

MAGDALENA MIKA, AGNIESZKA WIKIERA, KRZYSZTOF ŻYŁA

WPLYW CZASU I TEMPERATURY EKSTRAKCJI NA ZAWARTOŚĆ KATECHIN W WODNYCH EKSTRAKTACH HERBATY BIAŁEJ

Streszczenie

Herbata niefermentowana jest źródłem flawan-3-oli, które wykazują właściwości przeciwutleniające. W ostatnich latach wykazano, że katechiny zawierające w cząsteczce resztę kwasu galusowego mogą zmniejszać absorpcję jelitową cholesterolu i lipidów z pokarmu. Zróżnicowana efektywność działania galusanów katechin wynika z ich stereoizomerii. Najskuteczniej eliminują cholesterol z miceli kwasów żółciowych galusany katechin należące do (-) form (2S, 3R). Wysoka temperatura powoduje epimeryzację flawon-3-oli i wzrost ilości (-) form (2S, 3R). W pracy zbadano wpływ temperatury i czasu ekstrakcji suchych liści herbaty białej na sumaryczną ilość flawan-3-oli, procentowy udział frakcji (-) form (2S, 3R) i procentowy udział katechin zawierających w cząsteczce resztę kwasu galusowego. Wykazano, że poprzez zmianę warunków ekstrakcji można modelować skład otrzymywanych preparatów katechinowych.

Słowa kluczowe: flawan-3-ole, ekstrakcja, herbata biała, galusany katechin

Wstęp

Liście herbaty zawierają dużo polifenoli (do 36 % s.m.) i metyloksantyn (do 9,5 % s.m.). Główną grupą polifenoli liści herbaty są flawan-3-ole (katechiny), które stanowią między 20 – 30 % s.m. liści. Ze względu na stereoizomerię naturalnie występujące katechiny dzieli się na dwie grupy: (-) epi-formy (2R, 3R) i (-) formy (2S, 3R) [17]. (-) Epi-formy (2S, 3R) stanowią około 90 % naturalnie występujących w liściach herbaty katechin. Większość flawan-3-oli herbaty to estry kwasu galusowego. Główną katechiną występującą w liściach herbaty niefermentowanej jest galusan epigalokatechiny (EGCG), stanowi on od 5 do 18 % s.m. liści. Zawartość pozostałych katechin w suchej masie liści wynosi 0,1 – 1,2 % epigalokatechiny (EGC), 1 – 5 % galusanu epikatechiny (ECG), 0,2 – 1,2 % epikatechiny (EC), 0,2 – 1,5 % galusanu galokatechiny (GCG), poniżej 0,1 % katechiny (C) [10]. Sumaryczna ilość flawan-3-oli oraz ich wzajemne proporcje w liściu świeżej herbaty zależą od okresu zbioru [11], wieku liści

[8] i warunków uprawy [18]. Na ilość uwolnionych do ekstraktu katechin oczwisty wpływ mają warunki przygotowania roztworów: rodzaj rozpuszczalnika [14, 16] stosunek masy herbaty do ilości rozpuszczalnika, stopień rozdrobnienia liści, czyli powierzchnia kontaktu herbata-rozpuszczalnik [15], czas i temperatura ekstrakcji. Flawan-3-ole herbaty ze względu na właściwości przeciwutleniające [5, 13] znalazły zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym, kosmetycznym i spożywczym [19]. W ostatnich latach wykazano, że galusany katechin mogą ograniczać absorpcję jelitową cholesterolu [2, 3] i produktów hydrolizy lipidów [1, 4, 7]. Najskuteczniej eliminują cholesterol z miceli kwasów żółciowych galusany katechin należące do (-) form (2S, 3R) [3]. Preparaty katechinowe bogate w galusany katechin należące do (-) form (2S, 3R) mogłyby znaleźć zastosowanie w przemyśle spożywczym jako stabilizatory żywności wysokotłuszczowej bogatej w cholesterol.

Celem pracy było określenie wpływu warunków ekstrakcji wodnej liści herbaty białej na ilość i procentowy udział poszczególnych frakcji flawan-3-oli.

