روش استخراج و خالص‌سازی ترکیب ضد آفت ساپونین از بذر چای

فاطمه پارسا[۱*] و سمر رمزی[۲]

۱-گروه فیزیولوژی و فناوری پس از برداشت، پژوهشکده چای، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، لاهیجان، ایران

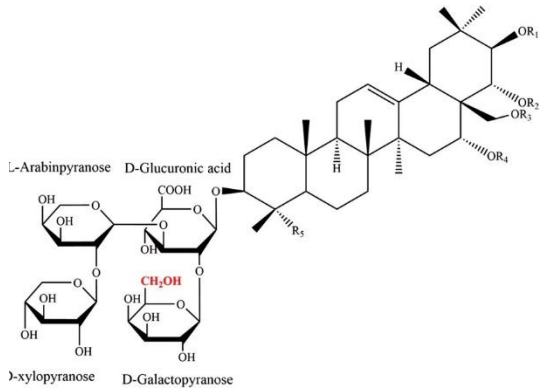
۲- گروه فناوری و مدیریت تولید، پژوهشکده چای، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، لاهیجان، ایران

*fatemehp@ymail.com

بیان مسئله

گیاه چای با نام علمی *Camellia sinensis* بعد از گلدهی، بذرهای درشت و روغنی زیادی تولید می‌کند که مقدار کمی برای پرورش نهال‌های بذری چای استفاده می‌شود و بقیه در باغات چای رها می‌شود. این در حالی است که بذر چای دارای ترکیبات مهمی مانند روغن، پروتئین و ساپونین است که در صنایع مختلف مانند داروسازی، روغن مایع خوراکی و لوازم آرایشی و بهداشتی کاربرد دارد (انجمن بین‌المللی کاملیا، ۲۰۱۰). روغن فراسودمند بذر چای با مقدار زیادی اسیدهای چرب غیراشباع مانند اسید لینولئیک در گروه مهمترین روغن‌های گیاهی قرار دارد (سحری و عمویی، ۲۰۱۳). پروتئین یکی دیگر از ترکیبات مهم بذر چای است که به‌عنوان یک ماده افزودنی فراسودمند به غذای انسان مانند بیسکویت و کلوچه اضافه می‌شود (ویکراماسینگه ۱۹۷۲). ساپونین نیز از ترکیبات زیست‌فعال، فراسودمند و آنتی‌اکسیدان بذر چای است. که در همه قسمت‌های بوته شامل برگ، گل، ساقه، ریشه و بذر وجود دارد، بیشترین مقدار آن در ریشه و بذر چای است (بی نام، ۱۹۹۵). ساپونین در مقیاس تجاری از پوسته و مغز بذرهای روغنی چای استخراج می‌شود. پوسته و مغز به‌ترتیب بین ۵ تا ۸ و ۱۰ تا ۱۵ درصد ساپونین دارند (لی و همکاران، ۲۰۱۲). تاکنون بیشترین مقدار ساپونین از مغز بذر چای حدود ۲۱ درصد به کمک استخراج با حلال آب و فراصوت اندازه‌گیری شد (کی و زانگ، ۲۰۱۴).

ساختار شیمیایی ساپونین چای از یک قسمت کربوهیدراتی به نام قند (گلیکوزیدی) تشکیل شده است که آب‌دوست است و به کمک پیوند اتری یا استری به یک قسمت غیر قندی چربی‌دوست اتصال دارد که یک تری‌ترپنوئید است (شکل ۱). این دوگانگی آب‌دوستی و چربی‌دوستی در ساختار شیمیایی باعث می‌شود ساپونین مانند صابون دارای خصوصیت بیوسورفکتانت (واکنشگر فعال سطح) شود با این تفاوت که هر دو قسمت قندی و غیرقندی در ساختار ساپونین مولکول‌های آلی ولی در صابون یک قسمت غیرقندی و قسمت دیگر نمک است. بیشتر فعالیت‌های زیستی خوب و موثر ساپونین مانند فعالیت‌های ضدمیکروبی، ضددیابتی، داروهای کمکی، ضدسرطانی به این خصوصیت نسبت داده می‌شود (رای و همکاران، ۲۰۲۱) و مانند سایر بیوسورفکتانت‌ها به‌عنوان امولیسیفایر (ایجاد کننده مواد ریز پایدار)، پخش‌کننده، مرطوب‌کننده، پاک‌کننده، شکل‌دهنده، شوینده و کف‌کننده پایدار عمل می‌کند (لی و همکاران، ۲۰۱۲). در گذشته از ساپونین فقط در فرمولاسیون مواد شوینده یا در ساخت عکس‌های فتوگرافیک استفاده می‌شد. بعد از مدتی که اثر زیستی آفت‌کشی ساپونین کشف شد از ساپونین بذر چای بیشتر به‌عنوان آفت‌کش در مقیاس تجاری استفاده می‌شد. به‌عنوان مثال استخراج ساپونین از کیک بذر چای در کشورهایی مانند چین، هند و سیلان به صورت صنعتی انجام می‌شود و کاربرد اصلی آن مبارزه با آفات و بیماری‌های گیاهی است.



