایسه میانگین مقدار پلی فنل کل در کلون ۱۰۰ چای بر حسب میلی گرم معادل اسید گالیک به ازای هر گرم وزن خشک نمونه برگ

Table 1- Comparison of the average amount of total polyphenols in clone -100 teas in terms of mg of gallic acid equivalents per gram of dry weight of leaf sample

Tea sample	Extract method	Folin-ciocalteu Method	Folin-ciocalteu Method in the presence of sodium carbonate
		(Mg gallic acid equivalent per gram of dry weight)	(Mg gallic acid equivalent per gram of dry weight)
White	Hydro	19/61±0/36*	30/01±0/59*
green	Hydro	15/52±0/21$^{n.s}$	23/98±0/45*
black	Hydro	12/60±0/29$^{n.s}$	18/76±0/22*
white	Methanol	12/34±0/29$^{n.s}$	19/15±0/25*
green	Methanol	11/58±0/39$^{n.s}$	15/16±0/88$^{n.s}$
black	Methanol	9/43±0/39$^{n.s}$	13/02±0/16$^{n.s}$
White	Hydromethanol	25/64±0/33**	39/05±0/78**
green	Hydromethanol	21/16±0/36*	26/44±0/18*
black	Hydromethanol	16/37±0/15$^{n.s}$	22/51±0/24*

standard error for 3 replications at two significant levels (P <0.05 *, P <0.01 ** The results are expressed in terms of mean .n.s: non-significant)

نتایج بر حسب میانگین خطای استاندارد برای ۳ تکرار در دو سطح معنی‌دار (P<0.05*، P< 0.01 ** و n.s غیر معنی‌دار) بیان می‌شوند

با توجه به بررسی انواع روش‌های عصاره‌گیری و تعیین میزان پلی‌فنولی کل با روش فولین سیوکالچو مشخص شد که دو روش عصاره‌گیری آبی- متانولی و آبی کارآمدتر و موثرتر برای اندازه‌گیری و سنجش پلی‌فنول‌های چای می‌باشند و روش عصاره گیری متانولی روش مناسبی برای سنجش میزان پلی فنول کل در هر ۳ نوع چای نمی‌باشد.

- میزان پلی‌فنول کل انواع چای کلون ۱۰۰ با روش فولین سیوکالچو در حضور سدیم کربنات

با توجه به روش‌های مختلف جهت عصاره‌گیری انواع مختلف چای و بررسی میزان پلی‌فنول کل در هر یک از روش‌ها با توجه‌به جدول ۱ مشاهده شد؛ روش هیدرومتانولی عصاره چای سفید با میزان (P<۰/۰۱) ۳۹/۰۵±۰/۷۸ میلی‌گرم گالیک اسید اکیووالانت در هر گرم از وزن خشک و پس از آن چای سبز با میزان (P<۰/۰۵) ۲۶/۴۴±۰/۱۸ میلی‌گرم گالیک اسید اکیووالانت در هر گرم از وزن خشک و چای سیاه با میزان (P<۰/۰۵) ۲۲/۵۱±۰/۲۴ میلی‌گرم گالیک اسید اکیووالانت در هر گرم از وزن خشک برگ دارای بالاترین محتوای پلی فنولی کل در ساختار خود بودند و بیشترین میزان پلی فنول کل در این گروه بیشتر نمایان شد.

در نتایج روش عصاره گیری آبی مشخص شد، چای سفید با میزان (P<۰/۰۵) ۳۰/۰۱±۰/۵۹ میلی‌گرم گالیک اسید اکیووالانت در هر گرم از وزن خشک برگ و پس از آن چای سبز با میزان (P<۰/۰۵) ۲۳/۹۸±۰/۴۵ و چای سیاه با میزان (P<۰/۰۵) ۱۸/۷۶±۰/۲۲ میلی گرم گالیک اسید اکیووالانت در هر گرم از وزن خشک برگ به ترتیب بالاترین محتوای پلی فنولی کل در ساختار خود داشتند که در مقایسه با روش هیدرومتانولی کمترین میزان پلی فنولی را دارا بودند.در ادامه در روش متانولی نتایج نشان داد؛ در چای سفید در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌دار با میزان (P<۰/۰۵) ۱۹/۱۵±۰/۲۵ میلی‌گرم گالیک اسید اکیووالانت در هر گرم از وزن خشک برگ با دو نوع دیگر چای (سبز و سیاه) وجود دارد و در محتوای پلی‌فنولی کل دارای اختلاف معنی دار با یکدیگر مشاهده نشد.

پس از بررسی روش‌های مختلف عصاره‌گیری و تعیین محتوا پلی‌فنولی کل با روش فولین سیوکالچو در حضور سدیم کربنات مشخص شد که ابتدا روش عصاره‌گیری هیدرومتانولی و سپس روش عصاره گیری آبی کارآمدتر و موثرتر برای اندازه گیری پلی فنول های چای می باشند.

- کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)

با توجه به بررسی‌های انجام شده بوسیله روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و در حضور اسید گالیک میزان کمی انواع کاتچین‌های مهم چای تعیین شد.

بر اساس جدول ۲ بیشترین میزان ترکیب شناسایی شده درچای سفید کلون ۱۰۰ با توجه به روش های مختلف عصاره‌گیری در روش عصاره‌گیری هیدرومتانولی مشاهده شد. در این روش بیشترین ترکیب اپی گالوکاتچین گالات بوده است، بطوری که چای سبز با مقدار ۴/۳۵ میلی‌گرم بر گرم و چای سیاه با مقدار ۳/۰۹ میلی گرم بر گرم مقادیر کمتری از این ترکیب را نسبت به چای سفید با مقدار ۷/۰۱ میلی گرم بر گرم نشان داد.

در ادامه نتایج مشخص شد عصاره چای سفید با توجه به انواع مختلف روش عصاره‌گیری می‌تواند مقادیر بالاتری از نتایج کمی را برای انواع کاتچین های چای و گالیک اسید دارا باشد. در شناسایی ترکیبات کاتچین از روش کروماتوگرافی و نیز با توجه به نتایج محتوای پلی فنولی کل، دیده شد که روش عصاره گیری آبی- متانولی همان گونه که پلی‌فنول‌های بیشتری را شناسایی می‌کند، در شناسایی کمی با روش فوق نیز موثر است (نمودار ۲).

