

PRZEMYSŁAW KRAWCZYK, BEATA DRUŻYŃSKA

PORÓWNANIE OZNACZANIA ZAWARTOŚCI KATECHIN W LIŚCIACH ZIELONEJ I CZARNEJ HERBATY METODĄ WANILINOWĄ I METODĄ HPLC

Streszczenie

Celem pracy było porównanie standardowej metody chemicznej (metoda wanilinowa) oznaczania katechin z metodą HPLC oraz skuteczności ekstrakcji katechin z liści zielonej i czarnej herbaty z wykorzystaniem dwóch mieszanin różnych rozpuszczalników. Za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej oznaczano (+)-katechinę, (-)-epikatechinę, galusan (-)-epigalokatechiny, natomiast chemiczną metodą wanilinową oznaczano katechiny ogółem. Badane związki ekstrahowano za pomocą dwóch mieszanin rozpuszczalników: aceton : woda (7 : 3) oraz metanol : woda (8 : 2).

Oznaczona średnia zawartość katechin ogółem chemiczną metodą wanilinową kształtowała się na poziomie od 2,76 do 8,94 g/100 g s.s. i zależała od rodzaju herbaty i sposobu ekstrakcji. Najwięcej (8,94 g/100 g s.s.) znajdowało się w zielonej herbacie ekstrahowanej roztworem acetonu, natomiast najmniej (2,76 g/100 g s.s.) w czarnej herbacie ekstrahowanej roztworem metanolu. Z wyników uzyskanych metodą HPLC suma zawartości (+)-katechiny, (-)-epikatechiny i galusanu (-)-epigalokatechiny wynosiła od 2,63 g do 13,45 g/100 g s.s.

Ekstrakcja mieszaniną rozpuszczalników aceton : woda (7 : 3) wykazała około dwukrotnie wyższą skuteczność ekstrakcji katechin w porównaniu z mieszaniną metanol : woda (8 : 2). Zawartość katechin oznaczonych metodą HPLC była większa niż uzyskana metodą chemiczną.

Słowa kluczowe: herbata, katechiny, metoda wanilinowa, HPLC

Wprowadzenie

Flawonoidy należą do naturalnych przeciwutleniaczy, które zaliczane są do znacznie większej grupy – polifenoli. Głównym źródłem flawonoidów są owoce i warzywa, a także herbata. Duża konsumpcja herbaty spowodowana jest jej powszechnym dostępem oraz charakterystycznym cierpkim i gorzkawym smakiem. Wśród flawonoidów występujących w herbacie należy wyróżnić flawanole, które są reprezentowane

Mgr inż. P. Krawczyk, Katedra Technologii Żywności, dr inż. B. Drużyńska, Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności, Wydz. Technologii Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warszawa

przez katechiny. Ze względu na wzrost zainteresowania żywnością prozdrowotną, informacje na temat naturalnych przeciwutleniaczy zawartych w tak powszechnie spożywanym napoju, mogą być ważną informacją dla konsumenta [1, 5, 11, 13].

Najczęściej stosowanymi rozpuszczalnikami do ekstrakcji polifenoli z roślin są: metanol, etanol, aceton, woda, octan etylu, propanol, a także ich kombinacje. Do ekstrakcji katechin stosuje się głównie wodne roztwory metanolu i acetonu o stężeniach 70–90%, w różnych zakresach temperaturowych [8, 18].

