

# Przemiany substancji biologicznie aktywnych w trakcie analizy chromatograficznej

Agata Skorupa, Andrzej Gierak, Iwona Łazarska\*

W trakcie badania substancji o właściwościach przeciwutleniających (kwasu askorbinoowego (AA) i tokoferolu (TOH)) ulegają one przemianom, związanym z łatwym dostępem tlenu powietrza. Może to następować m.in. w trakcie analizy na płytkach TLC. Przeprowadzono analizę spektrofotometryczną UV-Vis, która potwierdza, że po analizie TLC wizualizowane substancje są produktami utlenienia wyjściowych analitów.

Poza podstawowymi dla naszego zdrowia substancjami odżywczymi, takimi jak: węglowodany, białka, witaminy i minerały, zwraca się uwagę, na substancje czynne, których rola i znaczenie są bardzo ważne. Już bardzo niewielkie ilości tych substancji mogą chronić nasze zdrowie, co sprawia, że coraz częściej stosuje się je, jako suplementy diety oraz dodatki do żywności.

Organizm człowieka jest narażony na wiele zagrożeń. Jednym z nich są wolne rodniki powstające pod wpływem światła ultrafioletowego, toksyn czy zanieczyszczeń środowiska. Mogą one atakować różne struktury komórkowe – mitochondria lub błony komórkowe, wchodząc w reakcje łańcuchowe z two-

żącymi je lipidami, białkami i kwasami nukleinowymi. Naturalnymi sprzymierzeńcami w walce z wolnymi rodnikami oraz efektami procesów starzenia są antyoksydanty, które w dużej mierze obecne są w roślinach. Na szczególne zainteresowanie zasługują witaminy E i C.

*Witamina E* to ogólna nazwa grupy związków: 4 tokoferoli i 4 tokotrienoli. Wspólną cechą struktury cząsteczek jest pierścień chromanolowy i łańcuch boczny (w strukturze tokotrienoli łańcuch fitylo-

wy jest nienasycony i zawiera 3 wiązania podwójne). Rozróżnieniem poszczególnych form witaminy E jest położenie grup metylowych ( $-CH_3$ ) w pierścieniu. Największą aktywność biologiczną wykazuje  $\alpha$ -tokoferol, TOH (rys. 1.), który jest najczęściej występującą formą witaminy E w przyrodzie [1,2,3].

Ze względu na budowę, cząsteczka tokoferolu jest hydrofobowa, czyli dobrze rozpuszczalna w tłuszczach. Środowiskiem działania i głównego występowania

witamin E w organizmach są błony komórkowe i lipoproteiny osocza krwi [3]. Witamina E zmniejsza wrażliwość skóry na promieniowanie UV, neutralizuje wolne rodniki i hamuje procesy starzenia się komórek. Ponadto reguluje gospodarkę wodną naskórka, reguluje pracę gruczołów łojowych oraz wspomaga mikrocyrkulację w naczyniach włosowatych. Tokoferole występują w bardzo wielu produktach spożywczych: oliwie z oliwek, olejach, owocach, warzywach, orzechach, zbo-

