Определение катехинов методом твердофазной люминесцентной спектроскопии

С.В. Бельтюкова, А.А. Бычкова

Одесская национальная академия пищевых технологий,
65039, г. Одесса, ул. Канатная, 112, bychkovaab@mail.ru

Поступила: 6 декабря 2011 г. / Подписана к печати: 6 марта 2012 г.

Разработана методика определения катехинов в чае, основанная на использовании молекулярной люминесценции сорбатов комплексов скандия (III) с катехинами на сорбенте декстранового типа Sephadex G-75, в присутствии анионного ПАВ - лаурилсульфата натрия. Выбраны оптимальные условия сорбции - кислотность среды, концентрация комплексообразователя, время сорбции, температура и время высушивания сорбента, количество сорбента. Предел обнаружения катехинов составляет 0,005 мг/мл.

S.V. BELTYUKOVA, A.A. BYCHKOVA. *DETERMINATION OF CATECHINS BY SOLID-PHASE LUMINESCENCE SPECTROSCOPY. A spectrofluorimetric method for determination of catechins in the tea was developed. The method is based on the use of molecular luminescence sorbate complexes of scandium (III) and catechins on the sorbent type dextran Sephadex G-75, in the presence of anionic surfactants - sodium lauryl sulfate. The optimum conditions of sorption were chosen - acidity, the concentration of complexing, sorption time, temperature and drying time of the sorbent, the amount of sorbent. The detection limit is 0.005 mg of catechin / ml.The detection limit is 0,005 mg/ml catechin.*

Ключевые слова: катехины, сорбаты комплексов, люминесценция, скандий (III).

Keywords: catechines, sorbate complexes, luminescence, scandium (III).

Соединения фенольной и полифенольной природы проявляют свойства антиоксидантов, содержатся в составе тканей многих растений, в том числе лекарственных и применяются при производстве различных биологически активных добавок. Углеродный скелет молекул различных фенолов включает одно или несколько бензольных колец, а химическая активность связана с присутствием в них одной или нескольких гидроксильных или карбоксильных групп. В зависимости от того, в какой форме (окисленной или восстановленной) находится трехуглеродный фрагмент, связывающий два ароматических ядра, различают несколько подгрупп фенольных соединений — катехины, лейкоантоцианы, флавоны, флавонолы, антоцианы. Наиболее высокой и разнообразной биологической активностью обладают фенолы, содержащие несколько гидроксильных групп, расположенных в орто-, пара- или мета-положениях. К таким полифенолам относятся катехины (флаван-3-олы). От других классов полифенолов они отличаются отсутствием в положении 4 как карбонильной, так и гидроксильной групп.

Поскольку катехины содержат в своей молекуле два ассиметричных атома углерода, то в соответствии с этим простейший катехин может существовать в шести стереоизомерных формах: в виде *l*-катехина, *d*-катехина, *d,l*-катехина, *l*-эпикатехина, *d*-эпикатехина, *d,l*-эпикатехина.

Катехины обладают высоким антиоксидантным потенциалом и склонны к аутоокислению и ферментативному окислению. Редокс-превращения катехинов играют важную роль в технологии многих пищевых производств, таких как ферментация чая, виноделие, изготовление какао. Сумма чайных катехинов обладает очень высокой антиоксидантной активностью: она в 25-100 раз выше таковой для α-токоферола и аскорбата. Самым мощным из известных антиоксидантов растительного происхождения является эпигаллокатехингаллат [1].

Полифенольные соединения, в том числе и катехины обладают противовоспалительным, антигистаминным, антиоксидантным действием, снимают отеки, уменьшают риск сердечно-сосудистых заболеваний, стабилизируют клеточные мембраны, угнетают процессы старения, поэтому входят в состав многих биологически активных добавок и лекарственных препаратов. В связи с этим в зависимости от назначения растительного сырья для определения его доброкачественности проводят определение суммы полифенольных соединений, содержания катехинов и других полифенолов.

Наиболее распространенными методами определения катехинов являются ВЭЖХ с УФ-детектором [2-4], детектирование проводят при 275-280 нм [5,6,7], при 200 нм [8,9], при 205 нм [10]. Электрохимическое детектирование особенно широко применяют для определения следов полифенольных соединений, например, метили-

© С.В. Бельтюкова, А.А.Бычкова

рованных производных катехинов, содержащихся в чае в очень низкой концентрации (менее 1% от сухой массы чайного листа), в работе [11] предложено масс-спектрометрическое детектирование. Адсорбционную тонкослойную хроматографию (ТСХ) используют для качественного и количественного определения индивидуальных катехинов [12-15].