جدول ۲- محتوای کمی انواع مهم کاتچین چای با اسید گالیک در نتایج چای بر اساس میلی گرم در گرم

Table 2- Quantitative content of important types of tea catechin with Gallic acid in tea results based on mg / g

Sample Tea	Extract method	GA	C	EC	ECG	EGC	EGCG
White	Hydro	2/33	0/74	1/65	1/1	5/7	6/8
green	Hydro	2/1	0/49	1/24	0/67	2/65	4/15
black	Hydro	1/35	0/38	0/67	0/55	1/15	2/94
white	Methanol	2/24	0/62	1/57	1/01	5/45	6/84
green	Methanol	2/11	0/41	1/14	0/61	2/1	4/02
black	Methanol	1/25	0/3	0/59	0/52	1/16	2/78
White	Hydro-methanol	2/6	0/91	1/8	1/16	6/01	7/01
green	Hydro-methanol	2/45	0/62	1/4	0/69	2/7	4/35
black	Hydro-methanol	1/5	0/49	0/69	0/63	1/4	3/09

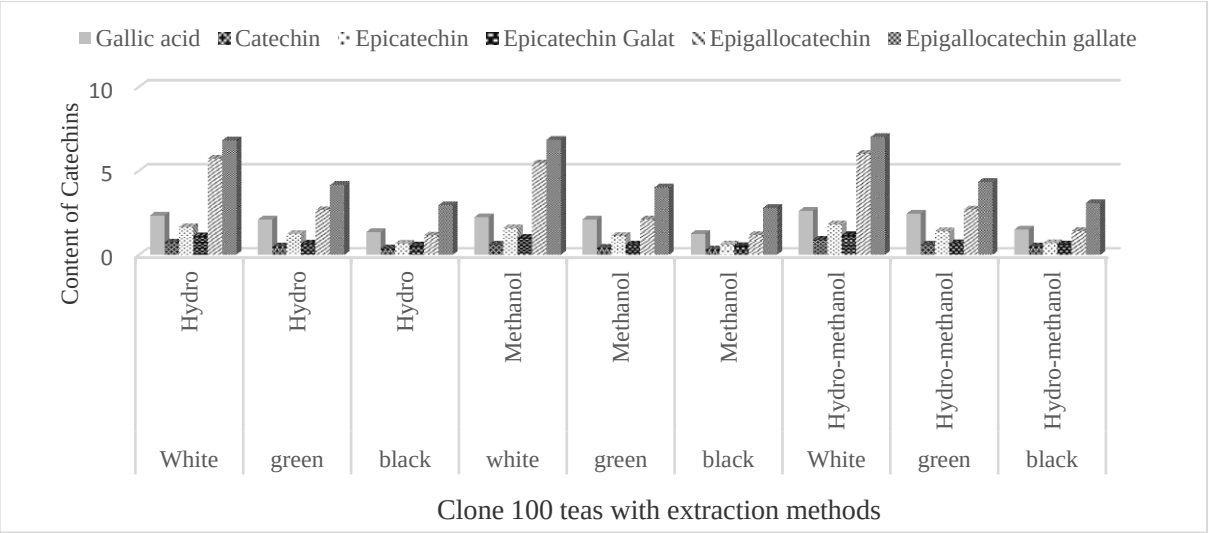


Figure 2- Quantitative content of the main types of tea catechins with Gallic acid in different types of tea

شکل ۲- محتوای کمی انواع اصلی کاتچین چای با اسید گالیک در انواع چای

- مهار رادیکال های آزاد در چای کلون ۱۰۰

میزان مهار رادیکال های آزاد در جدول ۳ آورده شده است. تمامی نمونه ها با غلظت برابر با غلظت استوک اصلی استخراج در برابر نمونه کنترل اسید اسکوربیک سنجیده شدند. نمودار ۳ منحنی کالیبراسیون در حضور اسید آسکوربیک را برای سنجش آنتی‌اکسیدان‌ها نشان می‌دهد. با توجه به نمودار R^2 ضریب تشخیص (Coefficient of Determination) برابر ۰/۹۰۹۴ می‌باشد، نشان دهنده این امر است که سنجش میزان فعالیت آنتی اکسیدانی در نمونه‌ها با ضریب اطمینان بالا در مقاسیه با ترکیب استاندارد سنجیده شده است.

تمامی عصاره‌های چای کلون ۱۰۰ به غیر از نمونه‌های چای سبز و سیاه با روش عصاره‌گیری آبی و نمونه‌های چای سبز و سیاه با روش عصاره‌گیری متانولی دارای نسبت بالایی از جذب رادیکال های آزاد در مقایسه با نمونه شاهد اسید اسکوربیک بودند.

عصاره چای سفید در کلیه روش‌های عصاره‌گیری نسبت بالایی برای مهار رادیکال‌های آزاد در مقایسه با نمونه‌های چای سبز و سیاه نشان داد. درصد جذب رادیکال‌های آزاد نمونه چای سفید در روش عصاره‌گیری آبی- متانولی به ($P<۰/۰۱$) ۷۹/۴۶±۰/۴۵ میلی‌گرم بر میلی لیتر و بعد از آن عصاره آبی چای سبز ($P<۰/۰۱$) ۶۳/۷۷±۰/۶۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و سپس چای سیاه ($P<۰/۰۱$) ۴۷/۰۱±۱/۰۳ میلی‌گرم بر میلی لیتر دارای بالاترین مهار و جذب رادیکال‌های آزاد بودند. نوع و غلظت عصاره‌ها و آنتی اکسیدان سنتزی تاثیر معنی‌داری در سطح ۰/۰۱ بر میزان مهار رادیکال‌های آزاد داشتند. همچنن نتایج حاکی از این بود که قدرت مهار کنندگی عصاره چای سفید در قیاس با عصاره‌های چای سبز افزایش یافته است و در روش آبی- متانولی این امر بسیار قابل مشاهده بود.

در ادامه تحقیقات اثر عصاره هیدرومتانولی چای سفید بر وزن بدن موش و روند رشد تومور در بافت روده بزرگ موش که شامل پارامترهای مختلف از جمله: اندازه تومور و وزن تومور است در سرطان روده بزرگ موش ماده مورد بررسی قرار گرفت و نتایج بدست آمده به شرح ذیل می‌باشد.