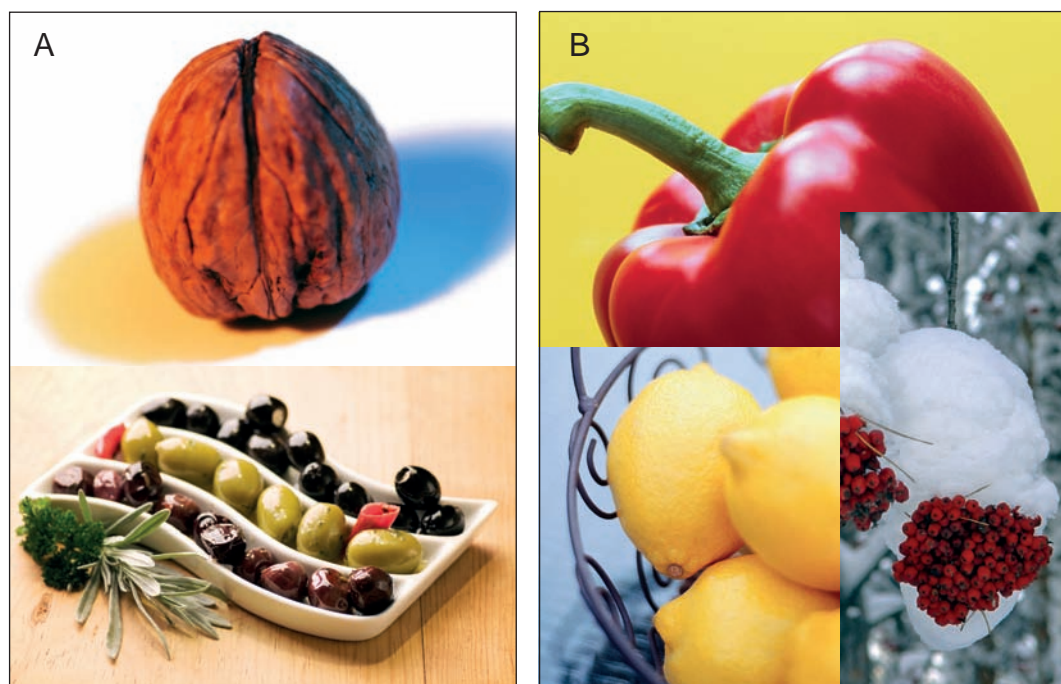
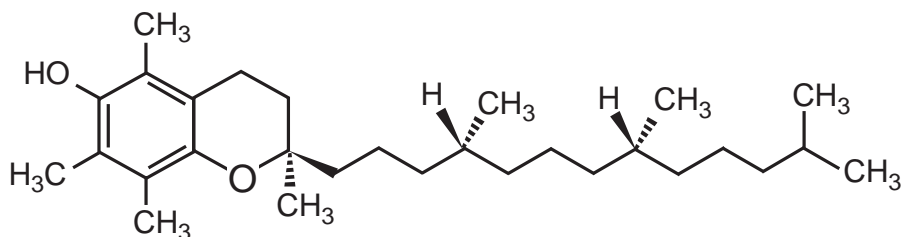
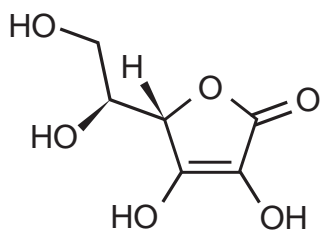


Foto. 1. Źródła występowania (A) witaminy E i (B) witaminy C



Rys. 1. Wzór strukturalny  $\alpha$ -tokoferolu [1,4]



Rys. 2. Wzór strukturalny kwasu L-askorbinowego [7]

żach, (foto. 1A.) dodawane są również do niektórych produktów takich, jak np. margaryny.

Właściwości przeciwutleniające związane są z obecnością grupy hydroksylowej w pierścieniu, której utlenienie prowadzi do powstania rodnika tokoferoxyloksylowego,  $\text{TO}^{\bullet}$  [1,3]. Szczególnym źródłem tokoferoli są oleje roślinne, dlatego też cieszą one się dużym zainteresowaniem.

Jedną z możliwości analizowania tokoferoli jest metoda chromatografii cienkowarstwowej (TLC) [5,6]. Do analizy chromatograficznej tokoferoli w olejach próbkę przygotowuje się zazwyczaj przez hydrolizę alkaliczną, która prowadzi do zmydlenia matrycy, czyli kwasów tłuszczowych [5], a następnie ekstrakcja w układzie ciecz-ciecz lub ciecz-ciało stałe.

Witamina C jest doskonałym antyoksydantem rozpuszczal-

nym w wodzie. W cząsteczce są obecne dwa asymetryczne atomy węgla, dlatego występuje w postaci 4 stereoizomerów, z czego główną formą występowania jest kwas L-askorbinowy (rys. 2.) [7].

Witamina C w stanie stałym jest substancją o wysokiej stabilności, natomiast roztwory wodne poza zakresem pH 4-6 wykazują niewielką trwałość [7]. Posiada właściwości redukujące. Aktywnymi jej formami są: kwas askorbinowy i produkt jego utlenienia – kwas dehydroaskorbinowy. Kwas askorbinowy w odróżnieniu od kwasu dehydroaskorbinowego w warunkach beztlenowych jest odporny na wysoką temperaturę. Kwas dehydroaskorbinowy zaś to związek nietrwały, którego utlenienie powoduje powstanie związków nie wykazujących już aktywności biologicznej witaminy C.

W organizmach ludzkich dzięki swym właściwościom redukującym, stymuluje różne procesy biochemiczne. Poza funkcją przeciwutleniającą wspomaga wchłanianie wapnia, wykazuje właściwości detoksykacyjne [7]. Większość zwierząt i roślin ma zdolność wytwarzania witaminy C, wyjątkiem jest organizm człowieka, świnki morskiej i nie-

których gatunków nietoperzy. Źródłem omawianej witaminy są głównie świeże owoce i warzywa (foto. 1B.). Witamina C jest wrażliwa na działanie światła, temperatury oraz powietrza, a takie procesy jak: odgrzewanie, zamrażanie, konserwacja czy długotrwałe przechowywanie przyczyniają się do utraty tego cennego składnika w danym produkcie spożywczym.