شکل ۱. ساختار شیمیایی تری‌ترپنوئیدی ساپونین بذر چای

امروزه به‌دلیل اثرات زیستی و دارویی موثر در پیش‌گیری و درمان بیمارهای انسان، دام، طیور، آبزیان و گیاهان، اصلاح خاک و آب، حفظ و نگهداری مواد غذایی و بهبود فرمولاسیون‌های مواد آرایشی و بهداشتی کاربردهای زیادی در صنایع مختلف دارد (گو و همکاران، ۲۰۱۸). مهمترین اثر زیستی ساپونین فعالیت ضد سرطانی آن است (من و همکاران، ۲۰۱۰) که به‌عنوان داروی کمکی در درمان بیماری‌های صعب‌العلاج مانند سرطان و بیماری‌های ناشی از استرس اکسایشی مانند بیماری‌های قلبی عروقی کاربرد دارد (الکوفینیتی و همکاران، ۲۰۲۱ ;کااو و همکاران، ۲۰۲۲). ساپونین‌ها علاوه‌بر بیوسورفکتانت به دلیل داشتن خصوصیت ضدحریق در فرمولاسیون مواد ضد حریق به کار می‌روند (گو و همکاران، ۲۰۱۸). روش‌های مختلفی برای استخراج و خالص‌سازی پودر ساپونین از بذر چای وجود دارد، به‌عنوان مثال استخراج ساپونین از بذر چای می‌تواند با حلال آبی یا حلال‌های آلی مانند متانل، دی‌اتیل‌اتر، اتانل، دی‌اکسیدکربن فوق بحرانی و در کنار دستگاه‌های فراصوت و مایکروویو جهت افزایش راندمان انجام شود (لانگ و تانگ، ۲۰۱۲)، همچنین در یک روش جدید که ساپونین از بذر چای به کمک محلول‌های بازی و اسیدی استخراج شده است (لیو و همکاران، ۲۰۱۶). در این مقاله روش استخراج ساپونین به کمک آب به دلیل راندمان بالا، بی‌خطربودن و هزینه کم انتخاب شد. با توجه به کاربردهای زیاد ساپونین چای که به برخی از آن‌ها اشاره شد، آشنایی با استخراج، تعیین مقادیر خام، خالص و درصد خلوص آن‌ها و کاربرد آن علیه کنه قرمز پا کوتاه می‌تواند باعث ایجاد ارزش افزوده برای باغداران و کمک به توسعه و نوآوری در صنایع و محصولات تبدیلی چای شود.

مراحل اجرا

این مطالعه در فصل پاییز سال ۱۳۹۷ با استخراج و خالص سازی ساپونین به‌عنوان آفت‌کش از بذر بوته‌های چای هیبرید چینی واقع در ایستگاه تحقیقاتی شهید افتخاری فومن علیه کنه قرمز پا کوتاه در شرایط آزمایشگاه و باغ چای انجام گرفت. کلیه آزمایشات در آزمایشگاه شیمی و گیاهپزشکی پژوهشکده چای به اجرا در آمد.

