

Metody oznaczania polifenoli (katechin oraz teaflawin) występujących w herbatach



dr n. farm. **WOJCIECH ŁUCZAJ**
Akademia Medyczna w Białymstoku
Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej

Streszczenie:

W artykule zamieszczono informacje dotyczące struktury polifenoli oraz metod ich analizy w ekstraktach herbat oraz materiale biologicznym, ze zwróceniem szczególnej uwagi na technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z różnymi typami detekcji, jako najlepszej metody ilościowego oznaczania tych związków.

Słowa kluczowe:

herbata, katechiny, teaflawiny, HPLC

Summary:

This paper contains information about structure of polyphenols, and methods of their determination in teas and biological matrices with special attention to high performance liquid chromatography (HPLC) with different types of detection as the best method for analysis of these compounds.

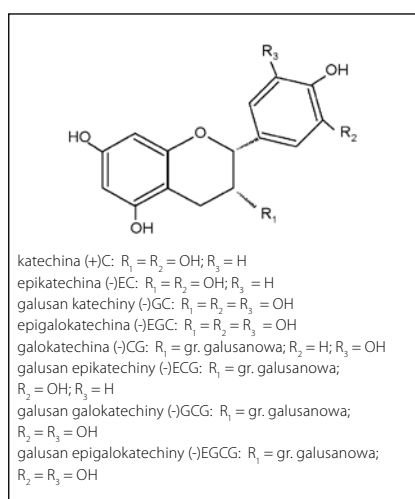
Key words:

Key words: tea, catechins, theaflavins, HPLC

Polifenole, w tym katechiny i teaflawiny, występują w dużych ilościach w jadalnych produktach roślinnych oraz roślinach leczniczych. Katechiny są obecne m.in. w winogronach, owocach cytrusowych, ziarnach kawy oraz liściach herbaty. Ich zawartość w świeżym liściu herbaty wynosi 20-30 proc. i podobna jest do zawartości w roztworze zielonej herbaty otrzymywanej w wyniku suszenia świeżych liści lub działania na nie pary wodnej w podwyższonej temperaturze [1]. Na ryc. 1 została przedstawiona struktura podstawowych katechin występujących w liściach herbaty.

W czasie technologicznego procesu otrzymywania czarnej herbaty około 75 proc. katechin zawartych w liściach herbaty ulega enzymatycznej przemianie, polegającej na ich utlenianiu oraz częściowej polimeryzacji [2,3]. W wyniku tych przemian powstają dimery ka-

techin, zwane teaflawinami, posiadające charakterystyczny siedmioczłonowy pierścień benzotropolonowy [4]. Znane są cztery teaflawiny: teaflawina (TF1), 3-galusan teaflawiny (TF2A), 3'-galusan teaflawiny (TF2B) i 3,3'-digalusan teaflawiny (TF3), a ich ogólną strukturę przedstawiono na ryc. 2.



Ryc. 1. Struktura ośmiu podstawowych katechin zielonej herbaty.

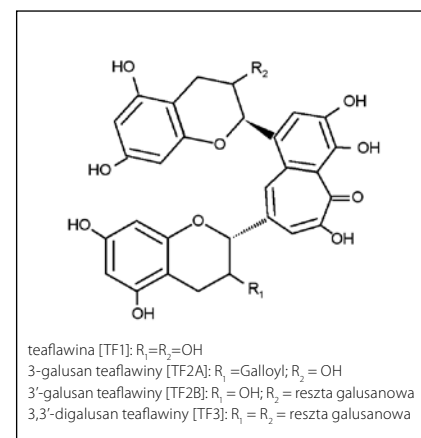
techin, zwane teaflawinami, posiadające charakterystyczny siedmioczłonowy pierścień benzotropolonowy [4]. Znane są cztery teaflawiny: teaflawina (TF1), 3-galusan teaflawiny (TF2A), 3'-galusan teaflawiny (TF2B) i 3,3'-digalusan teaflawiny (TF3), a ich ogólną strukturę przedstawiono na ryc. 2.