### Analiza tokoferolu

W celu zbadania trwałości:  $\alpha$ -tokoferolu (Sigma) i kwasu askorbinowego (Polfa), sporządzono etanolowe roztwory: TOH o stężeniu 10mg/100mL i AA – 20mg/100mL. Analizę chromatograficzną prowadzono w komorach poziomych DS II firmy Chromdes (Lublin) na płytkach z żelazem krzemionkowym Si60 (Merck). Jako fazy ruchomej użyto mieszanin: heksan/octan etylu (9:1, v/v) dla TOH oraz chloroform/etanol/acetone/kwas octowy (2:2:2:1, v/v) dla AA. Badane substancje obserwowano pod lampą UV-Vis bądź wizualizowano mieszaniną równych objętości metanolo- wych roztworów 0.5% bipirydyli i 0.2% chlorku żelaza(III).

W odpowiedzi na ogromne zainteresowanie kontynuacją I Szkoły Adsorpcji, która miała miejsce w Lublinie we wrześniu 2011 r., firma Syl&Ant Instruments ([www.sylant.pl](http://www.sylant.pl)) postanowiła zorganizować w dniach

24-26 kwietnia 2013 roku

## II Szkołę Adsorpcji.

Szkoła będzie odbywać się tym razem w Toruniu przy współpracy z Uniwersytetem Mikołaja Kopernika. Lektorami będą profesorowie UMK, UMCS i innych polskich uczelni oraz dr Jacek Jagiełło i dr Jeff Kenvin z firmy Micromeritics, USA jak i przedstawiciel firmy SMS Ltd, UK (SurfaceMeasurement Systems). Szkoła przeznaczona jest dla naukowców i inżynierów z przemysłu chcących doskonalić badania naukowe oraz rozwój produktów i procesów gdzie materiały porowate odgrywają znaczącą rolę. Oficjalnymi językami Szkoły będą język polski i język angielski.

Kwestionariusz rejestracyjny można otrzymać pisząc pod adres: [rafal.rudzki@sylant.pl](mailto:rafal.rudzki@sylant.pl)  
Termin rejestracji do udziału w Szkole to 31.03.2013 r.

Do badań spektroskopowych stosowano kuwetę kwarcową (10.00 mm), pomiary przeprowadzono w spektrofotometrze Agilent 8453 UV-visible z oprogramowaniem UV-Visible ChemStation. Po rejestracji widm absorpcyjnych dla roztworów tokoferolu obserwowane są dwa maksima przy  $\lambda=209$  i  $290$  nm. Widma zarejestrowane w odstępach dobowych nie wykazują większych zmian. Niewielkie zmiany były ob-

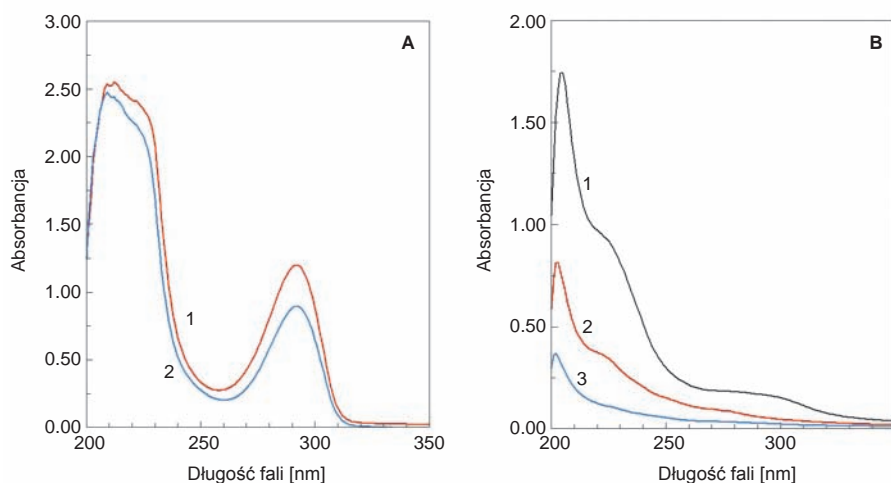
serwowane dopiero po upływie 12 dni (rys. 3A. krzywa 1 zarejestrowana po przygotowaniu roztworu, krzywa 2 – po 12 dniach). Świadczy to o trwałości etanolowych roztworów tokoferolu. Zgodnie z danymi literaturowymi [2,8,9] charakterystyczne pasmo absorpcji dla  $\alpha$ -tokoferolu występuje przy długości fali 292 nm. W związku z tym niewielkie obniżenie jego intensywności dla badanych próbek potwierdza, że

w trakcie analizy zmniejsza się nieznacznie stężenie tego analitu.