Materialy i metody badań

Do badań zastosowano białą herbatę liściastą zakupioną w lokalnym sklepie z herbatami. Została ona wybrana spośród pięciu herbat niefermentowanych. Jako kryterium wyboru przyjęto skuteczność w ograniczaniu dostępności lipidów w procesie trawienia *in vitro* [12]. Ekstrakty wodne herbaty sporządzano poprzez odważenie $0,3 \pm 0,0001$ g suchych, rozdrobnionych liści i dodanie 15 ml wody redestylowanej o temperaturze: 40, 60, 70, 80 i 100°C i w każdej z nich prowadzono ekstrakcję przez 2, 5, 15, 30, 60 i 120 min przy stałym wytrząsaniu. Uzyskane próbki sączono przez twardą bibułę filtracyjną. Otrzymane ekstrakty płukano gazowym azotem i przechowywano w temp. -20 °C.

Oznaczanie zawartości katechin w ekstraktach herbaty wykonywano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej opisaną przez Lin i wsp. [10]. Do oznaczeń użyto chromatografu cieczowego (Biorad Lab., Herkules, CA. USA), detektor spektrofotometryczny $\lambda=280$ nm; kolumnę LUNA C18(2) (250x4,6 mm). Wzorce flawan-3-oli oraz napary herbat przed analizą przesączano przez filtry o średnicy porów 0,45 μ m. Stosowano przepływ fazy ruchomej równy 1 ml/min i elucję gradientową (0 - 10 min – 100 % fazy A - elucja izokratyczna; 10 - 25 min – 100 % \rightarrow 90 % fazy A, 0 % \rightarrow 10 % fazy B - gradient liniowy; 25 - 60 min – 90 % \rightarrow 70 % fazy A, 10 % \rightarrow 30 % fazy B - gradient liniowy). Jako fazę A zastosowano metanol/kwas mrówkowy/wodę redestylowaną (20:0,3:79,7 v/v/v), a jako fazę B zastosowano metanol/kwas mrówkowy (99,7:0,3 v/v).

Do porównania ilości oznaczonych związków zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA. Istotność różnic pomiędzy wartościami średnimi weryfikowano testem LSD Fishera przy poziomie istotności $p < 0,05$.

Wyniki i dyskusja

Ilości uwolnionych do roztworu katechin:(-)-galusanu epigalokatechiny EGCG, (-)-galusanu epikatechiny ECG, (-)-epikatechiny EC, (-)-galusanu galokatechiny GCG, (-)-galusanu katechiny CG i (-)-katechiny C przedstawiono w tab. 1. Ekstrakcję prowadzono w warunkach beztlenowych, w celu wyeliminowania procesów oksydacyjnych i polimeryzacyjnych katechin, które mogłyby powodować spadek sumarycznej ilości polifenoli [8, 9,14]. Zawartość oznaczonych związków i ich wzajemne proporcje były zależne od warunków przygotowania ekstraktów. Maksymalną sumaryczną zawartość katechin w roztworze oznaczono po 2-godzinnej ekstrakcji w temp. 100 °C, wynosiła ona 24,88 % s.m. liści. Natomiast najmniejszą ilość flawan-3-oli oznaczono w ekstraktach przygotowanych w temperaturze 20 °C. Ilość uwolnionych katechin w tej temperaturze, w zależności od czasu ekstrakcji, mieściła się w zakresie od 3,49 do 8,15 % s.m. liści. Na rys. 1A przedstawiono wpływ temperatury i czasu ekstrakcji na sumaryczną ilość flawan-3-oli.

Tabela 1

Ilość flawan-3-oli (EGCG, ECG, EC, GCG, CG, C) uwolniona z liści herbaty do ekstraktów przygotowanych w różnych warunkach [% s.m. liści].

Amounts of flavan-3-ols (EGCG, ECG, EC, GCG, CG, C) released from tea leaves into extracts prepared under different conditions [% d.m. of leaves].