W literaturze opisano wiele metod oznaczania katechin oraz pojedyncze metody służące do oznaczania teaflawin [7,8]. Metody te wykorzystują takie techniki jak wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC), chromatografia gazowa (GC), chromatografia cienkowarstwowa (TLC), chromatografia bibułowa, czy też elektroforeza kapilarna [9,10,11,12].

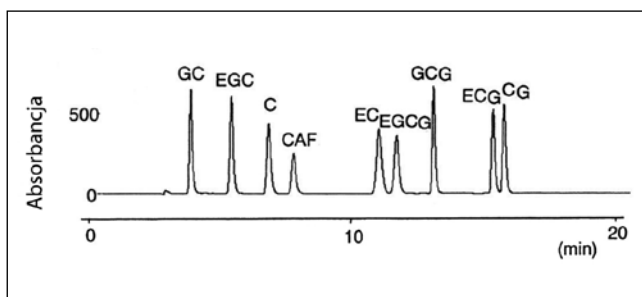
Niestety, niektóre z tych metod pozwalają oznaczyć jedynie pojedyncze polifenole herbat, podczas gdy inne umożliwiają pomiar zawartości wszystkich polifenoli. W niniejszym artykule zostały opisane metody zapewniające efektywny rozdział, identyfikację, jak również ilościowe oznaczanie tych związków w roztworach wodnych, a także w tkankach zwierząt i człowieka.

Metody oznaczania katechin i teaflawin w roztworach wodnych

Metodą z wyboru do oznaczania katechin w roztworze herbaty jest wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) w układzie odwróconych faz z detekcją spektrofotometryczną. Za-



Ryc. 2. Struktura teaflawin.



Ryc. 3. Chromatogram ośmiu katechin zawartych w roztworze zielonej herbaty otrzymany metodą HPLC z wykorzystaniem detektora UV i układu: woda-acetonitryl kwas fosforowy jako fazy ruchomej po uprzednim rozdzielaniu w odwróconym układzie faz na kolumnie z wypełnieniem C_{18} [15].

stosowanie detektora spektrofotometrycznego jest możliwe dzięki zdolności oznaczanego związku do absorpcji promieniowania w zakresie nadfioletu lub światła widzialnego (UV-VIS). Wynika to z obecności w obrębie struktury katechin pierścieni aromatycznych, stanowiących grupy chromoforowe posiadające zdolność pochłaniania promieniowania elektromagnetycznego z zakresu nadfioletu.

Ponieważ polifenole w roztworze herbaty występują w postaci połączeń glikozydowych przygotowywanie materiału do analizy wymaga hydrolizy glikozydów do aglikonów za pomocą kwasu solnego. Uwolnione polifenole są następnie rozdzielane techniką HPLC w układzie odwróconych faz przy użyciu kolumny z wypełnieniem C_{18} . Rozdziału dokonuje się stosując elucję izokratyczną mieszaniną acetonitryl-bufor fosforanowy lub elucję gradientową w układzie faz metanol-woda o pH 2,8. Identyfikację przeprowadza się wykorzystując najczęściej detektor UV lub detektor z matrycą diodową (ang. *diode array detector* – DAD) umożliwiającą zarejestrowanie całego widma absorpcji analizowanego związku i ustalenie długości fali, przy której występuje maksimum absorpcji. Wykorzystanie tej techniki umożliwia rozdział i ilościowe oznaczenie ośmiu katechin występujących w liściach i roztworze herbaty ryc. 3 [14-16], jak również pojawiających się w ludzkiej ślinie po spożyciu herbaty [34]. Limit oznaczalności (najmniejsza ilość substancji jaką można oznaczyć ilościowo daną metodą) przy zastosowaniu metod wykorzystujących technikę HPLC z detekcją spektrofotometryczną wynosi 0,2 ng/ml.