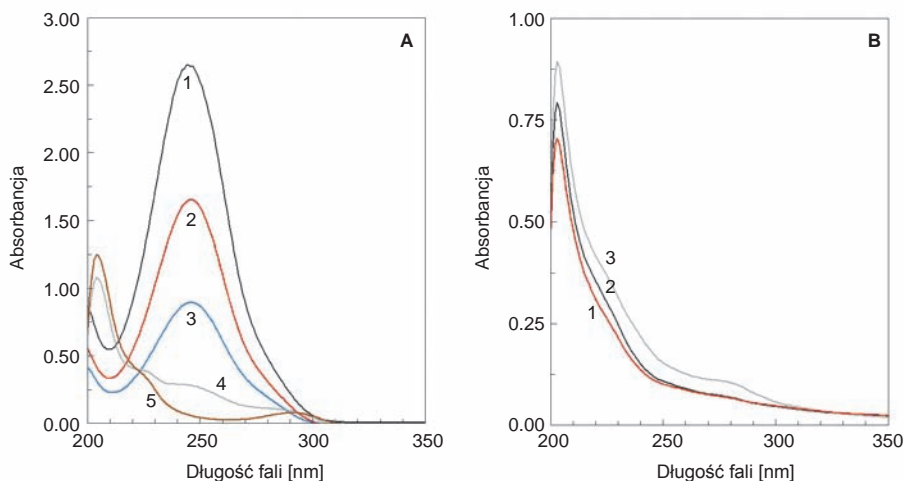
Analiza chromatograficzna i obserwacja płytki w świetle UV wykazała, że po rozwinięciu chromatogramu i obserwacji w świetle lampy UV, plamki nie są widoczne od razu, lecz pojawiają się po pewnym czasie. Intensywność plamki zwiększała się w czasie, co można zauważyć po analizie zdjęć chromatogramów w świetle lampy

UV, dokonanych z wykorzystaniem programu BS PictureTLC, Ver. 2.3 2011. Pole powierzchni pod pikiem wzrasta z 1.35892 do 13.38265, odpowiednio dla pasm na chromatogramie analizowanym bezpośrednio po rozwinięciu i po ok. 30min. Świadczy to o zmianach jakościowych, jakie mogą zachodzić w trakcie analizy TLC.

W tym celu zarejestrowano widma etanolowych roztworów, ekstrahowanych z warstwy żelu krzemionkowego, zdjętego z płytki w odstępach czasowych (5, 15, 30 min.). Na zarejestrowanych widmach obserwujemy także, że absorbancja przy  $\lambda=202$  nm maleje w czasie (rys. 3B, krzywa 1 – 5 min., krzywa 3 – 30 min.). Jest to prawdopodobnie spowodowane zmniejszaniem się stężenia tokoferolu i powstawaniem produktu utlenienia, którego charakterystycznych pasm na widmie nie można zaobserwować. Można też zauważyć niewielkie pasmo przy  $\lambda=292$  nm pochodzące od tokoferolu i obniżające się w czasie analizy, co potwierdza ubywanie substratu.



Rys. 3. Widma absorpcyjne dla roztworu tokoferolu (A), próbek wyekstrahowanych z sorbentu płytki chromatograficznej (B)



Rys. 4. Widma absorpcyjne dla roztworu kwasu askorbinowego (A), próbek wyekstrahowanych z sorbentu płytki chromatograficznej (B)

### Analiza kwasu askorbinowego

W przypadku kwasu askorbinowego przemiany, jakim ulega są intensywniejsze. Po rejestracji widma dla świeżo przygotowanego roztworu obserwowane jest jedno pasmo absorpcyjne przy długości fali  $\lambda=246$  nm (rys. 4A, krzywa 1). Na widmach rejestrowanych po 2 (krzywa 2), 3 dniach (krzywa 3) można zaobserwować



zmniejszanie się absorbancji przy  $\lambda=246$  nm. Wzrasta natomiast intensywność pasma przy  $\lambda=209$  nm w przypadku widm rejestrowanych po 4 (krzywa 4) i 12 dniach (krzywa 5). Według danych literaturowych [10,11,12] kwas askorbinowy wykazuje jedno pasmo absorpcyjne w zakresie 240-250 nm. Wpływ na położenie maksimum pasma absorpcji ma rozpuszczalnik użyty do analizy oraz pH roztworu [13]. Widmo zarejestrowane przez Zenga i współ. [11] dla roztworu kwasu askorbinowego w metanolu wykazuje maksimum przy 245 nm. Dla roztworów etanolowych uzyskano widmo z maksimum przy takiej samej długości fali. Absorbancja promieniowania przy 209 nm pochodzi prawdopodobnie od kwasu dehydroaskorbinowego, który jest produktem utlenienia wyjściowego związku [10].