Temperatura [°C] Temperature[°C]	Czas[min] Time[min]	EGCG	ECG	EC	GCG	CG	C
20	2	1,94 ^a	0,89 ^a	0,30 ^a	0,18 ^a	0,01 ^a	0,17 ^a
	5	2,36 ^{ab}	1,01 ^a	0,38 ^b	0,23 ^{ab}	0,00 ^a	0,24 ^b
	15	2,61 ^{bc}	1,16 ^a	0,48 ^{de}	0,35 ^{bcd}	0,01 ^a	0,29 ^{bc}
	30	2,96 ^c	1,25 ^{ab}	0,51 ^{ef}	0,39 ^{cde}	0,01 ^a	0,33 ^{cde}
	60	4,47 ^e	1,83 ^{cd}	0,56 ^f	0,51 ^{efgh}	0,01 ^a	0,45 ^f
	120	4,56 ^e	1,86 ^{cd}	0,68 ^{hij}	0,60 ^{ghij}	0,01 ^a	0,44 ^f
40	2	3,02 ^c	1,64 ^{bc}	0,39 ^b	0,29 ^{abc}	0,00 ^a	0,26 ^b
	5	3,87 ^d	1,86 ^{cd}	0,42 ^{bc}	0,35 ^{bcd}	0,01 ^a	0,36 ^{de}
	15	5,55 ^{fg}	2,40 ^{ef}	0,71 ^{ijk}	0,48 ^{defg}	0,01 ^a	0,44 ^f
	30	5,58 ^{fg}	2,42 ^{ef}	0,80 ⁿ	0,53 ^{efgh}	0,01 ^a	0,48 ^{fgh}
	60	5,82 ^{gh}	2,52 ^{fg}	0,86 ^o	0,60 ^{ghij}	0,01 ^a	0,51 ^{gh}
	120	6,89 ⁱ	2,69 ^{fg}	0,96 ^s	0,62 ^{ghij}	0,01 ^a	0,57 ^{ij}
60	2	5,66 ^{fg}	1,77 ^{cd}	0,43 ^{bcd}	0,32 ^{abc}	0,01 ^a	0,32 ^{cd}
	5	6,17 ^h	2,78 ^{fg}	0,54 ^f	0,42 ^{cdef}	0,01 ^a	0,38 ^e
	15	7,49 ^j	3,42 ^h	0,77 ^{lmn}	0,57 ^{fghi}	0,02 ^{ab}	0,47 ^{fg}
	30	7,79 ^j	3,98 ^{ij}	0,78 ^{mn}	0,59 ^{ghij}	0,03 ^{abc}	0,53 ^{hi}
	60	9,69 ^k	4,41 ^{klm}	0,96 st	0,71 ^j	0,02 ^{ab}	0,60 ^j
	120	9,71 ^k	4,47 ^{lm}	0,99 ^t	0,74 ^{jk}	0,03 ^{abc}	0,60 ^j