Do określenia zawartości katechin stosuje się metody chemiczne (spektrofotometryczna metoda wanilinowa) oraz instrumentalne (wysokosprawna chromatografia cieczowa). Próba wanilinowa jest specyficzna dla flawan-3-oli, tanin skondensowanych i dihydrochalkonów, które mają pojedyncze wiązanie w pozycji -2,3 i zawierają wolne grupy metahydroksy- w pierścieniu B. W wyniku reakcji katechin z waniliną powstaje barwny związek analizowany spektrofotometrycznie [4, 7]. Jednak reaktywność waniliny z katechinami jest różna od reaktywności z taninami skondensowanymi [3]. Do oznaczenia katechin, jako typowych flawan-3-oli, standardem referencyjnym może być (+)-katechina lub (-)-epikatechina, a pomiar absorpcji należy przeprowadzić przy długości fali 500 nm [12]. Do analizy katechin metodą HPLC używa się roztworów metanolu lub acetonitrylu z niewielkim dodatkiem kwasu octowego, fosforowego lub mrówkowego, które znacznie poprawiają rozdzielność chromatograficzną. Efektywna zawartość kwasu ortofosforowego w fazie powinna zawierać się w przedziale 0,04–0,1%. Wszystkie katechiny, kwas galusowy oraz kofeina wykazują maksimum absorpcji przy długościach fali: 210 nm oraz w zakresie 275–280 nm [13, 14, 16].

Niniejsza praca miała na celu:

1. Określenie zawartości (+)-katechiny, (-)-epikatechiny, galusanu (-)-epigalokatechiny za pomocą metody HPLC.
2. Porównanie skuteczności ekstrakcji katechin z liści zielonej i czarnej herbaty za pomocą dwóch różnych mieszanin rozpuszczalników.
3. Porównanie chemicznej metody waniliowej oznaczania zawartości katechin z metodą HPLC.

Material i metody badań

Material doświadczalny stanowiły dwa rodzaje herbaty: zielona (Chiny) oraz czarna (Sri Lanca). Badane związki ekstrahowano za pomocą dwóch mieszanin rozpuszczalników: aceton : woda (7 : 3) oraz metanol : woda (8 : 2) [8, 10, 18]. Stopień czystości rozpuszczalników: aceton - min. 99,5% i alkohol metylowy - min. 99,5%.

Do kolby stożkowej odważano około 5 g liści zielonej lub czarnej herbaty i dodawano 100 ml rozpuszczalnika (Ac : H₂O (7 : 3), MeOH : H₂O (8 : 2)). Ekstrakcję prowadzono w temp. pokojowej przez 30 min w wytrząsarce WL-1. Otrzymany eks-

trakt sączono. Klarowny przesącz przechowywano w warunkach zamrażalniczych (temp. -18°C) maksymalnie przez dwa tygodnie [6, 8, 18].

W badanych ekstraktach oznaczano zawartość: katechin ogółem spektrofotometryczną metodą chemiczną (wanilinową), badając absorbancję barwnego związku powstałego w czasie reakcji flawon-3-oli z waniliną (cz.d.a., P.O.Ch., Gliwice) przy $\lambda=500\text{ nm}$ [7, 12]. Do wykreślenia krzywych wzorcowych sporządzono 5 różnych stężeń (-)-epikatechiny, i wykonano po 3 równoległe oznaczenia każdego z nich. Analizę wykonano w 3 powtórzeniach.