- بررسی اثر عصاره هیدرومتانولی چای سفید بر وزن بدن موش‌ها

نتایج با توجه به اینکه وزن موش‌های ماده *BALB/c* که به مدت دو هفته عصاره هیدرومتانولی چای سفید به صورت گاواژ دریافت کردند به طور روزانه ثبت گردید، نمودار ۶ نشان دهنده میانگین ± انحراف معیار از میانگین می‌باشد. با توجه به نتایج جدول ۴ در مقایسه وزن اولیه (شروع مطالعات) و ثانویه (پس از تیمار) نمونه‌ها در مراحل اولیه مطالعه و بعد از مرحله سرطانی شدن روده بزرگ با رده سلولی HCT-116 و تیمار با عصاره چای سفید مشاهده شد که وزن اولیه و وزن ثانویه نمونه‌ها در درون‌های گروه‌های

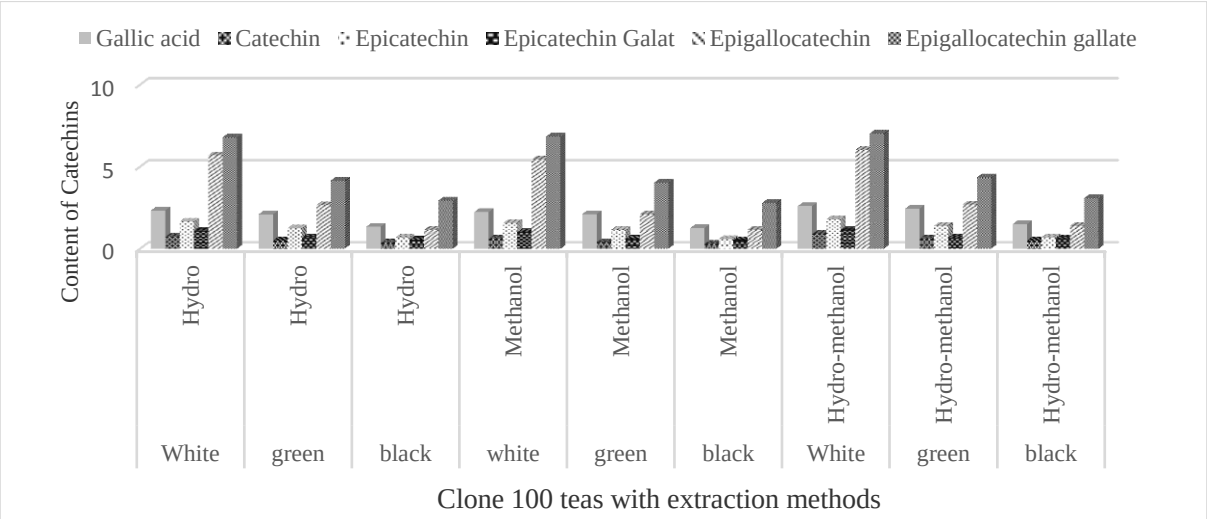


Figure 2- Quantitative content of the main types of tea catechins with Gallic acid in different types of tea

شکل ۲- محتوای کمی انواع اصلی کاتچین چای با اسید گالیک در انواع چای

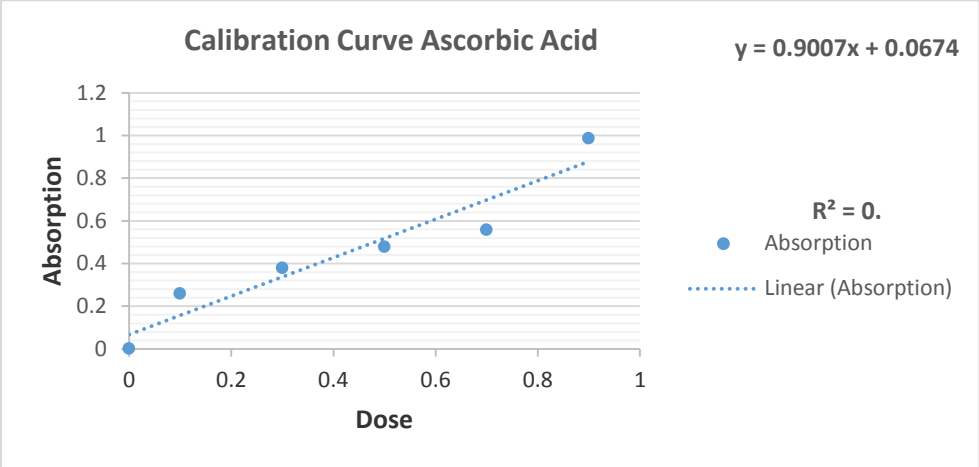


Figure 3- Calibration curve and ascorbic acid line equation to measure free radical adsorption

شکل ۳- منحنی کالیبراسیون و معادله خط اسید اسکوربیک برای اندازه گیری جذب رادیکال آزاد

جدول ۳ - درصد مهار رادیکال‌های آزاد توسط نمونه‌های مختلف کلون چای فنری کلون -۱۰۰ بر حسب میلی‌گرم در میلی لیتر عصاره

Table 3 - Percentage of inhibition and absorption of free radicals by different samples of clone spring tea-clone -100 in mg / ml of extract

Type of tea	Extract method	Percentage of free radical adsorption and inhibition
White	Hydro	69/81±0/52**
green	Hydro	33/54±0/51$^{n.s}$
black	Hydro	21/78±0/48$^{n.s}$
white	Methanol	44/56±0/31*
green	Methanol	23/01±0/17$^{n.s}$
black	Methanol	19/07±0/20$^{n.s}$
White	Hydromethanol	79/46±0/45**
green	Hydromethanol	63/77±0/67**
black	Hydromethanol	47/01±1/03*
Ascorbic Acid	_____	32/06±0/14

The results are expressed in terms of mean standard error for 3 replications at two significant levels (P <0.05 *, P <0.01 ** ns: non-significant).

نتایج بر حسب میانگین خطای استاندارد برای ۳ تکرار در دو سطح معنی‌دار (*P<0.05، ** P <0.01 و ns غیر معنی‌دار) بیان می‌شوند.

سرطانی دریافت کننده با غلظت‌های مختلف عصاره آبی-متانولی چای سفید در سطح ۰/۰۵ تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید، اما بین وزن اولیه و ثانویه نمونه‌ها در درون گروه‌های دریافت کننده عصاره چای سفید تفاوت معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ مشاهده گردید.

نتایج نشان داد بیشترین وزن در نمونه‌های سرطانی دریافت کننده دوز بالای عصاره هیدرومتانولی چای سفید (۱۵۰mg/kg) به میزان ۲۱/۶۵ گرم بر کیلوگرم دیده شد که در سطح (P<۰/۰۵) اختلاف معنی‌داری نسبت به وزن موش در مراحل اولیه مطالعه، نداشته است (نمودار ۵).

- نتایج اندازه (حجم) تومور سرطانی در موش‌ها

اندازگیری اندازه و وزن تومور براساس عکس تومورها در ۳ گروه مختلف شاهد سرطانی، دوز پایین و دوز بالا (شکل ۵) در موش مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج اندازه تومورها نشان داد که نمونه‌های سرطانی دریافت کننده عصاره چای سفید با دوز بالا عصاره چای سفید (۱۵۰mg/kg) از نظر اندازه تومور نسبت به نمونه شاهدسرطانی و دوز پایین عصاره چای سفید (۱۵mg/kg) کاهش معنی‌داری داشته است و بر اساس آزمون توکی تفاوت معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ نشان داده شد. اندازه تومور در نمونه شاهد سرطانی برابر با ۱۱۷/۷ میلی‌متر مکعب، نمونه با مصرف دوز mg/kg ۱۵ به اندازه ۶۸/۸۲ میلی متر مکعب در نمونه با دوز mg/kg ۱۵۰ اندازه تومور ۳۶/۹۸ میلی متر مکعب رسیده است (جدول ۵)

بر اساس نمودار ۶ مشخص شد که بین شاهد سرطانی و دوز پایین اختلاف معنی‌داری در اندازه تومور دیده نشده است اما در دوز بالا اختلاف معنی‌داری قابل مشاهده است.