Ввиду большого интереса к антиоксидантам, в частности, катехинам, обладающим биологической активностью, разработка простых, экспрессных и воспроизводимых методик определения катехинов в растительном сырье является весьма актуальной задачей.

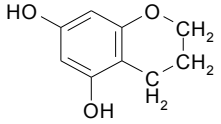
АППАРАТУРА И МАТЕРИАЛЫ

Спектры люминесценции катехинов и их комплексов со скандием (III) регистрировали с помощью спектрометра СДЛ-1, люминесценцию возбуждали светом ртутно-кварцевой лампы ДРШ-250 со светофильтром УФС-2, выделяющим излучение с $\lambda_{макс}$=365 нм. Спектры поглощения регистрировали с помощью спектрофотометра UV-VIS Specord M40, pH растворов измеряли с помощью иономера универсального ЭВ-74.

В качестве стандартного использовали раствор суммы катехинов (0,2 мг/мл), который готовили по точной навеске препарата в этаноле. Сумму катехинов выделяли из чая по методике [16]. Растворы хлоридов иттрия (III), лантана (III), скандия (III) ($1{,}0\cdot10^{-1}$моль/л) готовили растворением соответствующих оксидов в соляной кислоте (1:1). Избыток кислоты выпаривали до влажных солей и разбавляли дистиллированной водой. Ацетатный буферный раствор готовили по методике [17]. Растворы поверхностно-активных веществ - разбавлением исходных веществ в дистиллированной воде.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Все катехины поглощают свет в ультрафиолетовой области с максимумом поглощения при 270 – 280 нм, которое обусловлено наличием в составе их молекул хромонового ядра:



Спектр поглощения 70%-ного этанольного раствора суммы катехинов характеризуется наличием полос поглощения π-π* переходов в УФ-области при λ=278 нм и n→π* переходов при λ=380 нм (рис. 1). Раствор катехинов при облучении УФ-светом ртутной лампы с $\lambda_{макс.}$=365нм проявляет люминесцентные свойства ($\lambda_{изл.}$=392нм), но интенсивность их люминесценции невелика (рис. 2). Известно, что $I_{люм.}$ лиганда в некоторых случаях может возрастать при комплексообразовании с ионами металлов, не имеющих собственного поглощения в видимой области спектра. Катехины имеют циклообразующую ортодифенольную группировку и образуют со многими ионами металлов хелаты с соотношением Me:R = 1:1. В связи с этим изучено влияние некоторых элементов III группы (Sc, Y, La, Tb, Eu, Gd, Al), а также Zn на $I_{люм.}$ катехинов как в растворе, так и на твердой фазе. Установлено, что при комплексообразовании $I_{люм.}$ комплексов возрастает от 6 до 40 раз. Наибольшую интенсивность люминесценции обнаруживают комплексы со Sc (III), которые и были выбраны для дальнейших исследований.

Интенсивность люминесценции комплексов значительно возрастает на сорбентах. В связи с этим была изучена $I_{люм.}$ комплексов на сорбентах различной природы: фосфате алюминия, силикагелях, цеолитах, пенополиуретане и сорбентах декстранового типа – сефадексах, которые являются синтетическими производными полисахарида – декстрана, в своей структуре имеют поры заданного размера и относятся к молекулярным ситам. Находят применение при концентрировании фенолов [18]. Интенсивная люминесценция комплекса скандия с катехинами обнаруживается на сефадексах G-50, G-75, G-150, относительная $I_{люм.}$ сорбатов на которых составляет 74, 100 и 85 соотвественно. Для дальнейших исследований был выбран сефадекс G-75, на котором $I_{люм.}$ сорбата была наибольшей. Люминесценция не обнаруживается на пенополиуретане, силикагеле, цеолитах и едва заметное излучение наблюдается на фосфате алюминия. При комплексообразовании наблюдаются изменения в спектрах люминесценции (рис. 2). $I_{люм.}$ при этом возрастает на сорбенте в 40 раз по сравнению $I_{люм.}$ в растворе, максимум люминесценции смещается батохромно на 115 нм, и составляет 507 нм (рис. 2).