مواد شیمیایی مورد نیاز برای استخراج و جداسازی ساپونین شامل اسید سولفوریک ۷۷ درصد، وانیلین ۸ درصد، پلی‌آلومینیوم کلراید ۳۰ درصد، آمونیوم بی‌کربنات، اکسید کلسیم، الکل اتیلیک، هیدروکسید سدیم و ساپونین استاندارد از شرکت‌های معتبر خریداری شد. برای انجام آزمایشات از دستگاه‌های آون الکتریکی، سانتریفیوژ، آسیاب برقی، بن‌ماری یا حمام آب الکتریکی، همزن برقی، صافی‌خلاء و اسپکتروفتومتر استفاده گردید.

بذرهای چای در آون در دمای ۱۰۵ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت خشک شدند. مقدار رطوبت ۱۹/۷۸ درصد محاسبه شد (موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، ۱۳۸۴). از این مقدار بذر چای، مقدار مغز ۵۵/۲۹ درصد، پوسته ۳۵/۳۷ درصد، بذرهای پوسیده، شکسته و کپک زده ۸/۷ درصد و ضایعات خارجی ۰/۶۴ درصد بود (شکل ۲).

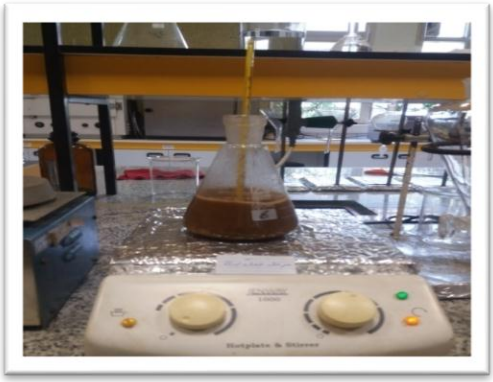
مغزهای بذر از پوسته جدا و به وسیله آسیاب با دور تند کاملاً پودر شدند. پودر آسیاب شده از الک با مش ۲۰ عبور داده شد (شکل ۳).

شکل ۲. بذر چای رقم هیبرید چینی

شکل ۳ – الک کردن پودر بذر چای رقم هیبرید چینی

عصاره بذر چای

۵۰ گرم پودر آسیاب شده و الک شده بذر چای به کمک آب شهر به مقدار ۳۰۰ میلی لیتر (به نسبت ۶ به ۱) در pH=۹ در دمای ۸۰ درجه سلسیوس به مدت ۶ ساعت با هم‌زن حرارت داده شد (شکل ۴). سپس عصاره از تفاله بذر به کمک سانتریفیوژ جداسازی گردید (لی و همکاران، ۲۰۱۲).



شکل٤- استخراج عصاره از بذر چای

ساپونین خام

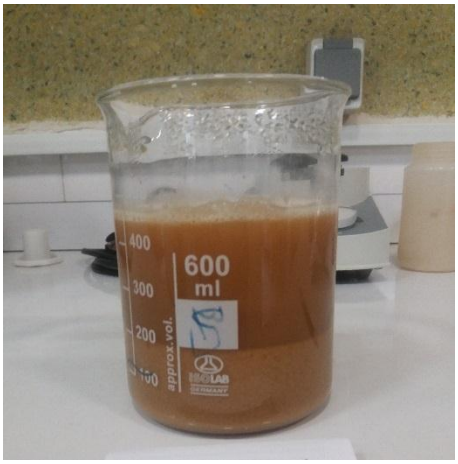
در صورتی‌که عصاره بذر چای بدون خالص‌سازی، تغلیظ و خشک شود می‌تواند به‌عنوان ساپونین خام استفاده شود که کاربردهای زیادی در صنعت به‌عنوان آفت‌کش گیاهی دارد. در این آزمایش مقدار میانگین پودر ساپونین خام هسته بذر چای ٪ ۱۵ براساس ماده خشک محاسبه شد (شکل ۵).

شکل ۵- ساپونین خام

ساپونین خالص

برای تهیه ساپونین خالص باید مراحل خالص‌سازی روی عصاره بذر چای (روش تهیه آن در بالا توضیح داده شد) انجام شود (لی و همکاران، ۲۰۱۲).

۱-عصاره بذر چای توزین شد. پلی‌آلومینیوم کلراید به مقدار یک درصد وزنی عصاره بذر چای در آب حل و ۳۰ میلی‌لیتر از این محلول به عصاره بذر چای اضافه گردید. عصاره به‌مدت ۲ ساعت در دمای اتاق باقی‌ماند تا ناخالصی‌های آن رسوب کرد (شکل ۶).