- نتایج وزن تومور سرطانی در موش‌ها

میزان وزن تومور در نمونه‌های شاهد و دوز پایین عصاره چای سفید (۱۵ mg/kg) تغییر چندانی نداشته است و در سطح ۰/۰۵ اختلاف معنی‌داری مشاهده نشده است. در دوز بالا عصاره چای سفید (۱۵۰mg/kg) نسبت به سایر گروه‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده شد و وزن تومور در نمونه‌های شاهد سرطانی و دوز پایین عصاره به ترتیب به میزان ۰/۱۵ و ۰/۱۰ میلی‌گرم نشان داده شد و در نمونه با دوز بالا عصاره به میزان۰/۰۶ میلی‌گرم بوده است (جدول ۶).

همچنین مشخص شده که بین شاهد و دوز بالای مصرف عصاره اختلاف معنی‌داری مشاهده شده است (نمودار ۷).

جدول ٤- وزن بدن موش ها در مراحل اولیه مطالعه و پس از درمان با عصاره چای سفید

Table 4- Body weight of mice in the early stages of study and after treatment with white tea extract

ANOVA table	SS	df	MS	P value	P value summary
Treatment(between columns)	4/415	2	2/207	P=0/108	ns
Treatment(between rows)	14/08	1	14/08	P=0/018	*
Error	0/538	6	0/269		
Total	0/423	8			

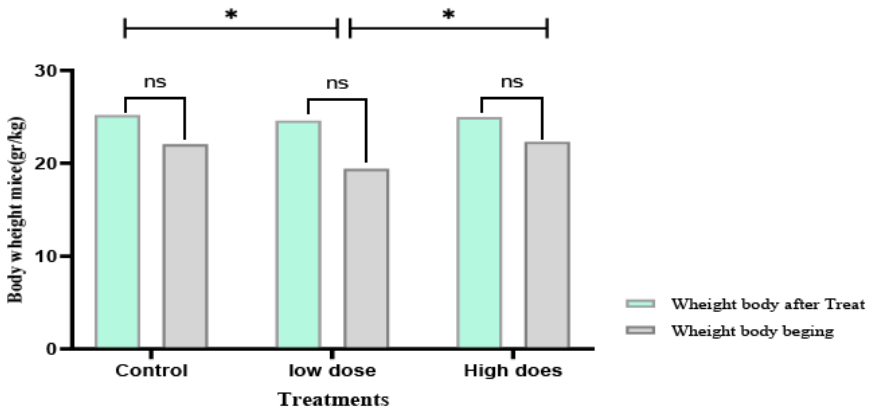
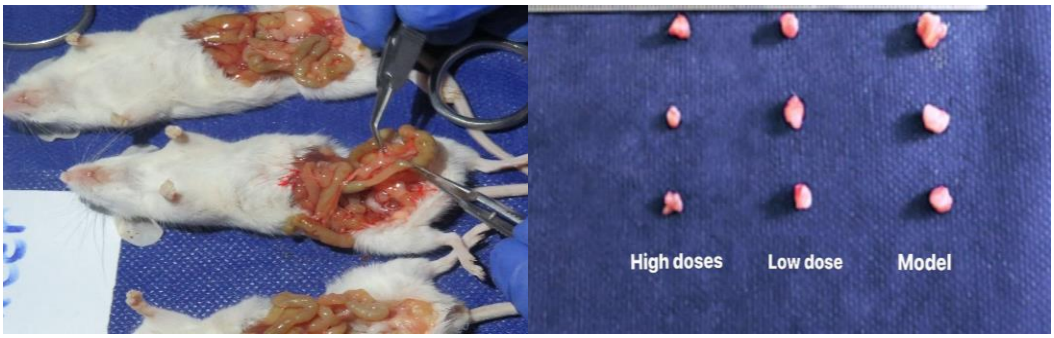


Figure 4- Body weight of Baib/c at beginning and after treatment with white Tea

شکل ٤- وزن بدن موش (Balb/c) قبل و بعد از درمان با عصاره چای سفید



شکل ٤-(الف) جراحی بعد از ایجاد تومور در بافت روده بزرگ موش (ب) اندازه گیری وزن و اندازه تومور

Figure 4-(a) Surgery after injection tumor in the mice colon (b) Measurement of tumor weight and size

جدول ٥ - اندازه(حجم) تومور ها بعد از تزریق عصاره چای سفید در روده بزرگ موش ها

Table 5- Tumors Size (volume) after injection of white tea extract in the colon of mice

ANOVA table	df	MS	P value	P value summary
Treatment (between columns)	2	4956	P=0/0269	*
Error	6	747/3		
Total	8			

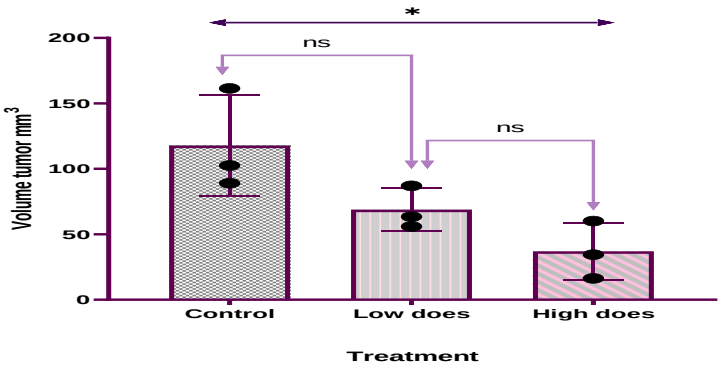


Figure 6- Evaluation of tumor volume in cancer cell after gavage with white tea extract

شکل ٦- حجم تومور در نمونه های سرطانی پس از گاواژ با عصاره چای سفید پس از ١٤ روز

جدول ٦- وزن تومور ها بعد از تزریق عصاره چای سفید در روده بزرگ موش ها

Table 6- tumor weights after injection of white tea extract in the colon of mice

ANOVA table	df	MS	P value	P value summary
Treatment	2	4956	P=0/0399	*
Erorr	6	743/1		
Total	8			