c.d. Tab. 1

70	2	5,31 ^f	2,09 ^{de}	0,47 ^{cde}	0,33 ^{abc}	0,02 ^{ab}	0,32 ^{cd}
	5	6,17 ^h	2,88 ^g	0,65 ^{gh}	0,44 ^{cdef}	0,02 ^{ab}	0,38 ^e
	15	9,69 ^k	4,04 ^{ijk}	0,86 ^o	0,68 ^{ij}	0,03 ^{abc}	0,53 ^{hi}
	30	10,22 ^l	4,41 ^{klm}	0,96 st	0,75 ^{jk}	0,05 ^{bcd}	0,60 ^j
	60	10,80 ^{mn}	4,95 ^{no}	0,95 ^{rst}	0,87 ^{kl}	0,06 ^{cde}	0,71 ^{kl}
	120	10,52 ^{lm}	4,85 ^{no}	0,93 ^{prs}	0,98 ^{lm}	0,08 ^{ef}	0,77 ^m
80	2	5,27 ^f	2,78 ^{fg}	0,62 ^g	0,42 ^{cdef}	0,07 ^{de}	0,36 ^{de}
	5	7,89 ^j	3,89 ^{ij}	0,75 ^{klm}	0,56 ^{fgh}	0,09 ^{efg}	0,47 ^{fg}
	15	9,44 ^k	4,28 ^{jkl}	0,87 ^o	0,74 ^{jk}	0,11 ^{fg}	0,51 ^{gh}
	30	11,36 ⁿ	5,04 ^o	0,99 ^t	1,05 ^m	0,15 ^h	0,71 ^{kl}
	60	10,91 ^{mn}	4,73 ^{mno}	0,86 ^o	1,43 ⁿ	0,31 ^k	0,75 ^{lm}
	120	9,24 ^k	4,47 ^{lm}	0,90 ^{opr}	1,80 ^o	0,42 ^l	1,08 ^o
100	2	5,27 ^f	2,63 ^{fg}	0,66 ^{ghi}	0,50 ^{defg}	0,12 ^{gh}	0,38 ^e
	5	7,89 ^j	3,63 ^{hi}	0,72 ^{jkl}	0,66 ^{hij}	0,21 ⁱ	0,44 ^f
	15	9,44 ^k	4,46 ^{lm}	0,74 ^{klmn}	1,02 ^l	0,27 ^j	0,66 ^k
	30	11,16 ⁿ	4,61 ^{lmn}	0,75 ^{klmn}	2,15 ^p	0,34 ^k	0,89 ⁿ
	60	10,91 ^{mn}	5,06 ^o	0,80 ⁿ	3,87 ^r	0,67 ^m	1,20 ^p
	120	9,24 ^k	5,63 ^p	0,89 ^{op}	6,41 ^s	0,98 ⁿ	1,73 ^r

Objaśnienia: / Explanatory notes:

Różne litery superskryptu oznaczają różnice statystycznie istotne między wartościami średnimi.

Different superscript letters express statistically significant differences among mean values.

Największy procentowy udział flawan-3-oli we wszystkich ekstraktach stanowił (-)-galusan epigalokatechiny. Udział tej głównej katechiny w całkowitej ilości flawan-3-oli, uwolnionych do roztworu, wynosił od 37 do 60 %. Drugą co do ilości katechiną był (-)-galusan epikatechiny, którego procentowy udział zawierał się w zakresie od 22 do 29 %.

Wyjątek stanowił ekstrakt otrzymany po 2-godzinnej inkubacji w temp. 100 °C, w którym drugą co do ilości katechiną był (-)-galusan katechiny, którego udział stanowił 26 % wszystkich flawan-3-oli. W pozostałych roztworach udział (-)-galusanu katechiny mieścił się w przedziale od 4 do 17 %. Wzrost procentowej zawartości flawan-3-oli, należących do (-) form (2S, 3R): (-)-galusanu katechiny i (-)-katechiny, w ekstraktach przygotowanych w wysokiej temperaturze wynikał z procesu epimerizacji [6, 17].

Ważnym parametrem opisującym preparaty katechinowe jest procentowy udział (-) form (2S, 3R) (rys. 1 B). W temperaturze ekstrakcji 20 °C procentowy udział (-) form (2S, 3R) zawierał się w przedziale od 10,3 do 13,4 %. Ze wzrostem temperatury obserwowano zmniejszenie udziału tej frakcji. Najmniejszy procentowy udział (-) form (2S, 3R) wynoszący od 7 do 10 % oznaczono w ekstraktach przygotowanych w temperaturze 60 i 70 °C. W ekstraktach przygotowanych w temperaturze z przedziału 20 –

70 °C nie obserwowano wpływu czasu inkubacji na procentowy udział poszczególnych stereoizomerów. Wzrost temperatury do 80 °C zwłaszcza przy dłuższym czasie inkubacji wpływał istotnie na przyrost udziału (-) form (2S, 3R). Zaobserwowano, że proces epimeryzacji katechin zachodził już przy 15-minutowej inkubacji w temp. 80 °C. Maksymalną zawartość (-) form (2S, 3R) wynoszącą 36,7 % oznaczono w ekstraktach przygotowanych po 2-godzinnej ekstrakcji w temp. 100 °C. Wang wykazał, że w obecności jonów metali proces epimeryzacji może zachodzić już w temp. 40 °C, jednak obecność jonów katalizowała także procesy utlenienia i polimeryzacji flawan-3-oli [17].