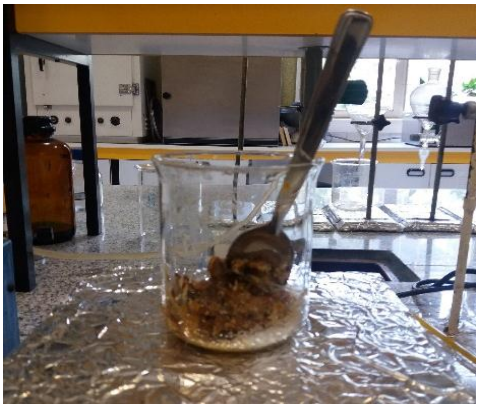


شکل٦- رسوب ناخالصی‌ها

۲- عامل رسوب‌کننده اکسیدکلسیم به مقدار ۱۰ درصد وزن بذر الک شده به این عصاره خالص اضافه و در دمای اتاق به‌مدت چهار ساعت هم زده شد. محلول سانتریفیوژ شد و کیک ساپونین و کلسیم به‌دست آمد (شکل ۷).

شکل ۷ – رسوب ساپونین و کلسیم

۳- در مرحله بعد با اضافه‌کردن بی‌کربنات‌آمونیوم، به مقدار ۳۰ درصد وزنی رسوب کلسیم به‌کمک هم‌زن در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت محلول ساپونین از رسوب کلسیم آزاد گردید (شکل ۸).



شکل ۸. اضافه کردن بی کربنات آمونیوم

۴- جداسازی عصاره ساپونین از رسوب کلسیم به کمک صافی خلاء انجام گرفت. رسوب بعد از شستشو با آب گرم دوباره صاف شد. دو محلول عصاره در یک ظرف ریخته شد. خاصیت صابونی شدن و کف کنندگی در شکل ۹ نشان داده شده است.

شکل ۹. محلول ساپونین خالص

۵- فرایند غلیظ‌سازی در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به کمک بن‌ماری انجام شد. عصاره ساپونین تغلیظ شده در آون در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد. در این آزمایش پس از انجام مراحل خالص‌سازی مقدار میانگین پودر ساپونین ۹/۶ درصد براساس ماده خشک و به رنگ زرد روشن بود (شکل ۱۰).

تعیین درصد خلوص ساپونین خام و خالص

درصد خلوص ساپونین خام و خالص طبق مراحل زیر شامل تهیه محلول استاندارد، روش اندازه‌گیری و رسم منحنی استاندارد تعیین شد (لی و همکاران، ۲۰۱۲).

شکل ۱۰. پودر ساپونین با ۸۰ درصد خلوص

تهیه محلول استاندارد

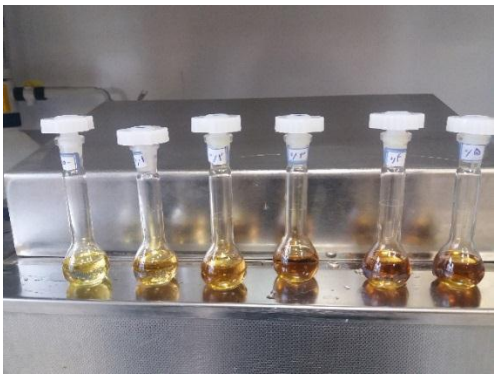
برای تهیه محلول ساپونین چای، ۰/۱ گرم از استاندارد ساپونین به دقت در یک بالون ۱۰۰ میلی لیتر ریخته شد. سپس اتانل ۸۰ درصد به مقداری که ساپونین در آن حل شود، اضافه شد. محلول با اتانل بیشتر خوب تکان داده شد و به حجم ۱۰۰سی سی رسانده شد و به این ترتیب محلول ۰/۱ گرم بر ۱۰۰ میلی لیتر ساپونین در اتانل تهیه شد.