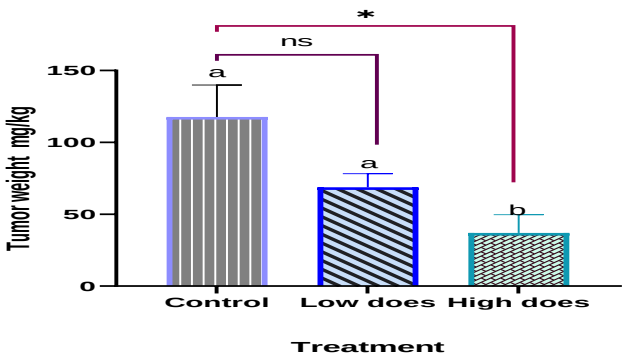


Figure 7-Tumor weight in cancer cells and gavage with tea extract after 14 days

شکل ٧- وزن تومور در نمونه های سرطانی و گاواژ با عصاره چای سفید پس از ١٤ روز

بحث

گیاهان حاوی ترکیبات متعددی هستند که ساختارهای متفاوتی دارند. استخراج این ترکیبات به عوامل متعددی بستگی دارد که مهم‌ترین آن‌ها حلال و روش استخراج میباشند. انتخاب حلال و روش استخراج بستگی به قسمت‌های مختلف یک گیاه و نیز مواد متشکله آن دارد. بسیار مشکل خواهد بود که برای هر دسته از ترکیبات گیاهی حلال مخصوصی انتخاب شود زیرا همراه با این ترکیبات، مواد دیگری نیز وجود دارد که بر روی درجه حلالیت تاثیرگذار می باشند. نتایج حاصل از آزمایشات سنجش و اندازگیری محتوای پلی فنول و سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره های مختلف انواع چای نشان داد که عصاره چای سفید در انواع مختلف عصاره‌گیری از جمله؛ آبی، متانولی و هیدرومتانولی دارای بیشترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی و بالاترین میزان مهار کنندگی رادیکال‌های آزاد می‌باشد و در نتایج مشهود شد که چای سفید با ارزشترین چای در مقایسه با انواع چای سبز و سیاه می‌باشد. پلی فنول‌های چای در عمل پزشکی و تحقیقات علمی به عنوان یک آنتی اکسیدان خوب با اثرات خوب مهار رادیکال های آزاد در پاسخ به استرس اکسیداتیو یافت می شوند. از آنجا که استرس اکسیداتیوی با وقوع و پیشرفت بسیاری از بیماری‌های مزمن در انسان ارتباط نزدیک دارد. پلی فنول های چای برای جلوگیری و درمان بیماری های مختلف ثبت شده است (Wang *et al.*, 2011).

طبق نتایج تحقیقات انجام شده مشاهده گردید که حلال‌ها تاثیر متفاوتی در استخراج مواد فنولی و آنتی‌اکسیدان‌ها دارند که متانول و آب به ترتیب باعث استخراج بیشترین و کمترین میزان ترکیبات فنولی شدند و بهترین حلال برای جداسازی پلی فنول ها و فلاونوئیدهای چای آب و ترکیب آبی–اتانول و آبی– متانول می‌باشد (Katalinic *et al*; 2006; Fazelinasab *et al*., 2019).

فرآیند تخمیر، پارامتر مهم دیگری است که در ذخیره پلی‌فنول‌ها و فلاونوئیدها اثرگذار است، هر چه فرآیند تخمیر کوتاه‌تر و با بازده گرمایی پایین‌تری همراه باشد، محتوای پلی فنولی بیشتری در برگ‌های انواع مختلف چای مشاهده می‌شود (Baruah *et al*. 2003). تجمع محتوای پلی‌فنول کل فلانوئیدی در برگ‌های تازه چای سبز و سیاه در روش‌های مختلف عصاره‌گیری (متانولی– اتانولی و آبی) بیشتر دیده شد (Nihal erol *et al*., 2009). همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی، محتوای کافئین و پلی‌فنول در جوانه‌ها و برگ‌های تازه به ترتیب برگ‌های ۱ و ۲ برای همه انواع گیاهان چای بیشترین میزان را دارا می‌باشد (Yada *et al*., 2020). در یافته‌های Thea و همکاران در سال ۲۰۱۲ مشخص شد که چای سبز دارای غلظت بیشتری از ترکیبات فنلی و عمده فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی نسبت به چای سیاه است. طبق نتایج مطالعات pimpinan و همکاران در سال ۲۰۲۰ برگ‌های چای نیمه بالغ سطح کاتچین و اپی کاتچین بالاتری نسبت به اپی کاتچین گالات، اپی گالات کاتچین گالات و گالات کاتچین دارد. همچنین محققان گزارش نمودند که عصاره های گیاهی حاوی مقادیر بالایی از ترکیبات فنولی وفلانوئیدی از فعالیت آنتی اکسیدانی قوی تری نیز برخوردار بودند و در نتیجه ظرفیت دهندگی الکترون (نیروی احیاء کنندگی) مرتبط با فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیبات زیست فعال است (Sahreen *et al;* 2010). طبق تحقیقات محققین مشخص شد که نوع و غلظت عصاره‌ها و آنتی اکسیدان سنتزی تاثیر معنی‌داری بر میزان مهار رادیکال‌های آزاد داشتند و توانایی عصاره در مهار رادیکال‌های آزاد وابسته به غلظت عصاره بوده است و با افزایش غلظت فعالیت ضد رادیکالی آنها هم افزایش می یابد و در این تحقیق مشخص شد فعالیت مهار کنندگی در عصاره متانولی بالاتر از عصاره اتانولی است (Soleymanian *et al.*, 2013) و نتایج فوق با نتایج sun و همکاران در سال ۲۰۱۱ همسو بوده است که در این تحقیق گزارش نمودند که فعالیت رادیکال‌های آزاد و خواص آنتی اکسیدانی با روش DPPH عصاره گیاهی وابسته به غلظت عصاره است و با افزایش غلظت اثر مهار کنندگی هم شدت می‌یابد. همچنین اگر که در محلول فولین سیوکالچو، کربنات سدیم اضافه شود باعث افزایش سطح شناسایی پلی فنول‌ها می‌شود. در نتایج نشان داده شد که افزودن کربنات سدیم که حلالیت بالای در فولین سیوکالچو دارد باعث جذب بیشتر پلی‌فنول‌ها شده و با معرف فولین سیوکالچو برقراری پیوند بیشتری نشان داده شد، پس از شناسایی محتوا پلی فنولی کل در نمونه‌ها، میزان جذب و مهار رادیکال‌های آزاد نمونه‌های مختلف چای با استفاده از روش DPPH نشان داد که هر چه محتوا

پلی فنولی کل در عصاره‌ها افزایش یابد میزان جذب و مهار رادیکال‌های آزاد هم افزایش می‌یابد. بطوری که چای سفید دارای بالاترین میزان جذب و مهار رادیکال‌های آزاد است (Shaghaghi *et al*., 2008). بنابراین آنتی‌اکسیدان‌ها با ممانعت از تولید رادیکال‌های آزاد یا حذف آن‌ها با استفاده از ترکیباتی با اثر بخشی بیشتر و اثرات جانبی کمتر می‌تواند به عنوان یک روش درمانی مناسب در بیماری‌های مختلف مطرح شود (Duffy *et al*., 2001) .طبق یافته‌های مائو و همکاران در سال ۲۰۱۷ هنگامی که تعادل بین گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و روند آنتی اکسیدانی از بین برود، باعث ایجاد استرس اکسیداتیو، آسیب به سلول‌ها و بافت‌ها و بروز بیماری‌های مختلف می‌شود. بر اساس یافته‌های Fu و همکاران در سال ۲۰۰۸ در مرحله استخراج پلی فنول هر چه میزان شناسایی بیشتر باشد، شناسایی جزئی این ترکیبات در کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا هم بیشتر می‌باشد (Fu *et al*., 2008).