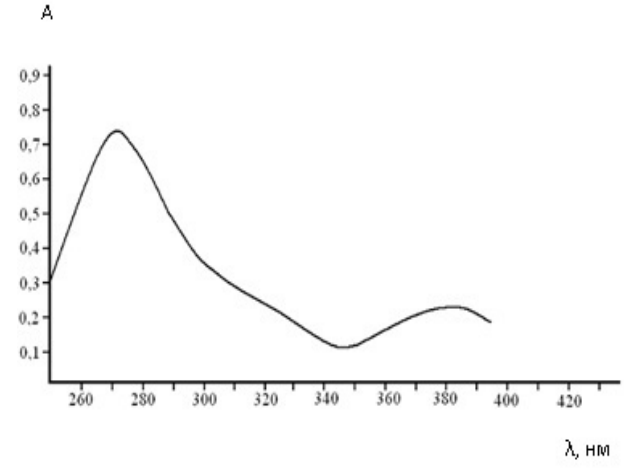


Рис.1. Спектр поглощения этанольного раствора катехинов $C_{катехинов}$=0.025 мг/мл

© С.В. Бельтюкова, А.А.Бычкова

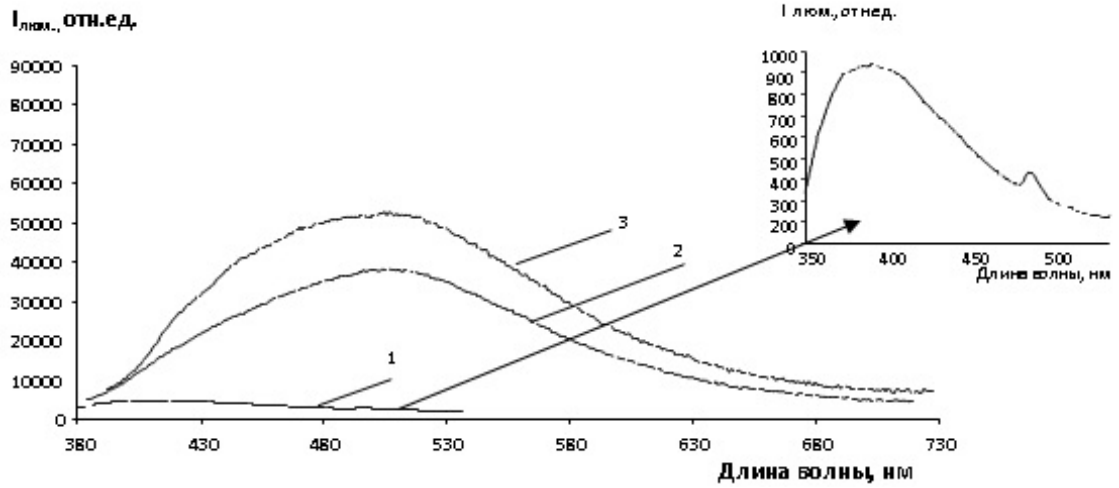


Рис. 2. Спектры люминесценции катехинов (1), сорбатов комплексов катехинов с ионами Sc (III) (2), сорбатов комплексов катехинов с ионами Sc(III) и лаурилсульфатом натрия (3), сорбент - Sephadex G-75; $C_{катехинов}$ = 0.2 мг/мл

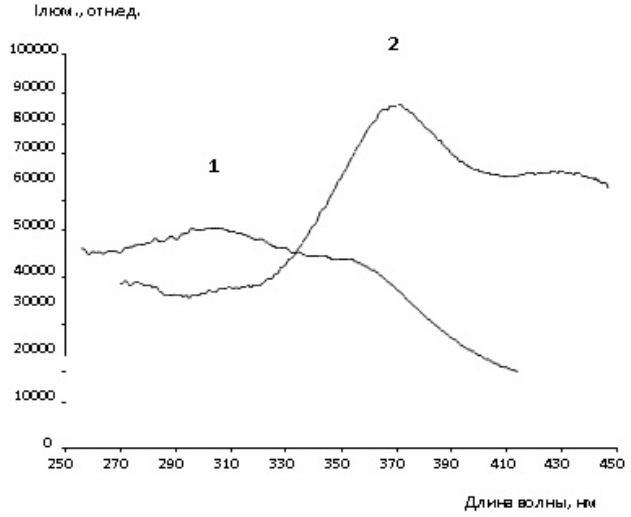


Рис.3. Спектры возбуждения сорбатов катехинов (1) и их комплексов со скандием (III) (2); $C_{катехинов}$ = 0.2 мг/мл