Zanalizowano również wpływ parametrów ekstrakcji na procentowy udział wolnych katechin (katechin niezawierających w cząsteczce reszty kwasu galusowego) (rys. 1 C). Wolne katechiny (EC i C) stanowiły od 8 do 16 % wszystkich flawan-3-oli. Odznaczają się one najmniejszymi masami spośród flawan-3-oli, dlatego w niskiej temperaturze były łatwiej uwalniane z liści herbaty. W ekstraktach przygotowanych w temp. 20 °C procentowy udział flawan-3-oli niezawierających w cząsteczce reszty kwasu galusowego był największy (do 16 %). Natomiast najmniejszym procentowym udziałem wolnych katechin (8 – 9 %) charakteryzowały się ekstrakty przygotowane w wysokiej temperaturze (80 – 100 °C) i w krótkim czasie (2 – 60 min). Wydłużenie czasu ekstrakcji do 120 min powodowało zwiększenie procentowego udziału wolnych katechin do 11 %, czyli największy procentowy udział galusanów katechin był w roztworach przygotowanych przez traktowanie liści herbaty wodą o temp. powyżej 80 °C przez maksymalnie 60 min.

Zmniejszenie procentowego udziału galusanów katechin przy długim czasie ekstrakcji wynikał z procesu ich hydrolizy do wolnych katechin i kwasu galusowego. Ito i wsp. [6] wykazali, że na hydrolizę związków mających w swojej strukturze kwas galusowy wpływa głównie czas przechowywania roztworów galusanów katechin, natomiast działanie wysoką temperaturą nie powodowało istotnych zmian.

Wnioski

1. Wzrost temperatury i wydłużenie czasu wodnej ekstrakcji herbaty białej powodowały wzrost ilości uwalnianych do roztworu flawan-3-oli. Największą sumaryczną zawartość katechin oznaczono w roztworze przygotowanym po 2-godzinnej ekstrakcji w temperaturze 100 °C.
2. Najwyższy procentowy udział stereoizomerów należących do (-) form (2S, 3R) oznaczono w roztworze przygotowanym po 2-godzinnej ekstrakcji w temperaturze 100 °C. Udział ten stanowił 36,7 % wszystkich flawan-3-oli.
3. Proces epimeryzacji katechin zachodził już przy 15-minutowej inkubacji w temp. 80 °C. W niższych temperaturach proces epimeryzacji nie zachodził.

4. Procentowy udział katechin zawierających w cząsteczce resztę kwasu galusowego był najwyższy w roztworach przygotowanych przez traktowanie liści herbaty wodą o temp. powyżej 80 °C przez maksymalnie 60 min.