پس از بررسی نتایج محتوای پلی فنولی، درصد جذب و بازدارندگی رادیکال‌های آزاد و شناسایی ترکیبات پلی فنول در هر یک از عصاره‌های انواع چای بصورت مجزا، نتایج نشان داد که چای سفید کلون ۱۰۰ با روش عصاره‌گیری هیدرومتانولی مناسب برای تست درصد مهار بر بازدارندگی رشد سلول‌های سرطانی می‌باشد. بر اساس تجزیه و تحلیل بقای سلولی در روش MTT نتایج تحقیقات بنداریان وهمکاران در سال ۲۰۱۸ نشان دادند که عصاره آبی چای سفید می تواند زنده ماندن سلول‌های HCT-116 را در ۸، ۱۶ و ۲۴ ساعت به طور قابل توجهی کاهش دهد که به روش وابسته به غلظت بستگی دارد، IC50 برای عصاره آبی چای سفید (۰، ۱۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) محاسبه و به سلول‌ها تیمار شد. این محیط در ۸، ۱۶ و ۲۴ ساعت پس از درمان از سلول های سرطانی تک لایه خارج شد و مشخص شد که بهترین دوز مهاری در عصاره چای سفید برای رشد سلولی بازدارنده در ۲۴ ساعت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر با ۰/۲۹ ± ۷۵/۸۷ درصد بود (Bondarian *et al*., 2008) . همچنین نتایج تحقیقات Jiao و همکاران در سال ۲۰۱۸نشان داد که متانول در غلظت های ۱۰۰۰– ۵۰۰ ماکرو لیتردر عصاره های مختلف گیاهان دارویی می‌تواند بر روی رشد سلول‌های سالم نیز اثر بگذارد و سبب مرگ سلولی و از بین رفتن مسیر آپاپتوز شود (Jiao, W *et al;* 2018) وبنا به تحقیقات ذکر شده و در ادامه آزمایشات حاضر از عصاره هیدرومتانولی چای سفید برای بررسی خواص ضد سرطانی استفاده شد و شواهد روشنی وجود دارد که نشان می‌دهد رادیکال‌های آزاد با پیشرفت بیماری‌های نظیر آلزایمر، آترواسکلروز و سرطان همراه هستند (Hayashi and Iguchi, 2010). همچنین در تحقیقاتی که توسط wesam و همکاران در سال ۲۰۱۷ بروی رده سلول‌های سرطانی Hela با استفاده از عصاره گیاهی گون انجام شد مشخص شد که فلانوئیدها در سایر گونه‌های این گیاه می‌تواند سلول‌های کارسینوما را به آپوپتوز منتقل کنند. همچنین در آزمایشاتی دیگر که بر روی عصاره متانولی گیاه بومادران انجام شد مشخص گردید که برگ این گیاه دارای اثرات سیتوتوکسیکی بر روی سلول‌های سرطانی روده (HT-29) است و نتایج نشان داد که عصاره متانولی شامل ترکیبات فنولی بویژه فلانوئیدها می‌باشند که تولید مثل سلول‌های سرطانی را از طریق ایجاد آپوپتوز سرکوب می‌کند (Dokhani *et al*., 2005). نتایج مطالعات بر روی خواص ضد سرطانی گیاه آفسنطین (خارگوش) با رده سلول‌های سرطانی Hela، HT-29 و MCF-7 در موش گزارش شده است که وجود آلفا پینن و بتا پینن و لیمونن موجود در عصاره متانولی این گیاه عامل مهار کننده سلول‌های HT-29 سرطان روده بزرگ شده است (Akrout *et al*., 2011). که در یافته‌های تحقیقاتی که توسط Al-Asady و همکاران در سال ۲۰۱۲ بروی عصاره گیاه *Capparise Spinosa* انجام دادند مشاهده شد اثر عصاره هیدرومتانولی به دلیل ترکیبات فنولی نسبت به عصاره آبی قوی‌تر می‌باشد و با توجه به آزمایشاتی که توسط محققین در سال ۲۰۰۷ انجام شد، متوجه شدند که رشد تومور ارتباط نزدیکی با استرس اکسیداتیوی دارد، لذا ترکیبی که خواص آنتی‌اکسیدانی داشته باشد می تواند یک عامل کارسینوژن باشد و بسیاری از گیاهان دارویی دارای خاصیت فارموکولوژیک و بیوشیمیایی می‌باشند (Yogeshwer *et al*., 2007). در نهایت با توجه به بررسی نتایج عصاره اتانولی زنجبیل بر وزن بدن و رشد تومور در سرطان پستان موش ماده بالب توسط Faraji و همکاران در سال ۲۰۱۴ مشخص شده است که اندازه تومور و وزن تومور در بالاترین دوز های مصرفی عصاره اتانولی این گیاه کاهش معنی‌داری در سطح

۰/۰۵ داشته است. در نتیجه در تحقیقات انجام شده مهمترین حلال جهت استخراج مواد فنولی و بررسی خواص آنتی اکسیدانی، متانول بوده و موثرترین گیاه از لحاظ حضور مواد و خاصیت آنتی اکسیدانی چای سفید کلون ۱۰۰ می‌باشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی و پلی‌فنول‌های گیاه چای سفید و تاثیر آن بروی سرطان روده بزرگ در موش و با توجه به تمامی روش‌های عصاره‌گیری در انواع مختلف عصاره چای (سفید، سیاه و سبز) کلون ۱۰۰ مشخص شد عصاره چای سفید بالاترین کاتچین‌های اختصاصی و معنی داری نسبت به سایر چای‌های مورد آزمون را دارا بود و لذا روش عصاره‌گیری آبی و هیدرومتانولی دارای بالاترین کارایی در جداسازی پلی فنول‌ها در انواع مختلف چای بود. طبق مستندات ذکر شده، مطالعات عصاره چای سفید دارای بالاترین سطح معنی‌داری از لحاظ ترکیبات پلی‌فنولی در ساختار خود بوده است و بعد از آن چای سبز و سیاه در رتبه‌های بعدی قرار دارند. از طرف دیگر حلال استخراج، خود نقش بسزایی در شناسایی این ترکیبات دارد. در نهایت با توجه به بررسی‌های انجام شده نتایج عصاره هیدرومتانولی چای سفید بر وزن بدن و رشد تومور در سرطان روده بزرگ موش مشخص شده است که اندازه تومور و وزن تومور در بالاترین دوزهای مصرفی عصاره هیدورمتانولی این گیاه کاهش معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ داشته است. در نتیجه در تحقیقات انجام شده مهم‌ترین حلال جهت استخراج مواد فنولی و بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی هیدرو متانول بوده و موثرترین گیاه از لحاظ حضور مواد و خاصیت آنتی‌اکسیدانی چای سفید کلون ۱۰۰ می‌باشد.