W przypadku stosowania HPLC z detekcją UV do ilościowego oznaczania katechin istotną rolę odgrywa rodzaj wypełnienia (fazy stacjonarnej) kolum-

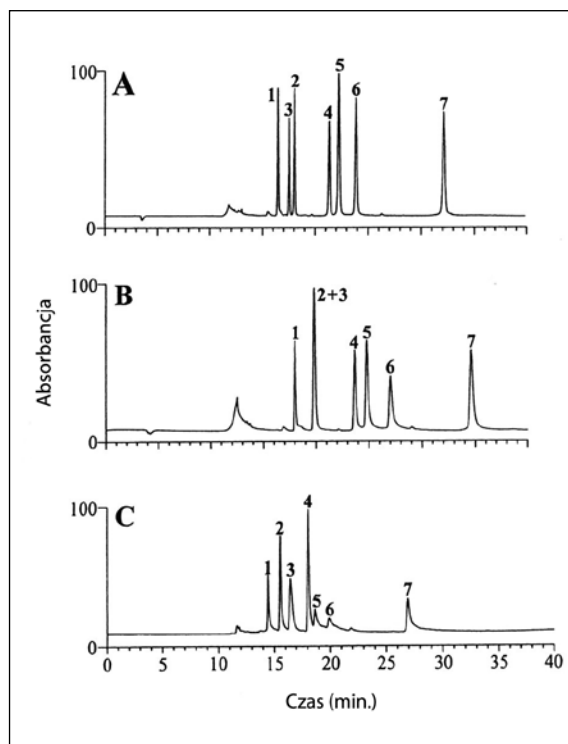
ny chromatograficznej, natomiast jakość uzyskiwanych chromatogramów zależy od obecności kwasu w fazie ruchomej. Efekt tych czynników dla mieszaniny sześciu katechin został przedstawiony na ryc. 4 [23].

Do oznaczania katechin w roztworze herbat, oprócz metod wykorzystujących HPLC można stosować także metody oparte o technikę chromatografii gazowej (GC) połączonej z różnego typu detektorami. Do oznaczania katechin techniką chromatografii gazowej niezbędne jest jednak wstępne przygotowanie próbki, polegające na derywatywacji katechin, które jako związki polarne nie są wystarczająco lotne, aby wprowadzić je bezpośrednio na kolumnę chromatograficzną. Do oznaczeń wykorzystuje się zarówno kolumny szklane jak też krzemionkowe kolumny kapilarne. Przy wykorzystaniu kolumny szklanej wypełnionej fazą stacjonarną 3 proc. OV-1 oraz detektora płomieniowo-jonizacyjnego (FID) można rozdzielić mieszaninę pięciu trimetylosililowych (TMS) pochodnych katechin: C, EC, EGC, ECG i EGCG [10]. Zastosowanie gradientu temperatury umożliwia skrócenie czasu analizy do niespełna 32 minut. Odbywa się to jednak kosztem niecałkowitego rozdzielania sygnałów pochodzących od C i EC (piki 1 i 2 na ryc. 5). Natomiast całkowity rozdział pięciu katechin zapewnia dopiero metoda obejmująca dwa 40-minutowe cykle stałotemperaturowe. Limit oznaczalności dla oznaczania katechin metodą chromatografii gazowej wynosi poniżej 10ng/ml [10]. Do oznaczania katechin stosowano także metodę wykorzystującą połączenie chromatografii gazowej ze spektrometrią

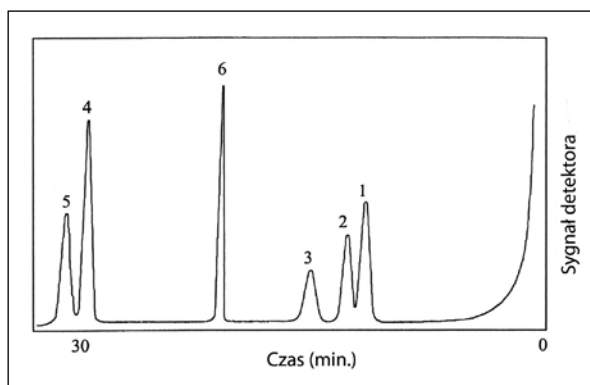
masową (GC-MS) [42]. Jak do tej pory, pomimo stosowania różnych warunków rozdzielania i różnych typów detekcji (GC-FID, GC-MS), nie udało się jednak opracować metody opartej o chromatografię gazową pozwalającej na całkowite rozdzielanie i jednoczesne ilościowe oznaczenie ośmiu naturalnie występujących katechin.