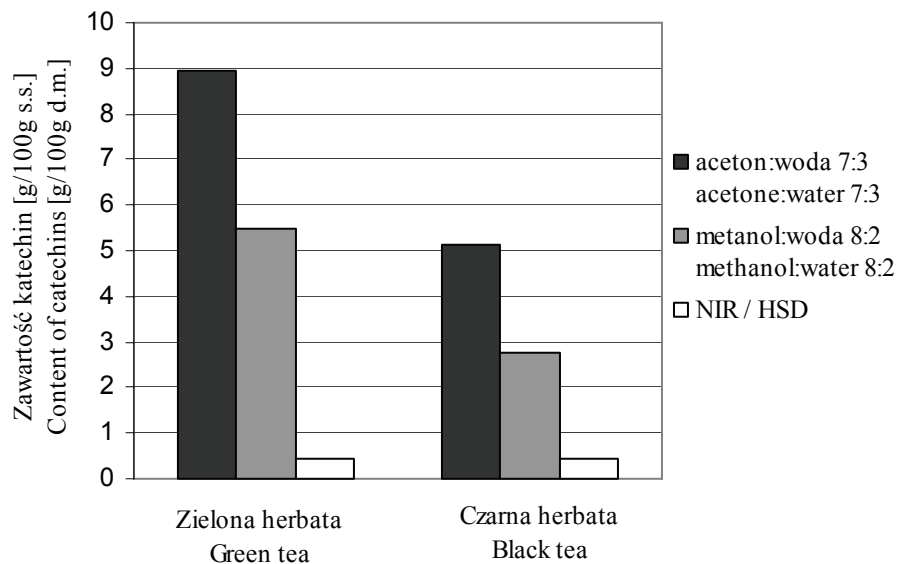
Katechiny oznaczano również metodą HPLC, używając kolumny RP-C₁₈ (150 x 4,6 mm; 5 μm), z detektorem diodowym $\lambda=279\text{ nm}$, prowadząc analizę w systemie gradientowym. Jako eluent stosowano mieszaninę buforu fosforanowego 0,01 mol/dm³ i alkoholu metylowego z przepływem 1 ml/min [9, 15, 16]. Zastosowanymi wzorcami były: (-)-epikatechyna (min. 90%, Sigma–Aldrich), (+)-katechyna (min. 98%, Sigma–Aldrich, Niemcy) oraz galusan (-)-epigalokatechiny (min. 95%, Sigma–Aldrich, Niemcy). Obserwowano zależność powierzchni otrzymanych pików od stężenia każdego z trzech analizowanych związków. Krzywe wzorcowe badanych substancji wyznaczono na podstawie 7 poziomów stężeń i 5 równoległych oznaczeń każdego z nich. Analizę wykonano w 10 powtórzeniach. Zawartości (+)-katechiny i (-)-epikatechiny w badanych produktach wyrażano w mg/100 g s.s., a galusanu (-)-epigalokatechiny i katechin ogółem w g/100 g s.s.

Analizę statystyczną otrzymanych wyników przeprowadzono przy użyciu programu Statgraphics Plus 4.1. Ocenę istotności różnic pomiędzy wartościami średnimi określano za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji przy $\alpha = 0,05$, a najmniejszą istotną różnicę wyznaczano testem Tukey'a.

Wyniki i dyskusja

W przypadku krzywej wzorcowej metody wanilinowej rzeczywisty liniowy przedział roboczy zawierał się od 0,36 do 1,82 mg/10 ml roztworu wzorcowego. Mieszaninę rozpuszczalników aceton : woda charakteryzowała krzywa kalibracyjna (w której: y – absorbancja, x – zaw. katechin) o postaci $y = 0,1029x + 0,0057$ ($r = 0,99$), a mieszaninę metanol : woda $y = 0,3872x + 0,0615$ ($r = 0,99$). Sun i wsp. [11], używając jako standardu (+)-katechiny uzyskali krzywą kalibracyjną tej metody o współczynniku korelacji $r = 0,99$.

Oznaczona średnia zawartość katechin ogółem metodą wanilinową kształtowała się na poziomie od 2,76 do 8,94 g/100 g s.s. i była zależna od rodzaju herbaty i rodzaju mieszaniny ekstrakcyjnej (rys. 1). Ekstrakcja mieszaniną aceton : woda wykazywała około dwukrotnie wyższą skuteczność w porównaniu z mieszaniną metanol : woda.



Rys. 1. Zawartość katechin w liściach zielonej i czarnej herbaty oznaczonych metodą waniilinową w zależności od rodzaju mieszaniny ekstrakcyjnej.

Fig. 1. The content of catechins determined using vanillin assay in green and black tea leaves depending on kind of extraction mixture.

W metodzie HPLC zależność liniową wyznaczono w zakresie stężeń: (+)-katechyna 9,7–194,0 $\mu\text{g/ml}$, (-)-epikatechyna 9,0–180,9 $\mu\text{g/ml}$, galusan (-)-epigalokatechiny 9,5–237,5 $\mu\text{g/ml}$, natomiast odpowiednie równania i współczynniki korelacji przedstawiały się następująco: $y = 14730x + 10478$, $r = 0,99$; $y = 15235x + 15050$, $r = 0,99$ oraz $y = 29916x - 51470$, $r = 0,99$.