منابع

Anon. (2015). History of tea import to Iran and basic information about Iranian tea gardens. Tea Research Organization [In Persian].

Anon. (2004). ISO14502-1. Determination of substances characteristic of green and black tea- content of total polyphenols in tea. Part 1. Colorimetric method using Folin-ciocalteu reagent.

Anon. (2007). National Standard Organization of Iran, Green and Black Tea - Measurement of its specific materials. Part II; Determining the total amount of catechins in green tea by high performance chromatography. National Standard of Iran. First Edition, No. 2-8986 [In Persian].

AL-Asady, B. A. A., Khalil, H. K. H. & Barwari, M.S.S. (2012). Cytotoxic and cytogenetics effects of aqueous, methanolic and secondary metabolites extracts of Capparis spinosa on tumor cell lines In vitro. Jordan Journal of Biological Sciences, 5(1), 15-30.

Akrout, A., Gonzalez, L. A. & Hajer, E. l. J. (2011). Antioxidant and antitumor activities of Artemisia campestris and Thymelaea hirsuta from southern Tunisia. Food and Chemical Toxicology, 49(2), 342-347.

Bondarian, F., Ebrahimi, A., Mahjiubi, F., Majidi, E. & Azadi, R. (2018). Evaluation of biochemical constituents and inhibitory effect of tea clone 100 on colorectal cancer cell line HCT-116. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 17 (6), 1033-1041 [In Persian].

Baruah, A.M. & Mahanta, P.K. (2003) Fermentation characteristics of some assamica clones and process optimization of black tea manufacturing. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(22), 6578-6588.

Dokhani, S.H., Cottrell, T., Khajeddin, J. & Mazza, G. (2005). Analysis of aroma and phenolic components of selected Achillea species. Plant Foods for Human Nutrition, 60 (2), 55-62 [In Persian].

Duffy, S.J., Obrien, R.c., New, G., Harper, R.W. & Meredith, I.T. (2001). Effect of anti-oxidant treatment and cholesterol lowering on resting arterial tone, metabolic vasodilation and endothelial function in the human forearm: a randomized placebo-controlled study. Clinical and experimental pharmacology & physiology, 28(5-6), 409-418.

Ebrahimzadeh, M.A., Pourmorad, F. & Hafezi, S. (2008). Antioxidant activities of Iranian corn silk. Turkish Journal Boil, 32, 43-49 [In Persian].

Fu, T., Liang, J., Han, G., Lv, L. & Li, N. (2008). Simultaneous determination of the major active components of tea polyphenols in rat plasma by a simple and specific HPLC assay. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 875(2), 363-367.

Faraji, M. & Heydarieh, N. (2014). Ginger Ethanolic effects on body weight and breast cancer tumor growth in mice, female BALB /C. Journal of Agricultural Research, 27(4), 487-498 [In Persian].

Fazelinasab, B., Moshtaghi, N. & Forouzandeh, M. (2019). Effect of Solvent Extraction on Phenol, Flavonoids and Antioxidant Activity of some Iranian Native Herbs. Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences, 27(3), 14-26 [In Persian].

Hayashi, T. & Iguchi, A. (2010). Possibility of the regression of atherosclerosis through the prevention of endothelial senescence by the

Pandjaitan, N., Howard, L.R., Morelock, T. & Gil, M.I. (2005). Antioxidant capacity and phenolic content of spinach as affected by genetics and maturation, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 18 - 23.

Pimpinan, S., Chalat, S., Pimsiri, T., Chi-Ming, H. & Warangkana, S. (2020). Assessing Polyphenol Components and Antioxidant Activity during Fermented Assam Tea Ball Processing. Sustainability, 12(14), 5853.

Shi, Y., Hua, Y., Chao-Ling, W., Oliver, Y. U., Zheng, Z., Chang, J. J., Jun, S., Ye-Yun, L., Qi Chen, T. X. & Xiao-Chun, W. (2011). Deep sequencing of the Camellia sinensis transcriptome revealed candidate genes for major metabolic pathways of tea specific compounds. BMC Genomics, 12(131)

Soleymanian, Sh., Sadeghi, M., Alami, M. & Ghorbani, M. (2013). Determination of antiradical and antioxidant activities and flavonoid content in hawthorn fruit (Crataegus elbursensis). Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology, 8(1), 177- 185 [In Persian].

Somsong, P., Tiyayon, P. & Srichamnong, W. (2018). Antioxidant of green tea and pickle tea product, miang, from northern Thailand. Acta Horticulturae, 1210, 241–247.

Sun, L., Zhang, J., Lu, X., Zhang, L. & Zhang, Y. (2011). Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (Diospyros kaki L.) leaves. Food and Chemical Toxicology, 49, 2689-2696.6-

Sahreen, S., Rashid Khan, M. & Ali khan, R. (2010). Evaluation of antioxidant activities of various solvent extracts of Carissa opaca fruits. Food Chemistry, 122(4), 1205-1211.

Shaghaghi, M., Manzoori, J.L. & Jouyban, A. (2008). Determination of total phenols in tea infusions, tomato and apple juice by terbium sensitized fluorescence method as an alternative approach to the Folin-Ciocalteu spectrophotometric method. Food Chemistry, 108(2), 695-701 [In Persian].

Thea, A.E., Lloret, M. A., Brumovsky, L. A. & Schmalko, M. E. (2012). Differences in quality parameters between types of commercial tea from Argentina. International Journal of Food Studies, 2, 168-188.

Vignoli, J.A., Bassoli, D.G. & Benassi, M.T. (2011). Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: The influence of processing conditions and raw material. Food Chemistry, 123(4), 863-868.

Wu, C., Xu, H., Hertia, J. & Andlauer, W. (2012). Determination of catechins and flavonol glycosides in Chinese tea varieties. Food Chemistry, 132, 144–149.