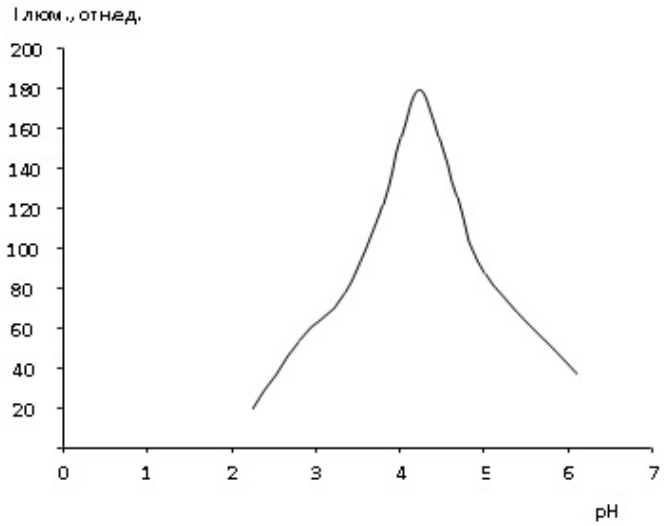


Рис.4. Зависимость интенсивности люминесценции сорбатов комплексов катехинов с ионами Sc(III) от pH раствора; $C_{катехинов}$ = 0.1мг/мл

Значительные изменения происходят и в спектрах возбуждения при комплексообразовании (рис.3).

Спектр возбуждения сорбатов катехинов имеет максимум 298 нм, при комплексообразовании с ионами скандия спектр возбуждения возрастает по интенсивности и сдвигается в длинноволновую область на 72 нм и его максимум составляет 370 нм. Сорбция комплексов Sc(III) на поверхности Sephadex G-75 проходит в области pH от 3 до 5,5 (рис. 4).

Для создания оптимального значения pH применяли ацетатный буферный раствор с pH 4.3. $I_{люм}$ сорбатов увеличивается с увеличением концентрации ионов металла в растворе, из которого ведется сорбция.

Для дальнейших исследований нами выбрана концентрация скандия (III) – $0{,}3 \cdot 10^{-2}$ моль/л, при которой наблюдается максимальная $I_{люм.}$ Исследование кинетики сорбции катехинов из растворов показало, что максимальная $I_{люм.}$ сорбата достигается за 5-10 минут (рис. 5) встряхивания.

При более длительном встряхивании $I_{люм.}$ комплекса на сорбентах остается практически неизменной.

На интенсивность люминесценции сорбатов значительно влияют количество сорбента, температура и время высушивания сорбента. Масса сорбента Sephadex G-75, модифицированного ионами Sc(III), необходимая для полной сорбции катехинов составляет 80 мг.

© С.В. Бельтюкова, А.А.Бычкова

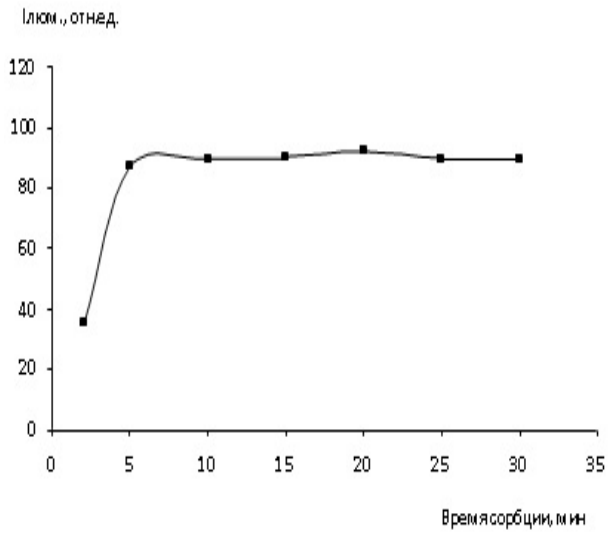


Рис. 5. Зависимость интенсивности люминесценции сорбатов комплексов ионов Sc (III) с катехинами от длительности встряхивания; $C_{катехинов}$ = 0.1 мг/мл

Для достижения оптимальной $I_{люм.}$ сорбатов комплексов достаточно высушивания в течение 110 минут при температуре 95°С (рис.6).