Wilska-Jeszka [17] podaje, że zawartość (+)-katechiny w zielonej herbacie waha się pomiędzy 1–2%, (-)-epikatechiny 1–3%, a w przypadku galusanu (-)-epigalokatechiny zakres ten wynosi 9–13%.

W badanej zielonej herbacie jedynie przy zastosowaniu ekstrakcji wodnym roztworem acetonu, wartości poszczególnych katechin zawierały się w takich przedziałach. Według danych literaturowych w zielonej herbacie zawartość (-)-epikatechiny powinna być wyższa niż (+)-katechiny [2, 9, 15, 16], co nie potwierdziło się w przeprowadzonych badaniach. W zielonej herbacie stwierdzono zawartość (-)-epikatechiny w zakresie od 0,35–0,49 g/100 g s.s., natomiast w czarnej herbacie od 0,07–0,23 g/100 g s.s. (tab. 1). Na zmienną zawartość miał prawdopodobnie wpływ sposób ekstrakcji. Według Nishitani i Sagesaka [9] zawartość tego związku powinna zawierać się w przedziale 0,43–0,97 g/100 g s.s. w zielonej herbacie i 0,04–0,32 g/100 g s.s. w czarnej herbacie. Porównując wyniki otrzymane z obu analiz można stwierdzić, że

zawartość (-)-epikatechiny oznaczono w niniejszej pracy na zbliżonym poziomie. Przy użyciu wodnego roztworu acetonu jako rozpuszczalnika, zawartość galusanu (-)-epigalokatechiny w zielonej herbacie wyniosła ok. 10,5 g/100 g s.s. i była największa spośród wszystkich otrzymanych wyników. Zawierała się ona w przedziale wartości podanych przez Wilską-Jeszczę [17]. Podczas analizy HPLC ponownie znacznie skuteczniejszy w wydobywaniu katechin okazał się roztwór acetonu, gdyż średnio ekstrahował ponad dwukrotnie więcej badanych substancji.

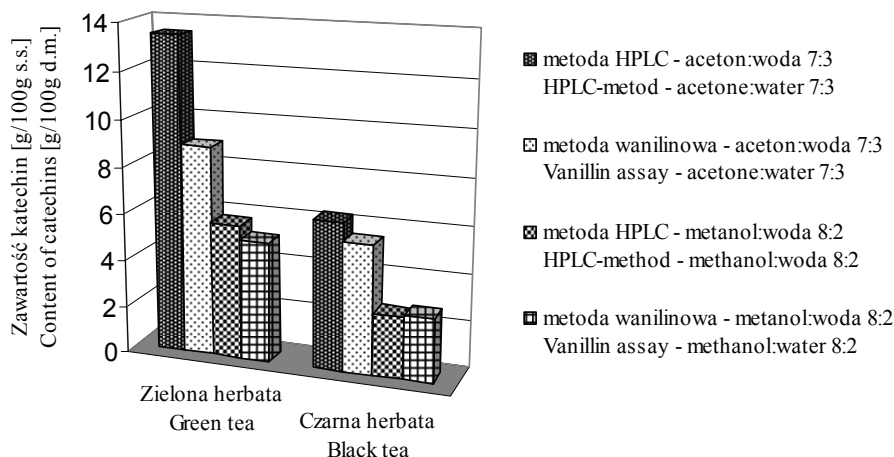
Tabela 1

Zawartość flawanoli oznaczonych metodą HPLC w zielonej i czarnej herbacie w zależności od rodzaju mieszaniny ekstrakcyjnej.

The content of flavanols determined using HPLC-method in green and black tea depending on kind of extraction mixture.