Wang, D., Zhong, Y., Luo, X., Wu, S., Xiao, R. & Bao, W. (2011). Puerh black tea supplementation decreases quinocetone-induced ROS generation and

regulation of nitric oxide and free radical scavengers. Geriatrics & Gerontology International, 10, 115-130.

Hazel, L. & Roebuck, K.A. (2001). Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 280,719-741.

Hara, H., Orita, N., Hatano, S., Ichikawa, H., Hara, Y. & Matsumoto, N. (1995). Effect of tea polyphenols on fecal flora metabolic products of pigs. Veterinary Medicine and Science, 57, 45-49.

Hilal, Y. (2017). Morphology, Manufacturing, Types, composition and Medicinal properties of Tea (Camellia sinensis). Journal of Basic and Applied Plant Sciences, 1(2), 1-10.

Jiao, W., Hu, Y., Ge, G., Li, J., Xiao, Y. & Cai, H. (2018). Comparison of the Metabolic Behaviors of Six Systemic Insecticides in a Newly Established Cell Suspension Culture Derived from Tea (Camellia sinensis L.) Leaves. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 66(32), 8593-8601.

Jiang, L., Tang, C., Rao, J., Xue, Q., Wu, H. & Wu, D. (2017). Systematic identification of the druggable interactions between human protein kinases and naturally occurring compounds in endometriosis. Computational Biology and Chemistry, 71, 136-143

Kumar, G. & Xu, B.J. (2017). A critical review on polyphenols and health benefits of black soybeans. Nutrients, 9, E455

Katalinic, V., Milos, M. & Jukic, M. (2006). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. Food Chemistry, 94, 550–557.

Komes, D., Horzic, D., Belscak, A., Kovacevic, K. & Baljak, A. (2009). Determination of caffeine content in tea and mate tea by using different method. Journal Czech of Food Sciences, 27, 235-244.

McDonald, S., Prenzler, P.D., Antolovich, M., Robar ds, K. & Steadman, E.R. (2001) Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. Food Chemistry, 73(1), 73 – 84.

Mao, X., Gu, C., Chen, D., Yu, B. & He, J. (2017). Oxidative stress-induced diseases and tea polyphenols. Oncotarget, 8(46), 81649-81661.

Nihal erol, T., Sari, F., Polat, G. & Sedat velioglu, Y. (2009). Antioxidant and antibacterial activities of various extracts and fractions of fresh tea leaves and green tea. GIDA Journal of Food, 5, 371- 378.

Ozkan, H., Gulluce, M., Adiguzel, A., Ozer, H., Sokmen, M., Sahin, F., Daferera, D. & Polissiou, M. (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from Mentha longifolia L. ssp. Longifolia. Food Chemistry, 103(4), 1449-1456.

oxidative DNA damage in Balb/c mice. Food and Chemical Toxicology, 49(2), 477-484.

Wojdylo, A., Oszmianski, J. & Czemerys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. Food Chemistry, 105(3), 940-949.

Wesam, k., Servatyari, k., Behzadifar, M., Asadi-semami, M., Sadeghi, F., Nouri, B. & Zar Mazouni, H. (2017). Effective Medicinal Plant in Cancer Treatment, Part 2: Review Study. Journal of Evidence-Based, 22(4), 982-995.

Yogeshwer, Sh. & Madhulika, S. (2007). Cancer preventive properties of ginger: a brief review.

Food and Chemical Toxicology, 45, 683- 690.

Yokozawa, T., Nakagawa, T. & Kitani, K. (2002). Antioxidative activity of green tea polyphenol in cholesterol-fed rats. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 3549-3552.

Yadav, K.C., Ashok, P., Bishnu, B. Kh. & Devi, Sh. L. (2020). Phytochemicals and Quality of Green and Black Teas from Different Clones of Tea Plant. Journal of Food Quality, 1-13.

Zhaoming, Y., Yinzhao, Zh,, Yehui, D., Qinghua, Ch. A. & Fengna, L. (2020). Antioxidant mechanism of tea polyphenols and its impact on health benefits. Journal Homepage, (6),115-123.

Zuo, A.R., Dong, H.H., Yu, Y.Y., Shu, Q.L., Zheng, L.X. & Yu, X.Y. (2018). The anti tyrosinase and antioxidant activities of flavonoids dominated by the number and location of phenolic hydroxyl groups. Chinese Medicine, 13-51.

Evaluation of Biochemical Factors and Antioxidants Derived from Clone 100 Iranian Tea and Study on HCT-116 Cell Colon Cancer in *BALB /c* Mice

S. Rahnama[a], A. Ebrahimi[b*], F. Mahjobi[c], M. Khosro Shahli[d], M. Rahaie [e]

[a] Ph.D Student of the Department of Biotechnology and Plant Breeding, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

[b] Assistant Professor of the Department of Biotechnology and Plant Breeding, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

[c] Associate Professor of the Department of Medical Genetics, National Institute of Genetics and Biotechnology; Karaj, Iran.

[d] Associate Professor of the Department of Medical Genetics, National Institute of Genetics and Biotechnology, Karaj, Iran.

[e] Associate Professor of the Department of Life Science Engineering, Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran, Iran.

Received: 28 December 2021 Accepted: 23 February 2022

Abstract

Introduction: Tea is one of the most popular drinks in the world. It contains concentrations of antioxidants and polyphenols that might be of interest to human health. The aim of this study was to investigate the properties of antioxidants and polyphenols and the effectiveness of hydro-methanol extract of WT on the growth of colon cancer tumors in BALB/c.

Materials and Methods: In order to measure the amount of polyphenols and antioxidants in different types of tea, experiments were performed. Extract of different types of tea was obtained by different methods and in order to determine the free radical scavenging capacity separated antioxidants by HPLC, were evaluated by DPPH. The phenolic content of the extract was measured using Folin-siocalto. Then, BALB/c mice with the same initial weight were induced in the colon cancer model using HCT-116 cell line. All groups were treated with two concentrations of the extract. The lowest dose was 15mg/kg and the highest was 150mg/kg. Different traits were evaluated in mice and the data were analyzed by one-way test.

Results: Tea extract by hydro-methanol method was the most effective in terms of antioxidant content and had a significant difference with other methods, white tea extract showed the highest and strongest antioxidant properties and the highest of free radical scavenging. The results of animal studies showed that the difference in secondary weight from the primary in mice receiving the extract with a high dose compared to the mice receiving the low dose increased significantly ($P<0.05$). However, tumor size, area and tumor weight at high dose were significantly reduced as compared to the low dose.

Conclusion: White tea hydro-methanol extraction method has the highest antioxidant activity and the highest specific catechins and according to the results, extract WT can have reducing effects in the process and control of colon cancer in infected mice.

***Keywords*:** *Colorectal Cancer, Chromatography, Catechins, Free Radicals, Tea.*

* Corresponding Author: dr.asaebrahimi@gmail.com