روش اندازه‌گیری

۰/۵ میلی‌لیتر از محلول استاندارد بالا، به دقت به لوله آزمایش۱۰ میلی‌لیتر با قطره چکان ریخته و دریک حمام آب یخ گذاشته شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر محلول وانیلین ۸ درصد و ۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۷۷ درصد به آن اضافه شد. بعد از خوب هم زدن، لوله آزمایش داخل حمام بخار آب در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه برای پس دادن رنگ گذاشته و سپس در حمام آب و یخ به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت و جذب محلول پس از رسیدن به دمای محیط در کووت یک سانتی‌متری با جذب ماکزیمم ۵۴۵ نانومتر با دستگاه طیف‌سنج نوری یا اسپکتروفتومتر خوانده شد. جذب شاهد هم مثل نمونه، بعد از قرار گرفتن در حمام آب و یخ و رسیدن به دمای محیط، صفر گردید.

رسم منحنی استاندارد

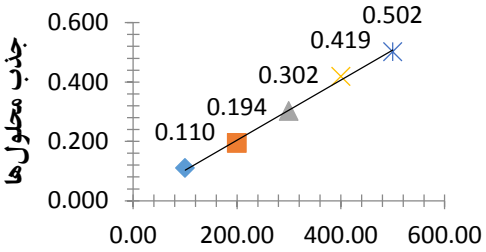
یک سری محلول استاندارد صفر میلی‌لیتر، ۰/۱ میلی‌لیتر، ۰/۲ میلی‌لیتر، ۰/۳ میلی‌لیتر، ۰/۴ میلی‌لیتر و ۰/۵میلی‌لیتر از نمونه استاندارد برداشته و سپس به روش بالا به صورت مخلوط تهیه شد (شکل ۱۱). بعد از خواندن جذب محلول‌ها، منحنی استاندارد به کمک نرم افزار اکسل به دست آمد (شکل۱۲).



شکل ۱۱. محلول‌های استاندارد

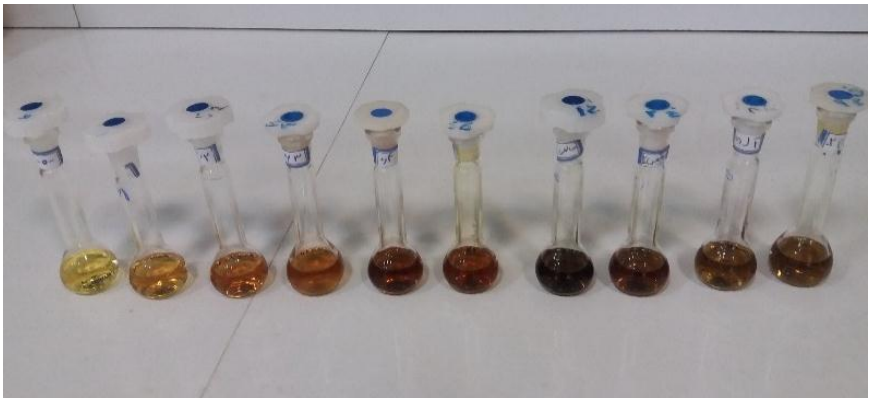
اندازه‌گیری درصد خلوص ساپونین خام و خالص

۰/۵ سی سی از محلول ۰/۱ گرم از عصاره‌های خام و خالص در ۱۰۰ سی سی الکل اتانل حل شد و سپس به روش بالا به صورت مخلوط تهیه و توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری و غلظت‌های مربوطه توسط دستگاه خوانده شد (شکل ۱۳).



شکل ۱۲. منحنی استاندارد ساپونین

.



شکل **۱۳**- **محلول‌های خام و خالص ساپونین**

تجزیه و تحلیل داده‌ها

قبل از انجام آزمایشات عوامل تاثیرگذار روی راندمان استخراج و خالص‌سازی بهینه شدند. بهترین شرایط استخراج برای نسبت نمونه بذر به آب ۶ به ۱، مقدار اسیدیته ۹، دما ۸۰ درجه سانتی‌گراد و بهترین زمان ۶ ساعت بود و بهترین شرایط خالص‌سازی در مرحله اول شامل رسوب ناخالصی‌ها به کمک پلی‌آلومینیم کلراید به مقدار یک درصد وزنی عصاره خام، در مرحله دوم تشکیل کیک ساپونین و کلسیم به کمک اکسید کلسیم به مقدار ۱۰ درصد وزنی اولیه بذر چای و در مرحله سوم آزادسازی ساپونین از رسوب ساپونین و کلسیم به کمک آمونیوم بی‌کربنات به مقدار ۳۰ درصد رسوب ساپونین و کلسیم بود.