Zawartość flawanoli Flavanols content	Zielona herbata / Green tea		Czarna herbata / Black tea	
	Aceton:woda Acetone:water	Metanol:woda Metanol:water	Aceton:woda Acetone:water	Metanol:woda Metanol:water
(+)-katechyna [mg/100g s.s.] (+)-katechin [mg/100g d.m.]	2323,1	1315,6	489,1	188,9
NIR / HSD	23,2		6,6	
(-)-epikatechyna [mg/100g s.s.] (-)-epicatechin [mg/100g d.m.]	486,5	352,0	230,9	72,2
NIR / HSD	4,2		3,0	
galusan(-)-epigalokatechiny [g/100g s.s.] (-)-epigallocatechin gallate [g/100g d.m.]	10,64	5,03	5,61	2,37
NIR / HSD	0,19		0,13	

Suma zawartości (+)-katechiny, galusanu (-)-epigalokatechiny i (-)-epikatechiny oznaczona metodą HPLC wynosiła od 2,63 do 13,45 g/100 g s.s. Ilości katechin otrzymanych obiema metodami znajdowały się na zbliżonym poziomie. Największa różnica wystąpiła przy porównaniu wyników odnoszących się do zielonej herbaty ekstrahowanej wodnym roztworem acetonu. Jednak w metodzie HPLC nie badano takich katechin, jak: galusan (-)-epikatechiny, (-)-epigalokatechyna, (+)-galokatechyna, które również zaliczane są do głównych flawanoli herbaty. W konsekwencji wpłynęło to na zaniżoną zawartość katechin oznaczonych tą metodą, w porównaniu z metodą wanilinową, za pomocą której oznaczano katechiny ogółem. Na podstawie tego spostrzeżenia można stwierdzić, że za pomocą metody HPLC oznacza się większą ilość katechin, dysponując odpowiednimi wzorcami odniesienia.



Rys. 2. Zawartość sumy katechin oznaczonych metodą HPLC oraz katechin ogółem oznaczonych metodą wanilinową w zielonej i czarnej herbacie w zależności od rodzaju mieszaniny ekstrakcyjnej.

Fig. 2. The content of total catechins determined using HPLC-method and vanillin assay in green and black tea depending on kind of extraction mixture.

Wnioski

1. Zawartość (+)-katechiny, (-)-epikatechiny, galusanu (-)-epigalokatechiny jest znacząco wyższa w liściach zielonej herbaty w porównaniu z herbatą czarną.
2. Ekstrakcja mieszaniną rozpuszczalników aceton : woda (7 : 3) wykazuje około dwukrotnie wyższą skuteczność ekstrakcji katechin w porównaniu z mieszaniną metanol : woda (8 : 2).
3. Zawartość katechin oznaczanych metodą HPLC jest wyższa niż uzyskana metodą wanilinową.

Praca była prezentowana podczas XII Ogólnopolskiej Sesji Sekcji Młodej Kadry Naukowej PTTŻ, Lublin, 23–24 maja 2007 r.

Literatura

- [1] Bartnikowska E.: Antyoksydanty pokarmowe a korzyści zdrowotne. W: „Czy wiesz co jesz?” - pod red. Wysockiej H. i Ozimek I. Wyd. Prószyński i s-ka, Warszawa 2000, s. 208-214.
- [2] Bonoli M., Pelillo M., Toschi T.G., Lercker G.: Analysis of green tea catechins: comparative study between HPLC and HPCE. *Food Chem.*, 2003, **81**, 631-638.
- [3] Deshpande S.S., Cheryan M., Salunkhe D.K.: Tannin analysis of food products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1986, **24**, 401-449
- [4] Hagerman A.E.: Tannin Chemistry. Vanillin Method. Department of Chem. and Biochem. Miami University, 2002.
- [5] Higdon J.V., Frei B.: Tea catechins and polyphenols: Health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2003, **43** (1), 89-143.

