

Agnieszka Stańczyk, Anna Wędzisz

ROZDZIAŁ GARBNIKÓW KATECHOLOWYCH RÓŻNYCH GATUNKÓW ZIELONYCH I CZARNYCH HERBAT ZA POMOCĄ CHROMATOGRAFII KOLUMNOWEJ*)

Zakład Bromatologii Katedry Toksykologii i Bromatologii
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
Kierownik: prof. dr hab. *A. Wędzisz*

W pracy wyodrębniono i zidentyfikowano garbniki katecholowe z zielonej i czarnej herbaty za pomocą chromatografii kolumnowej oraz na żelu Sephadex LH-20 z metanolem jako fazą ruchomą. Otrzymane frakcje analizowano za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC) na żelu krzemionkowym.

Hasła kluczowe: zielona i czarna herbata, garbniki katecholowe, chromatografia kolumnowa.

Key words: green and black tea, catechol tannins, column chromatography.

Wyodrębnianie garbników zarówno w stanie czystym, z uwagi na ich małą zdolność do krystalizacji i ich właściwości związków wielkocząsteczkowych, jak i ustalenie budowy jest zadaniem trudnym. Większość poznanych garbników nie została otrzymana w stanie jednorodnym i w nielicznych tylko przypadkach poznano dokładnie ich budowę chemiczną (1). Garbniki są od dawna znanymi, bezazotowymi substancjami roślinnymi, posiadającymi zdolność „garbowania” surowej skóry zwierzęcej, która nie przepuszcza wody i jest oporna na działanie czynników chemicznych i mechanicznych. Jest to możliwe dzięki specyficznym właściwościom fizykochemicznym tej grupy związków, które posiadają zdolność tworzenia trwałych połączeń z białkami i włóknami kolagenowymi surowej skóry (2, 3). Ze względu na niezwykle bogactwo substancji biologicznie czynnych w herbacie ma ona korzystny wpływ na organizm człowieka (4). W składzie chemicznym liści herbaty stwierdzono ok. 300 różnych związków (5). Świeże liście zawierają średnio (przeliczając na suchą masę) 36% polifenoli, 25% węglowodanów, 15% białek, 6,5% ligniny, 5% popiołu, 4% aminokwasów, 2% tłuszczu, 1,5% kwasów organicznych, 0,5% chlorofilu, a także karotenoidy i substancje lotne, których zawartość jest mniejsza niż 0,1% (6, 7). Liście herbaty zawierają znaczne ilości garbników katechinowych (5). Ogólną właściwością garbników jest działanie ściągające, koagulujące białko. Na powierzchni błon śluzowych oraz tkanki łącznej wytwarzają powłokę skoagulowanego białka (2). W związku z tym są one używane zewnętrznie jako środki przeciwzapalne, przeciwbakteryjne, działają ściągająco, przeciwwysiękowo, hamują drobne krwawienia (8).

*) Praca wykonana w ramach badań własnych (502-13-787). W badaniach uczestniczyły *W. Warzecha* i *I. Stępień*.

Ze względu na obecność garbników, herbata ma działanie przeciwbiegunkowe (9). Do tego celu stosowane są głównie garbniki skondensowane, ponieważ garbniki hydrolizujące w przewodzie pokarmowym ulegają rozkładowi do nieczynnych połączeń (10). Ponadto, działa również bakteriobójczo i bakteriostatycznie. Napar z liści herbaty jest wykorzystywany w zatruciach pokarmowych o etiologii bakteryjnej (11, 12). Znajdują także zastosowanie w nieżytych błon śluzowych żołądka i jelit, a także jako odtrutka w zatruciach metalami ciężkimi oraz alkaloidami, tworząc z nimi połączenia kompleksowe. Badania farmakologiczne wykazały także działanie przeciwdrobnoustrojowe, przeciwalergiczne, immunostymulujące, przeciwmurawienne oraz przeciwwirusowe, także w stosunku do wirusa HIV, a także zapobiegające powstawaniu ubytków próchnicznych w zębach (13).

MATERIAŁ I METODY

Materiałem badanym były herbaty zielone i czarne:

- Herbata zielona liściasta „Posti”
- Herbata zielona liściasta „Sir Roger” Sp. z o.o.
- Oryginalna chińska herbata zielona liściasta „Koko’s”
- Herbata czarna liściasta „Madras”
- Herbata czarna liściasta „Brooke Bond”
- Herbata czarna liściasta „Yunnan”.