نتایج آزمایشات نشان داد که مقدار میانگین پودر ساپونین خام و خالص به‌ترتیب ٪ ۱۵ و ٪ ۹/۶ براساس ماده خشک از مغز بذر چای بود. اندازه‌گیری درصد خلوص ساپونین از دو تیمار پودر عصاره خام و پودر ساپونین خالص مغز بذر چای به کمک اسپکتروفتومتر و استاندارد ساپونین نشان داد که درصد خلوص ساپونین پودر عصاره خام ٪ ۵۰ و ساپونین پودر خالص‌سازی شده ٪ ۸۰ بود. در سایر تحقیقات، خواص فیزیکوشیمیایی ساپونین خالص بذر چای به رنگ زرد کم رنگ با نقطه ذوب ۲۲۳ تا ۲۲۴ درجه سانتی‌گراد و فرمول ملکولی $C_{57}H_{90}O_{26}$ و جرم ملکولی نسبی ۱۲۰۳ گزارش شده است (شاینگ، ۱۹۹۸; لو و زای اوپینگ، ۱۹۹۰).

در این تحقیق همچنین تاثیر ساپونین خام و خالص به‌عنوان آفت‌کش طبیعی علیه کنه قرمز پا کوتاه در شرایط آزمایشگاه بررسی شد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تاثیر کشندگی تیمار ساپونین خام ۳/۲۸ برابر تیمار ساپونین خالص است. در سایر تحقیقات نیز این موضوع ثابت شده است. به عنوان مثال نتایج فعالیت کشندگی در اصطلاح LC_{50} عصاره الکلی برگ گیاه دودونا ویسکوزا و ساپونین استخراج شده و خالص‌سازی شده از آن روی کنه تارتن بالغ ماده نشان داد که کشندگی عصاره گیاهی ۳/۹۱ برابر بیشتر از ساپونین خالص‌سازی شده است و همه ترکیبات قطبی موجود در عصاره مانند ساپونین‌ها، فلاوون‌ها و تانن‌ها در کنار هم باعث یک اثر هم‌افزایی کشندگی علیه کنه‌ها می‌شوند که هر کدام از آن‌ها به تنهایی این اثر را ندارند. این نتیجه در مورد دو گیاه دیگر به نام‌های نیکاندرا فیزالوئید و ابروس پریکاتوریوس نیز به اثبات رسیده است (ال –گنگایهی و همکاران، ۲۰۱۱). همچنین در تحقیق حاضر ساپونین طول دوره زیستی کنه قرمز را ۶ روز افزایش داد. ساپونین بذر چای به دلیل خواص سمی سبب کاهش مقدار درشت مولکول‌های ذخیره‌ای گلیکوژن و پروتئین کنه قرمز چای شد. آنزیم استراز در سم‌زدایی کنه‌های تغذیه شده با ساپونین نسبت به شاهد فعالیت معنی‌داری را نشان داد.

نتایج مقایسه فعالیت کنه‌کشی ساپونین خام و خالص بذر چای در شرایط آزمایشگاه نشان داد که ساپونین خام فعالیت کشندگی بیشتری دارد. در نتیجه ادامه پژوهش با محلول‌پاشی ساپونین خام در شرایط باغ با آلودگی شدید به کنه انجام شد. نتایج نشان داد که ساپونین خام می‌تواند با مرگ و میر مستقیم و اثرات زیرکشنده روی مراحل زیستی آن سبب کاهش تراکم جمعیتی و خسارت این آفت در باغ چای شود. جدا از ارزیابی کشندگی، ساپونین به دلیل ماهیت طبیعی داشتن، باقیمانده سمی روی برگ چای باقی نگذاشت و متفاوت از ترکیبات شیمیایی، سبب تولید محصولی سالم شد (پارسا و همکاران، ۱۳۹۹).