Интенсивность люминесценции сорбатов комплексов не изменяется в течение нескольких месяцев, и остается постоянной в течение 20 минут облучения УФ-светом, что свидетельствует об их фотостабильности. Найдено, что интенсивность люминесценции сорбатов комплексов максимальна при сорбции из водных растворов. Очевидно, введение растворителей различной природы уменьшает набухаемость сефадекса, что влияет на степень сорбции комплекса, уменьшая $I_{люм}$ сорбата.

Поверхностно-активные вещества практически во всех случаях уменьшают интенсивность люминесценции сорбатов.

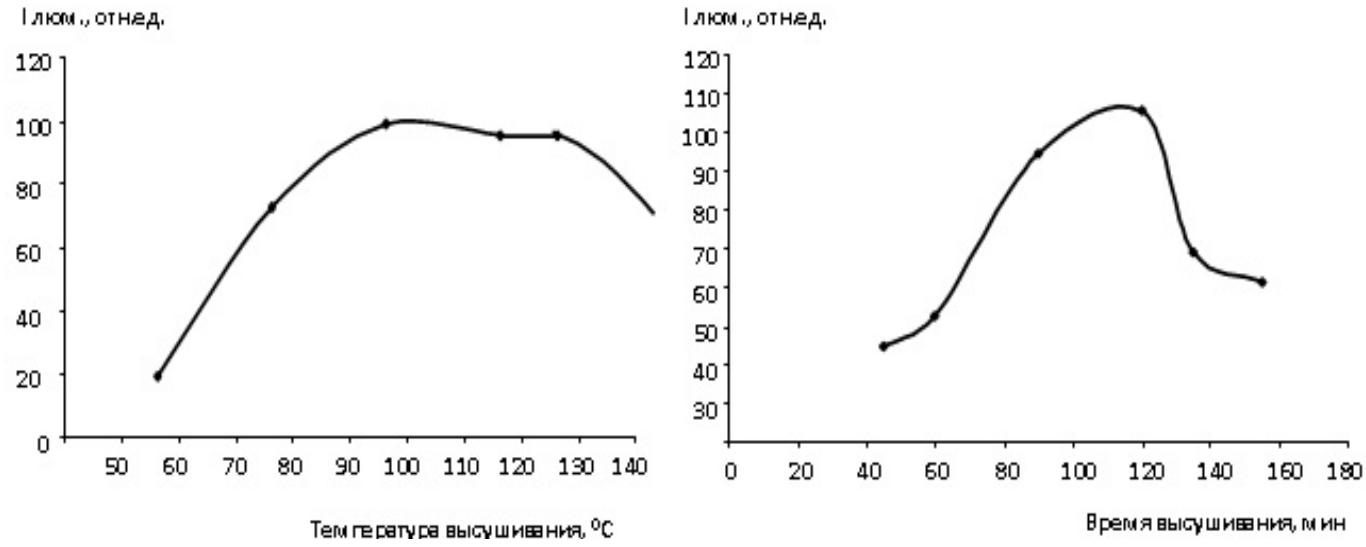


Рис.6. Зависимость $I_{люм.}$ сорбатов комплексов Sc(III) с катехинами от температуры (а) и времени высушивания (б); $C_{катехинов}$ = 0.1 мг/мл

Увеличение $I_{люм.}$ сорбата в 1,5 раза наблюдается лишь при сорбции в присутствии анионного ПАВ – лаурилсульфата натрия. Вероятно, гидрофобный анион лаурилсульфат натрия входит во внутреннюю сферу центрального иона – скандия, вытесняя гидрофильный хорид-ион, что приводит к гидрофобизации и дегидратации комплекса.

Это способствует снижению безызлучательных потерь энергии возбуждения за счет колебаний ОН-связей молекул воды, что и обуславливает более высокую интенсивность люминесценции. Подтверждением этого является тот факт, что максимумы спектров возбуждения и люминесценции (рис. 2) в присутствии лаурилсульфата натрия не смещаются и форма спектров не изменяется.

Уменьшение $I_{люм.}$ сорбатов комплексов, полученных из растворов в присутствии катионных и нейтральных ПАВ может быть связано с солюбилизацией комплексов в растворе и уменьшением за счет этого степени их сорбции. Максимальная интенсивность люминесценции сорбатов комплексов с ионами скандия (III) наблюдается в области концентрации катехинов (0.4-0.6) мг/мл.