Metody oznaczania katechin i teafławin w materiale biologicznym

Wysokosprawną chromatografię cieczową wykorzystywaną jest także do oznaczania katechin w materiale biologicznym [15]. Procedura przygotowania próbek do tego typu oznaczeń ze względu na skomplikowaną matrycę jest bardziej złożona niż w przypadku oznaczania polifenoli w roztworze wodnym. Obejmuje ona enzymatyczną hydrolizę pochodnych katechin, powstających w organizmie, przy użyciu mieszaniny dwóch enzymów: β -glukuronidazy i sulfatazy oraz ekstrakcję wolnych katechin octanem etylu. Katechiny rozdzielane są następnie na kolumnie z wypełnieniem C_{18} w odwróconym układzie faz, przy wyko-



Ryc. 4. Efekt rodzaju zastosowanej fazy stacjonarnej oraz obecności kwasu w fazie ruchomej na rozdział mieszaniny standardów katechin. (A) rozdział uzyskany przy wykorzystaniu nieaktywowanej odwróconej fazy stacjonarnej C_{18} oraz fazy ruchomej zawierającej kwas; (B) rozdział uzyskany przy wykorzystaniu standardowej monomerycznej fazy stacjonarnej C_{18} oraz fazy ruchomej zawierającej kwas; (C) rozdział uzyskany przy wykorzystaniu nieaktywowanej odwróconej fazy stacjonarnej C_{18} oraz fazy ruchomej nie zawierającej kwasu [23].



Ryc. 5. Wykorzystanie techniki GC-FID do rozdzielania mieszaniny trimetylosililowych pochodnych pięciu katechin: (1) EC, (2) C, (3) EGC, (4) ECG, (5) EGCG, (6) kwercetyna. Wypełnienie kolumny - 3% OV-1. Izotermiczny rozdział w temperaturze 235°C przez 22 min, później gradient temperatury - 48°C/min do 310°C [10].

rzystaniu jako fazy ruchomej układu dwóch buforów fosforanowych o różnej zawartości acetonitrylu i tetrahydrofuranu [15]. Katechiny w płynach ustrojowych takich jak surowica krwi lub mocz występują w stężeniach od 50 do 300 ng/ml, czyli o rząd wielkości mniejszych od zawartości tych związków w roztworach herbat [15]. Z tego powodu oznaczanie katechin metodą HPLC w matrycach biologicznych wymaga zastosowania odpowiednio czułych detektorów. Najbardziej obiecującą metodą analizy zarówno katechin, teaflawin jak i ich metabolitów w materiale biologicznym jest połączenie chromatografii cieczowej ze spektrometrią masową (LC-MS). Spektrometria masowa jest techniką opartą na jonizacji cząsteczek lub atomów, której podstawą jest pomiar stosunku masy do ładunku elektrycznego cząsteczki (m/z). Do wyznaczania mas molekularnych oraz w celu ustalenia struktury katechin, oprócz najczęściej używanej jonizacji elektrorozpylania (*Electrospray Ionization* – ESI) [32] stosowano również jonizację elektronami (*Electron Ionization* – EI) [33], i bombardowanie szybkimi atomami [33]. Po raz pierwszy do identyfikacji katechin zastosowano metodę wykorzystującą termojonizację próbki (*Thermospray Ionisation Mass Spectrometry* – TSI-MS), co pozwoliło na rozdzielanie oraz identyfikację mieszaniny czterech katechin (EC, EGC, ECG, EGCG) [43]. Również tandemowa spektrometria mas z fragmentacją jonów przez zderzenia (*Collisionally Induced Dissociation* – CID) umożliwia identyfikację katechin poprzez przypisanie im