Ekstrakcja surowców. Ekstrakcję surowców przeprowadzano za pomocą metody opisanej przez *Jerznanowską* (1).

Chromatografia kolumnowa. Otrzymywany w wyniku ekstrakcji żywicowaty proszek rozpuszczano w 2 cm³ metanolu i w takiej postaci наносono na kolumnę chromatograficzną (2,5 × 60 cm) wypełnioną żelem Sephadex LH-20 firmy Pharmacia Fine Chemicals przemytą metanolem. Jako fazę ruchomą zastosowano metanol. Zbierano frakcje obj. 6 cm³ za pomocą kolektora frakcji (Spectra Chrom CF-) (14). Chromatografię prowadzono techniką elucji, w której składniki próbki wędrowały w dół kolumny z różnymi prędkościami (wynikającymi z różnego oddziaływania w kolumnie) (15). Uzyskany profil chromatograficzny pozwolił połączyć zebrane eluaty w frakcje zbiorcze, które zagęszczano do sucha za pomocą wyparki rotacyjnej typu Büchi Rotavapor R-114. Następnie suchą pozostałość rozpuszczano w 2 cm³ metanolu (14).

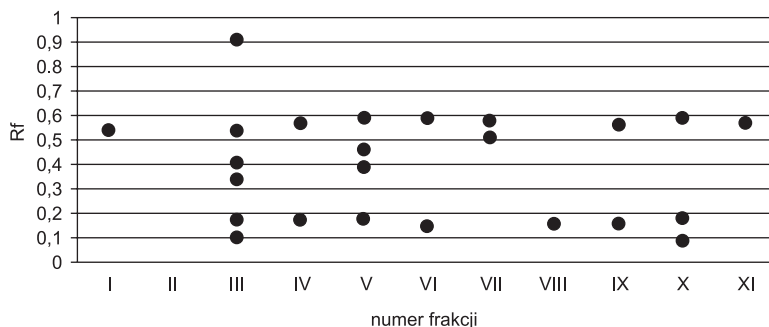
Chromatografia cienkowarstwowa (TLC). W chromatografii wykorzystano różnice w zdolności do dyfundowania składników mieszaniny do cząsteczek żelu, a więc różnice w wielkości cząsteczek (16). Za pomocą mikropipety pobierano po 50 mm³ każdej frakcji i наносono na płytki chromatograficzne pokryte żelem krzemionkowym. Równocześnie z próbkami badanymi na płytki наносono roztwory wzorcowe katechiny i pirogalolu. Tak przygotowane płytki umieszczano w komorze chromatograficznej. Chromatogramy rozwijano za pomocą układu polarnego: *n*-butanol – woda – kwas octowy (3:1:1; v/v/v). Po wcześniejszym wysuszeniu chromatogramy analizowano w świetle UV przy dł. 280 nm. Następnie obliczano współczynnik R_f (dla substancji wzorcowych i analizowanych frakcji garbników katecholowych).

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Zastosowana w pracy chromatografia kolumnowa pozwoliła wydzielić z surowych ekstraktów:

- osiem frakcji herbaty „Posti”
- osiem frakcji herbaty „Sir Roger”
- jedenaście frakcji herbaty „Koko’s”
- dziesięć frakcji herbaty „Madras”
- dziesięć frakcji herbaty „Brooke Bond”
- dziewięć frakcji herbaty „Yunnan”

Zastosowanie polarnego układu rozwijającego (*n*-butanol – woda – kwas octowy) pozwoliło uzyskać na chromatogramie znaczną liczbę plamek. Zarówno w herbatach zielonych, jak i czarnych zaobserwowano niską zawartość garbników katecholowych w pierwszych frakcjach (najmniejsza liczba plamek). W środkowych frakcjach liczba plamek gwałtownie rosła, a następnie stopniowo malała. Przykładowy chromatogram przedstawiono na ryc. 1.



1 – wzorcowy roztwór pirogalolu; 2 – wzorcowy roztwór katechiny; I–VIII – poszczególne frakcje.

Ryc. 1. Rozdział poszczególnych frakcji metodą chromatografii cienkowarstwowej (TLC) dla herbaty zielonej „Sir Roger”.