Линейная область зависимости интенсивности люминесценции сорбатов комплексов от концентрации катехинов наблюдается в диапазоне концентраций 0.01-0.5 мг/мл. На основании полученных результатов разработана методика сорбционно-люминесцентного определения катехинов в чае.

© С.В. Бельтюкова, А.А.Бычкова

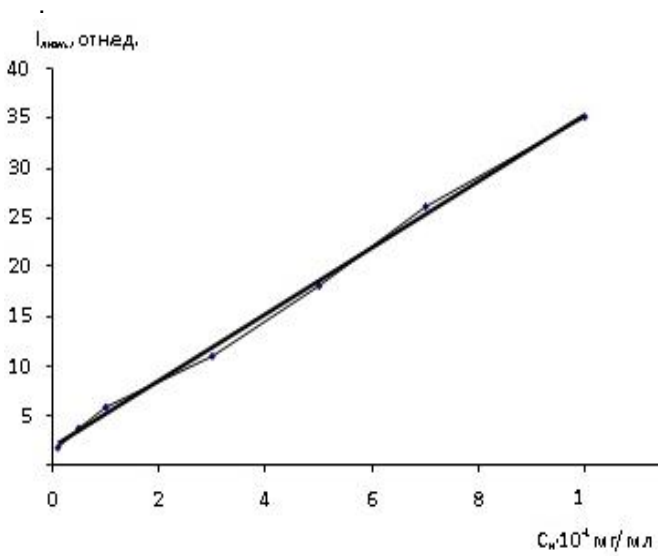


Рис.7. Градуировочный график для определения катехинов

Таблица 1.Результаты определения катехинов в чае, n=5.0; P=0.95

№	Чай (сорт, производитель)	Найдено катехинов, мг/г сухого чая	S_r
1.	Майский черный среднелистовой «Золотые лепестки». Цейлонская коллекция	6.75±0.03	0.04
2.	Майский зеленый крупнолистовой «Китайский дракон». Китайская коллекция	45±1.21	0.02
3.	«Lipton». Yellow label tea. листовой	27.3±1.6	0.05
4.	«Lipton». Orange Jajpur	15±0.77	0.04
5.	«Элегия». Китайский зеленый листовой байховый	52.2±1.8	0.03
6.	«Ahmad Tea». Green Tea	20.7±1.03	0.05
7.	«Хэйлис». крупнолистовой цейлонский черный	36±1.1	0.02
8.	«Принцесса Ява». китайский зеленый байховый	262.5±8.5	0.03

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Навеску 2 г воздушно-сухого сырья (листья чая) переносили в колбу. добавляли 150 мл дистиллированной воды и перемешивали на магнитной мешалке в течение 120 минут при температуре 50 ± 5°С. Полученный экстракт отфильтровывали на фильтре «синяя лента» и удаляли листья чая.

Навеску 100мг Sephadex G-75 помещали в пробирку. добавляли 1 мл водного раствора хлорида скандия (III) ($1\cdot10^{-2}$моль/л). перемешивали в течение 5 минут до гелеобразного состояния.

Затем добавляли 2 мл водного экстракта чая. 0.4 мл лаурилсульфата натрия ($1\cdot10^{-2}$моль/л) и 0.6 мл ацетатного буферного раствора с pH=4.3. доводили общий объем до 5 мл дистиллированной водой и перемешивали в течение 15 минут.

Сорбент отфильтровывали и высушивали в течение 120 минут при 100°С. Затем растирали до порошкообразного состояния и регистрировали интенсивность люминесценции сорбата комплекса при $\lambda_{изл.}$=507нм при возбуждении люминесценции светом ртутной лампы со светофильтром УФС-2 ($\lambda_{возб.}$=365нм).

Количественное определение катехинов проводили по градуировочному графику. который строили по стандартным образцам с различным содержанием катехинов и подготовленным так же. как описано выше (рис.7).

На основе разработанной методики определено содержание катехинов в черных и зеленых чаях различных производителей (табл.1).

Наибольшее содержание катехинов найдено в китайском зеленом байховом чае «Принцесса Ява».

Предложенная методика может быть использована для экспрессной тестовой оценки качества чая.

В этом случае интенсивность люминесценции сорбата сравнивают с эталонными образцами. приготовленными предварительно.