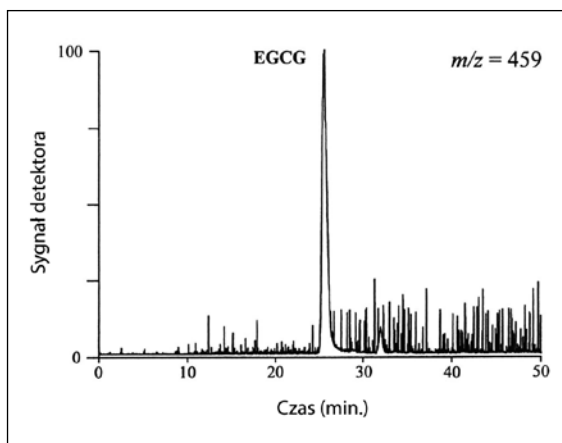
odpowiednich jonów fragmentarycznych. Słaby rozdział chromatograficzny uzyskiwany w tej metodzie całkowicie rekompensuje wysoka selektywność jaką zapewnia detekcja spektrometrii masowej. Ponadto zastosowanie kapilarnych kolumn chromatograficznych, które charakteryzuje wysoka rozdzielczość, w połączeniu z wysoką czułością i selektyw-

nością spektrometrii masowej pozwala na oznaczenie katechin i teaflawin w złożonych matrycach biologicznych na poziomie pmol/ml. Przykładem jest chromatogram otrzymany dla próbki osocza ludzkiego, w którym oznaczano zawartość EGCG wykorzystując upakowaną kolumnę kapilarną C_{18} w połączeniu z techniką ciekłej chromatografii i spektrometrii masowej z jonizacją w polu elektrycznym LC-ESI-MS (ryc. 6) [31].

Wykazano również, że tandemowa spektrometria masowa wykorzystująca jonizację w polu elektrycznym w połączeniu z chromatografią cieczową (LC-ESI-MS-MS) oprócz katechin pozwala również na identyfikację i ilościowe oznaczenie teaflawin, których zawartość w materiale biologicznym jest rzędu ng/ml (ryc. 7). Limit oznaczalności w metodach wykorzystujących LC-MS wynosi 0,1 pg/ml [8].

Mimo zalet metod wykorzystujących spektrometrię masową nie są one często stosowane, ponieważ wymagają

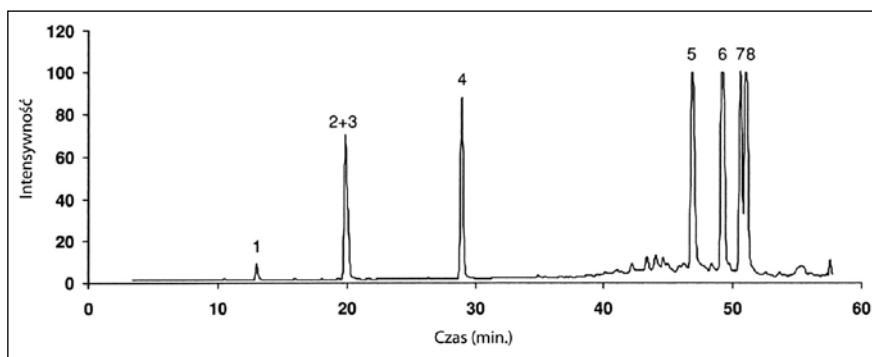
kosztownej aparatury. Obecnie do ilościowego oznaczania katechin w materiale biologicznym najczęściej stosuje się metodę wykorzystującą połączenie HPLC z detektorem elektrochemicznym [44]. Do tego celu stosowany jest detektor kulometryczny lub amperometryczny. Wykorzystanie tych detektorów umożliwia fakt, że katechiny i teaflawiny należą do związków, które w zależności od warunków mogą ulegać reakcji utlenienia bądź redukcji, a wartości ich standardowego potencjału redoks zawierają się w przedziale 430-550 mV. Zasada działania detektora kulometrycznego opiera się na pomiarze całkowitego ładunku, jaki przepływa podczas reakcji utleniania bądź redukcji cząsteczek analitu przy powierzchni elektrody pracującej. Natomiast w przypadku detektora amperometrycznego mierzone jest natężenie prądu przepływającego pomiędzy elektrodą pracującą a elektrodą odniesienia. Obie wielkości, zarówno ładunek jak i natężenie prądu, są proporcjonalne do stężenia oznaczanego związku. Klasyczne naczynko pomiarowe obydwu detektorów zawiera układ trzech elektrod: elektrody pracującej, na której powierzchni ma miejsce reakcja utleniania bądź redukcji oznaczanego związku, elektrody pomocniczej, której zadaniem jest kompensowanie jakichkolwiek zmian przewodnictwa fazy ruchomej oraz elektrody odniesienia. Przyłożony potencjał do elektrody pracującej jest charakterystyczny dla analizowanego związku i jest utrzymywany na stałym poziomie względem potencjału elektrody odniesienia.