- [6] Ito R., Yamamoto A., Kodama S., Kato K., Yoshimura Y., Matsunaga A., Nakazawa H.: A study on the change of enantiomeric purity of catechins in green tea infusion. *Food Chem.*, 2003, **83**, 563-568.
- [7] Katalinic V., Milos M., Modun D., Music I., Boban M.: Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)-catechin. *Food Chem.*, 2004, **86**, 593-600.
- [8] Naczki M., Shahidi F.: Extraction and analysis of phenolics in food. *J. Chrom. A*, 2004, **1054**, 95-111.
- [9] Nishitani E., Sagesaka Y.M.: Simultaneous determination of catechins, caffeine and other phenolic compounds in tea using new HPLC method. *J. Food Com. Anal.*, 2004, **17**, 675-685.
- [10] Perva-Uzunalic A., Skerget M., Knez Z., Weinreich B., Otto F., Grüner S.: Extraction of active ingredients from green tea (*Camellia sinensis*): Extraction efficiency of major catechins and caffeine. *Food Chem.*, 2006, **96**, 597-605.
- [11] Robak J., Zachwieja Z.: Rola polifenoli zawartych w diecie w profilaktyce schorzeń. *Brom. Chem. Toks.*, 1999, **32 (3)**, 215-220.
- [12] Sun B., Ricardo-da-Silva J.M., Springer I.: Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *J. Agric. Food Chem.*, 1998, **46**, 4267-4274.
- [13] Wang H., Gordon J.P., Helliwell K.: Tea flavonoids: their functions, utilization and analysis. *Trends in Food Sci. Technol.*, 2000, **11**, 152-160.
- [14] Wang H., Gordon J.P., Helliwell K.: Determination of hamamelitannin, catechins and gallic acid in witch hazel bark, twig and leaf by HPLC. *J. Pharmac. Biomed. Anal.*, 2003, **33**, 539-544.
- [15] Wang H., Gordon J.P., Helliwell K.: HPLC determination of catechins in tea leaves and tea extracts using relative response factors. *Food Chem.*, 2003, **81**, 307-312.
- [16] Wang H., Helliwell K., You X.: Isocratic elution system of the determination of catechins, caffeine and gallic acid in green tea using HPLC. *Food Chem.*, 2000, **68**, 115-121.
- [17] Wilska-Jeszka J.: Inne naturalne składniki żywności. W: *Chemia żywności - pod red. Sikorskiego Z.*. WNT, Warszawa 2002, s. 457-480.
- [18] Zuo Y., Chen H., Deng Y.: Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, oolong, black and pu-erh teas using HPLC with a photodiode array detector. *Talanta*, 2002, **57**, 307-316.

COMPARISON OF DETERMINATION OF CATECHINS IN GREEN AND BLACK TEA LEAVES USING VANILLIN ASSAY AND HPLC-METHOD

Summary

The objective of this study was compare standard chemical method (vanillin assay) to determine total catechins with HPLC-method and effectiveness of extraction catechins from green and black tea leaves using two kinds of solvents. The (+)-catechin, (-)-epicatechin, (-)-epigallocatechin gallate using high performance liquid chromatography method and total catechins using vanillin assay were determined. The compounds were extracted using two kinds of solvents: acetone:water (7 : 3) and methanol:water (8 : 2).

The average of total catechins determined by vanillin assay was from 2.76 g to 8.94 g/100 g d.m. depending on kinds of teas and used extract solvents. The most of catechins (8.94 g/100 g d.m.) were extracted from green tea leaves by acetone solution and at least (2.76 g/100 g d.m.) from black tea leaves by methanol solution. The total rate of content (+)-catechin, (-)-epicatechin and (-)-epigallocatechin gallate determined using HPLC-method was from 2.63 g to 13.45 g/100 g d.m.

The mixture acetone:water (7 : 3) has twice higher effectiveness of extraction in relation to mixture methanol:water (8 : 2). HPLC-method made possible to determine a higher quantity of analysed catechins in comparison to chemical method (vanillin assay).

Key words: tea, catechins, vanillin assay, HPLC ☒