Literatura

- [1] He Q, Lv Y, Yao K.: Effects of tea polyphenols on the activities of α -amylase, pepsin, trypsin and lipase. *Food Chem.*, 2007, **101**, 1178-1182.
- [2] Ikeda I., Imasato Y., Sasaki E., Nakayama M., Nagao H., Takeo T., Yayabe F., Sugano M.: Tea catechins decrease micellar solubility and intestinal absorption of cholesterol in rats. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1992, **1127**, 141-146.
- [3] Ikeda I., Kobayashi M., Hamada T., Tsuda K., Goto H., Imaizumi K., Nozawa A., Sugimoto A., Kakuda T.: Heat-epimerized tea catechins rich in gallocatechin gallate and catechin gallate are more effective to inhibit cholesterol absorption than tea catechins rich in epigallocatechin gallate and epicatechin gallate. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, **51**, 7303-7307.
- [4] Ikeda I., Tsuda K., Suzuki Y., Kobayashi M., Unno T., Tomoyori H., Goto H., Kawata Y., Imaizumi K., Nozawa A., Kakuda T.: Tea catechins with gallolyl moiety suppress postprandial hypertriglycerolemia by delaying lymphatic transport of dietary fat in rats. *J. Nutr.*, 2005, **135**, 155-159.
- [5] Ishikawa T., Suzukawa M., Ito T., Yoshida H., Ayaori M., Nishiwaki M., Yonemura A., Hara Y., Nakamura H.: Effect of tea flavonoid supplementation on the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidative modification. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1997, **66**, 261-266.
- [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] Kajimoto O., Yabune M., Nakamura T., Kotani K., Suzuki Y., Nozawa A., Nagata K., Unno T.: Tea catechins with gallolyl moiety reduce body weight and fat. *J. Health Sci.*, 2005, **51** (2), 161-171.
- [8] Khokhar S., Magnusdottir S. G. M.: Total phenol, catechin, and caffeine contents of teas commonly consumed in the United Kingdom. *J. Agric. Food Chem.*, 2002, **50**, 565-570.
- [9] Komatsu Y., Suematsu S., Hisanobu Y., Saigo H., Madsuda R., Hara K.: Effects of pH and temperature on reaction kinetics of catechins in green tea infusion. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1993, **57**, 907-910.
- [10] Lin J.-K., Lin Ch., Liang Y., Shiau S., Juan I.: Survey of catechins, gallic acid and methylxanthines in green, oolong, pu-erh and black teas. *J. Agric. Food Chem.*, 1998, **46** (9), 3635-3642.
- [11] Lin Y., Juan I., Chen Y., Liang Y., Lin J.: Composition of polyphenols in fresh tea leaves and associations of their oxygen-radical-absorbing capacity with antiproliferative actions in fibroblast cells. *J. Agric. Food Chem.*, 1996, **44**, 1387-1394.
- [12] Mika M., Wikiera A., Żyła K.: Effects of non-fermented tea extracts on *in vitro* digestive hydrolysis of lipids and on cholesterol precipitation. *Eur. Food Res. Technol.*, 2008, **226** (4), 731-736.
- [13] Miura Y., Chiba T., Miura S., Tomita I., Umegaki K., Ikeda M., Tomita T.: Green tea polyphenols (flavan-3-ols) prevent oxidative modification of low density lipoproteins : an *ex vivo* study in humans. *J. Nutr. Biochem.*, 2000, **11**, 216-222.
- [14] Perva-Uzunalić A., Škerget M., Knez Ž., 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.
- [15] Peterson J., Dwyer J., Bhagwat S., Haytowitz D., Hlden J., Eldridge A. L., Beecher G., Aladesanmi J.: Major flavonoids in dry tea. *J. Food Comp. Anal.*, 2005, **18**, 487-501.

- [16] Row K., H., Jin Y.: Recovery of compounds from Korean tea by solvent extraction. *Biores. Technol.*, 2006, **97**, 790-793.
- [17] Wang H., Helliwell K.: Epimerisation of catechins in green tea infusions. *Food Chem.*, 2000, **70**, 337-344.
- [18] Wierzejewska, R., Jarosz, M.: Związki polifenolowe w herbacie i ich znaczenie zdrowotne. *Żyw. Człow. Metab.*, 2004, **3**, 274-280.
- [19] Yilmaz Y.: Novel uses of catechins in foods. *Trends Food Sci. Technol.*, 2006, **17**, 64-71.

EFFECT OF EXTRACTION TIME AND TEMPERATURE ON THE CONTENT OF CATECHINS IN WHITE TEA WATER EXTRACTS

S u m m a r y

Non-fermented tea is a rich source of flavan-3-ols that have antioxidative properties. Recently, it has been proved that catechins containing gallic acid radical in their molecule are able to reduce intestinal absorbance of cholesterol and lipids from foods. The varying efficiency of the activity of catechin gallates is a consequence of their stereochemical structure. Catechin gallates, which belong to the (-) forms (2S, 3R) eliminate cholesterol from the micelles formed by bile acids in the most effective way. High temperature causes the epimerization of flavan-3-ols and the increase in the amounts of the (-) forms (2S, 3R). In this paper, the effect of temperature and time of extraction of dried white tea leaves was investigated on the total amount of flavan-3-ol, on the percent share of the (-) fraction of the forms (2S, 3R), and the percent share of catechins containing gallic acid radical in their molecule. It was showed that the composition of catechin preparations could be moulded by changing the conditions of tea extraction.

Key words: flavan-3-ols, extraction, white tea, catechin gallates ☒