Ryc. 6. Chromatogram otrzymany dla próbki osocza ludzkiego, w której oznaczano zawartość EGCG wykorzystując kolumnę kapilarną (30 cm 3506 mm 3256 mm z wypełnieniem Zorbax eclipse monomeric C_{18}) w połączeniu z techniką ciekłej chromatografii i spektrometrii masowej z jonizacją w polu elektrycznym (LC-ESI-MS) [31].

Obecnie do oznaczania polifenoli herbat najczęściej wykorzystuje się technikę HPLC z detektorem kulometrycznym, posiadającym kilka elektrod pracujących jednocześnie przy różnych potencjałach, co umożliwia rozdział i jednoczesne ilościowe oznaczenie czterech związków: (-)EGC, (-)EGCG, (-)EC oraz (-)ECG w surowicy krwi, moczu oraz homogenatach tkankowych [45].

Natomiast zastosowanie detektora amperometrycznego pozwala na oznaczenie w surowicy krwi oraz homogenatach tkankowych trzech katechin występujących w największych ilościach

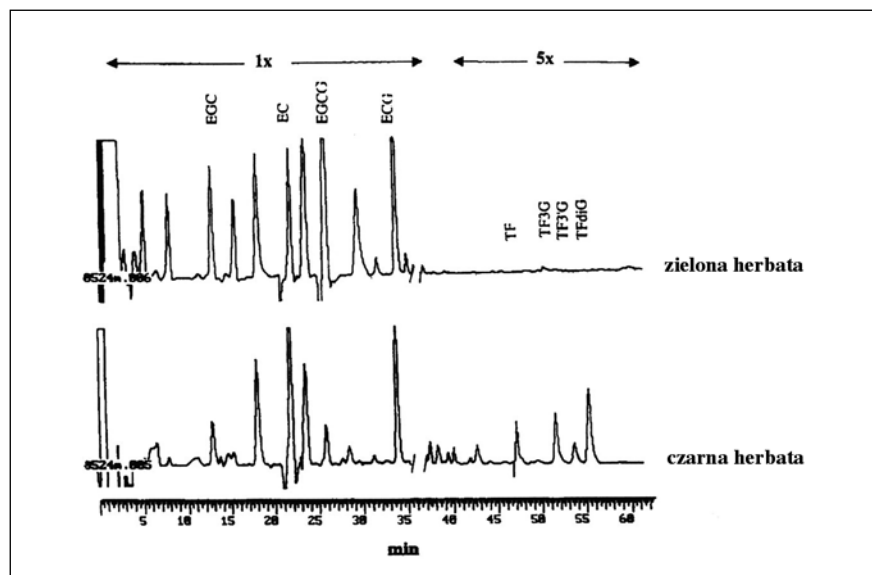


Ryc. 7. Rozdział mieszaniny katechin i teaflawin czarnej herbaty o stężeniu w przybliżeniu 70 pmol/ μ l, chromatogram uzyskany metodą LC-ESI-MS-MS. Piki w następującej kolejności: (1) (-)-epigalokatechina; (2) (-)-epikatechina wmywana jednocześnie z (3) (-)-galusanem epigalokatechiny; (4) (-)-galusan epikatechiny; (5) teaflawina; (6) 3-galusan teaflawiny; (7); 3'-galusan teaflawiny; (8) 3,3'-digalusan teaflawiny [8].

w organizmie: EC, EGC i EGCG [46,47]. Limit oznaczalności jaki można uzyskać stosując technikę HPLC z detekcją elektrochemiczną wynosi 1 pg/ml (ryc. 8).