نتیجه‌گیری

نتایج کلی این تحقیق نشان داد که روش استخراج ساپونین به کمک آب نسبت به روش‌های دیگر، دارای راندمان بالا، بی‌خطر و کم‌هزینه است. همچنین از عصاره بذر چای می‌توان به‌عنوان یک آفت‌کش طبیعی موثر و با هزینه کم به جای آفت‌کش‌های مصنوعی، مخرب و سرطان‌زا علیه کنه قرمز پا کوتاه استفاده کرد.

استفاده از ساپونین خام به دلیل فعالیت کشندگی بیشتر علیه کنه قرمز پاکوتاه در مقایسه با ساپونین خالص دارای ارجحیت است. هرچند در برخی صنایع خلوص بالای ساپونین از اهمیت خاصی برخوردار است. لذا برای دستیابی به خلوص بالا با هزینه کم انجام تحقیقات روی تکنولوژی استخراج و مراحل خالص‌سازی مورد نیاز است.

در مورد تاثیر استخراج ساپونین بذر چای بر اقتصاد چایکاران باید گفت، با توجه به کاربرد آن به‌عنوان آفت‌کش در این تحقیق و سایر کاربردها در صنایع مختلف، استخراج آن با ایجاد ارزش افزوده باعث رونق اقتصادی چایکاران خواهد شد، همچنین به توسعه و نوآوری در صنایع و محصولات تبدیلی چای کمک می‌کند.

پیام ترویجی

ساپونین خام و خالص استخراج شده از بذر چای، در تهیه آفت‌کش طبیعی علیه آفات کاربرد دارد.

منابع منتخب

۱. پارسا، ف.، رمزی، س.، آزادی، ر.، سراجی، ع. محبیان، ص.، حسینی، م.، میر قاسمی، ت.، فرخی، م. ۱۳۹۹. تاثیر ساپونین بذر چای بر خصوصیات زیستی و مرگ و میر کنه قرمز پا کوتاه چای، لاهیجان: پژوهشکده چای، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ۵۷۸۸۲.

۲. –عطایی، د.، سحری، م. ع. و م. حامدی. ۱۳۸۲. بررسی برخی خواص فیزیکی و شیمیایی روغن بذر چای، مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، (۳) ۷، ص۱۷۳–۱۸۲.

۳. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. ۱۳۸۴. بذر چای – ویژگی‌ها و روش‌های آزمون، شماره ۸۲۴۷.

4. Cao, W., K. Wang, Ch. Liang, Y. Su, Sh. Liu, J. Li, H. Qing, Zh. Zeng, L. Dai and J.L. Song. (2022). Dietary tea seed saponin combined with aerobic exercise attenuated lipid metabolism and oxidative stress in mice fed a high-fat diet (HFD). *J Food Biochem.,* 46, 14461.
5. Guo, N., Tong, T., Ren, N., Tu, Y., and B. Li. (2018). Saponins from seeds of Genus Camellia: Phytochemistry and bioactivity Phytochemistry. *Phytochemistry,* 149, 42-55.
6. Elekofehinti, O.O., O. Iwaloye, F. Olawale and E.O. Ariyo. (2021). Saponins in Cancer Treatment: Current progress and Future Prospects. *Pathophysiology,* 28, 250–272.
7. Li, M., Zhong, H. and Y. Chen. (2012). *Study on Tea Saponin Extraction from Shell of Oil -tea Camellia Seeds.* International Conference on Mechanical Engineering and Material Science, China: Hunan.
8. Liu, Y., Li, Z., Xu, H., and Y. Han. (2016). Extraction of Saponin from amellia oleifera Abel Cake bya Combination Method of Alkali Solution and Acid Isolation. *Journal of Chemistry*. Article ID 6903524, 8 pages.
9. Qi, X. And S. Zhang. (2014). *J. Food Sci. Technol.*, 32, 59–64.
10. Man, Sh., Gao, W., Zhang, Y., Huang, L., and Ch. Liu. (2010). Chemical study and medical application of saponins as anti-cancer agents. *Fitoterapia*, 81 (2010) 703–714.
11. Rai, S., Acharya-Siwakoti, E., Kafle, A., Devkota, H.P., and A. Bhattarai. (2021). Plant-Derived Saponins: A Review of Their Surfactant Properties and Applications. *Sci.*, 3, 44. https://doi.org/10.3390/sci3040044