Интенсивность люминесценции таких образцов сохраняется в течение 3-4 месяцев.

ВЫВОДЫ

Разработана методика люминесцентного определения суммы катехинов в чае. основанная на использовании молекулярной твердофазной люминесценции катехинов. усиленной ионами скандия (III). С помощью разработанной методики определено содержание катехинов в различных сортах чая.

Методика выгодно отличается от существующих отсутствием токсичных реагентов. дорогостоящего оснащения. непродолжительным временем анализа. позволяет осуществлять быстрый скрининг различных сортов чая.

ЛИТЕРАТУРА

1. Татарченко И.И. Химия субтропических и пищевкусовых продуктов. Под ред. И.И. Татарченко. И.Г. Мохначев. Г.И. Касьянов. Москва: Академия. 2003. С. 256.

2. Lopez M. Martinez F.. Del Valle C. Analysis of phenolic constituents of biological interest in red wines by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. A. 2001. 922. 359–363.

3. Alonso-Salces R. M.. Guyot. S.. Herrero. C. Chemometric characterization of Basque and French ciders according to their polyphenolic profiles. Anal. Bioanal. Chem. 2004. 379. 464–475.

4. Materska M.. Piacente S.. Stochmal A.. Pizza C.. Oleszek W.. Perucka I. Isolation and structure elucidation of flavonoid and phenolic acid glycosides from pericarp of hot pepper fruit Capsicum annuum L. Phytochemistry. 2003. 63. 893–898.

5. Rodríguez-Delgado M. A.. Malovaná S.. Pérez J. P. Separation of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography with absorbance and fluorimetric detection. J. of Chromatogr. A. 2001. 912(2). 249–257.

6. Palma M.. Pineiro Z.. Barroso C.G. Stability of phenolic compounds during extraction with superheated solvents. J. Chromatogr. A. 2001. 921. 169–174.

7. Weiss D.J.. Anderton C.R. Determination of catechins in matcha green tea by micellar electrokinetic chromatography. J. Chromatogr. A. 2003. 1011. 173–180.

8. Magoma G.N.. Wachira F.N.. Obanda M. The use of catechins as biochemical markers in diversity studies of tea (Camellia sinensis). Genet.Resour. Crop Evol. 2000. 47. 107–114.

9. Tokusoglu O.. Unal M.K. Optimized method for simultaneous determination of catechin. gallic acid. and methylxanthine compounds in chocolate using RP-HPLC. Eur. Food. Res. Technol. 2002. 215. 340–346.

10. Кочетова М.В.. Семенистая Е.Н.. Ларионов О.Г.. Ревина А.А. Определение биологически активных фенолов и полифенолов в различных объектах методами хроматографии. Успехи химии. 2007. 76(1). 89–100.

11. Dalluge J.J.. Nelson B.C. Determination of Tea Catechins. J. Chrom. A. 2000. 881. 411–424.

12. Vovk I.. Simonovska B.. Vuorela H. Separation of eight selected flavan-3-ols on cellulose thin-layer chromatographic plates. J. Chromatogr. 2005. 1077. 188–194.

13. Wollgast J.. Pallaroni L.. Agazzi M.E.. Anklam E. Analysis of procyanidins in chocolate by reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrospray ionisation mass spectrometric and tandem mass spectrometric detection. J. Chromatogr. A. 2001. 926. 211–220.

14. Tits M.. Poukens P.. Angenot L.. Diercksens Y. Thin-layer chromatographic analysis of proanthocyanidins from Ribes nigrum leaves. J. Pharm. Biomed. Anal. 1992. 10. 1097–1100.

15. Vovk I.. Simonovska B.. Vuorela P.. Vuorela H. Optimization of separation of (+)-catechin and (−)-epicatechin on cellulose TLC plates. J. Planar Chromatogr. 2002. 15. 433–436.

16. Лазурьевский Г.В. Практические работы по химии природных соединений. Москва: «Высшая школа». 1966. С. 351.

17. Лурье Ю.Ю. Справочник по аналитической химии. Москва: «Госхимиздат». 1962. С. 288.

18. Воробьева Т.В.. Терлецкая А.В.. Кущевская Н.Ф. Стандартные и унифицированные методы определения фенолов в природных и питьевых водах и основные направления их совершенствования. Аналит. химия воды. 2007. 29(4). 370–390.

© С.В. Бельтюкова, А.А.Бычкова