W literaturze opisano również metody wykorzystujące HPLC z innymi typami detektorów, ale większość z nich umożliwia oznaczanie tylko niektórych polifenoli. Przykładowo metoda wykorzystująca HPLC z detekcją chemiluminescencyjną (HPLC-CL) jest bardzo

specyficzna i pozwala na oznaczenie zawartości tylko EGC i EGCG w surowicy krwi i moczu, ale na poziomie pg/ml [48]. Poza tym dodatkowym jej ograniczeniem jest konieczność stosowania elucji izokratycznej, co utrudnia rozdział związków. Do oznaczania katechin w materiale biologicznym wykorzystywano także HPLC z jednoczesną detekcją UV i fluorescencyjną [40]. W przypadku detektora fluorescencyjnego wykorzystuje się naturalną flu-



Ryc. 8. Zawartość czterech podstawowych katechin i teaflawin w ślinie wolontariuszy na 2 minuty po spożyciu 30ml roztworu zielonej i czarnej herbaty (1.6 mg/ml) [45].

orescencję wykazywaną przez (+)-C i (-)-EC, co pozwala oznaczyć nawet śladowe ilości tych związków. Limit oznaczalności w metodach wykorzystujących HPLC z detekcją fluorescencyjną wynosi 0,8 pg/ml. Pozostałe katechiny, nie wykazujące zdolności do fluorescencji, analizowane są przy użyciu detektora UV, którego małą czułość niestety nie wystarcza do ich oznaczania na poziomie obserwowanym w tkankach.

(Bibliografia u autora)

Pytania testowe

(Uzupełnij poniższe zdania)

1. Do oznaczania katechin oraz teaflawin najczęściej wykorzystywana jest technika:

- wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC)
- chromatografii gazowej (GC)
- chromatografii cienkowarstwowej (TLC)
- elektroforezy kapilarnej

2. Detektorem z wyboru do oznaczania polifenoli w roztworach herbat jest detektor:

- fluorescencyjny
- spektrofotometryczny
- elektrochemiczny
- spektrometrii masowej

3. Polifenole w roztworach herbat występują w postaci:

- wolnej
- połączeń glikozydowych
- związków kompleksowych
- zestryfikowanej

4. Limit oznaczalności 0,1pg/ml dla oznaczania polifenoli herbat można uzyskać stosując połączenie techniki HPLC z detektorem:

- spektrofotometrycznym
- fluorescencyjnym
- spektrometrii masowej
- elektrochemicznym

(Rozwiązania szukaj w numerze)

Zasady publikowania artykułów naukowych w „Gazecie Farmaceutycznej”

- Publikowane są artykuły z zakresu farmacji i medycyny
- Prace zgłaszane do druku winny zawierać: cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, wykaz piśmiennictwa
- Prace powinny być zaopatrzone w krótkie streszczenie i zbiór podstawowych słów kluczowych w języku polskim i angielskim
- Objętość pracy nie może przekraczać 20 tys. znaków, łącznie z tabelami, wykresami i piśmiennictwem
- Piśmiennictwo może zawierać co najwyżej 20 pozycji najistotniejszych dla publikowanej pracy, ułożonych wg kolejności cytowań z odpowiednio ponumerowanymi odsyłaczami, zgodnymi z zamieszczonymi w tekście
- Prace (tekst, tabele, rysunki, fotografie) powinny być przesłane w formie elektronicznej, opatrzone następującymi danymi: nazwisko i imię, stopień naukowy i stanowisko, miejsce pracy, nr telefonu/faksu/e-mail, adres do korespondencji. Ponadto powinna być załączona zgoda autorów na opublikowanie pracy w wersji elektronicznej „Gazety Farmaceutycznej”
- Nadesłane prace recenzowane są anonimowo przez niezależnych ekspertów
- Redakcja zastrzega sobie prawo wprowadzania śródtytułów, niezbędnych poprawek stylistycznych i ew. zmniejszania objętości lub niepublikowania nadesłanych materiałów.