Fig 1. Separation of individual fractions by thin-layer chromatography (TLC) for Sir Roger green tea.

Po obliczeniu wartości Rf dla roztworów wzorcowych katechiny (0,90) i pirogalolu (0,83) i prób badanych wnioskowano o obecności garbników katecholowych:

- herbata „Posti”: frakcja II, III, V pirogalol;
- herbata „Sir Roger”: frakcja I i VII katechyna; frakcja V pirogalol;
- herbata „Koko’s”: frakcja III katechyna;
- herbata „Madras”: frakcja I–IX katechyna; frakcja V, VI, VIII pirogalol;
- herbata „Brooke Bond”: frakcja I–X katechyna; frakcja VI, VIII, IX pirogalol;
- herbata „Yunnan”: frakcja I–IX katechyna; frakcja III–VIII pirogalol.

A. Stańczyk, A. Wędzisz

SEPARATION OF CATECHOLIC TANNINS EXTRACTED FROM VARIOUS GRADES OF GREEN AND BLACK TEA BY COLUMN CHROMATOGRAPHY

Summary

Catecholic tannins of green and black tea grades were isolated and separated. Crude extract was separated into fractions by column chromatography. The first fractions were noted to contain small concentrations of catecholic tannins, both for black and green tea grades. The use of polar n-butanol/water/acetic acid system (3:1:1; v/v/v) resulted in a considerable number of dots on the chromatogram, indicative of catecholic tannins present in the solution.

PIŚMIENNICTWO

1. *Jerzmanowska Z.*: Substancje roślinne: metody wyodrębniania. T. 2 PWN, Warszawa 1970; 43-62.
- 2. *Kohlmünzer S.*: Farmakognozja. Podręcznik dla studentów farmacji. PZWL, Warszawa, 2007; 232: 238-253. – 3. *Królikowska M.*: Analiza fitochemiczna roślinnych surowców leczniczych. Praca zbiorowa AM, Łódź, 1988; 138-157. – 4. *Urbanik M.*: Herbata lek i żywka. Farm. Pol. 2000; 56(24): 1153-1157. – 5. *Procyk A.*: O herbacie prawie wszystko. Wiadomości Zielarskie. 1991; 11: 11-13. – 6. *Ostrowska J.*: Herbaty – naturalne źródło antyoksydantów. Gazeta Farmaceutyczna 2008; 1: 46-50. – 7. *Ostrowska J., Łuczaj W., Skrzydlewska W.*: Porównanie właściwości antyoksydacyjnych czarnej i zielonej herbaty. Bromat. Chem. Toksykol., 2005; 38(3): 211-221. – 8. *Lamer-Zarawska E., Olechnowicz-Stepień W.*: Roślinne substancje czynne ważne dla zdrowia i urody. Cz. VI. Garbniki. Wiadomości Zielarskie. 1992; 8: 15-16. – 9. *Mataławska I.*: Herbata, herbatki, ziółka. Panacea, 2005; 10: 20-21. – 10. *Lamer-Zarawska E., Kowal-Gierczak B., Niedworok J., Błach-Olszewska Z.*: Fitoterapia i leki roślinne. PZWL, Warszawa 2007; 72-76.
11. *Cichoń Z., Wierciak E.*: Towaroznawcza charakterystyka herbaty. WAE, Kraków, 2005; 5-28. – 12. *Ożarowski A., Jaroniewski W.*: Rośliny lecznicze i praktyczne zastosowanie. Instytut Wydawniczy Związków Zawodowych, Warszawa, 1987; 172-173. – 13. Encyklopedia zielarska i ziołolecznictwa pod red. *H. Strzeleckiej i J. Kowalskiego*. PWN, Warszawa, 2000. – 14. *Karamać M., Amarowicz R.*: Aktywność przeciwutleniająca frakcji związków fenolowych z nasion soi. Bromat. Chem. Toksykol., 2002; 35(2): 99-105. – 15. Praca zbiorowa pod red. *Kirklanda J.J.*: Współczesna chromatografia cieczowa. PWN, Warszawa, 1976: 123-137. – 16. *Lipiec T., Szmal Z.*: Chemia analityczna. Podręcznik dla studentów farmacji. PZWL, Warszawa, 1980: 561-564.

Adres: 90-151 Łódź, ul. Muszyńskiego 1.