Po analizie chromatograficznej i obserwacji płytki pod lampą UV od razu można zauważyć plamki pochodzące od substancji badanej. W odróżnieniu od tokoferolu, plamka kwasu askorbinowego szybko zanika. Analizę zdjęć chromatogramów obserwowanych pod lampą UV bezpośrednio po analizie rozdziel TLC oraz po 30 min., dokonano za pomocą programu BS PictureTLC, Ver. 2.3 2011. Pole powierzchni pod pikami, które jest proporcjonalne do zawartości badanego analitu, zmniejsza się z 4.33240 (dla  $t=0$  min.) do 2.32379 (dla  $t=30$  min.). Może to świadczyć o przemianie badanej substancji

w produkt utleniania. W celu potwierdzenia tej tezy wykonano analizę spektrofotometryczną substancji ekstrahowanych z powierzchni płytki chromatograficznej.

Pomiary absorbancji roztworów uzyskanych po ekstrakcji etanolem warstwy żelu krzemionkowego w różnych odstępach czasowych (0,5 i 20 min) uwidacznia jedno maksimum przy  $\lambda=203$  nm, które powiększa się (rys.4B, krzywa 1 – 0 min., krzywa 2 – 5 min., krzywa 3 – 20 min.).

Kleinwächter i współ. [14] przedstawili badania, z których wynika, że w zakresie długości fali ok. 200 nm pojawia się pasmo od kwasu dehydroaskorbinowego. Pozwala to twierdzić, że substancją, którą można identyfikować na płycie jest kwas dehydroaskorbinowy.

### Wnioski

Wyniki przeprowadzonych badań sugerują, że podczas analizy chromatograficznej TLC popularnych antyutleniaczy ( tokoferolu i kwasu askorbinowego) dochodzi do ich utlenienia. Roztwory etanolowe antyutleniaczy są bardziej stabilne, ponieważ ograniczony jest ich dostęp do tlenu powietrza. Podczas analizy TLC dostęp powietrza do próbki jest większy, w konsekwencji, po rozwinięciu chromatogramów wykrywamy produkty ich utlenienia. Planujemy dalsze badania trwałości antyutleniaczy zawartych w matrycach naturalnych i ich przemian zachodzących w trakcie procesu analizy.

### Literatura

- [1] J. Małyżsko, S. Michałkiewicz, *Substancje biologicznie aktywne w olejach jadalnych*, Wiad. Chem., 64 (2010) 467
- [2] B. Yilmaz, M. Öztürk, Y. Kadioğlu, *Comparison of two derivative spectrophotometric methods for the determination of  $\alpha$ -tocopherol in pharmaceutical preparations*, Il Farmaco, 59 (2004) 723
- [3] G. Bartosz, *Druga twarz tlenu*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2004
- [4] X. Wang, P.J. Quinn, *Vitamin E and its function in membranes*, Prog. Lipid Res., 38 (1999) 309
- [5] E.V. Borodina, T.A. Kitaeva, E.F. Safonova, V.F. Selemenev, A.A. Nazarova, *Determination of  $\alpha$ -Tocopherol and Ergocalciferol by Thin-Layer Chromatography*, J. Anal. Chem., 62 (2007) 1064
- [6] O.V. Rybakova, E.F. Safonova, A.I. Slivkin, *Determining tocopherols by thin-layer chromatography*, Pharm. Chem. J., 42 (2008) 471
- [7] Praca zbiorowa pod red. W. Grajka, *Przeciwutleniacze w żywności*, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa 2007
- [8] Y. Yoshida, E. Niki, N. Noguchi, *Comparative study on the action of tocopherols and tocotrienols as antioxidant: chemical and physical effects*, Chem. Phys. Lipids 123 (2003) 63
- [9] G.J. Wilson, C.Y. Lin, R.D. Webster, *Significant Differences in the Electrochemical Behavior of the  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, and  $\delta$ -Tocopherols (Vitamin E)*, J. Phys. Chem. B, 110 (2006) 11540

[10] R. Săndulescu, S. Mirel, R. Oprean, *The development of spectrophotometric and electroanalytical methods for ascorbic acid and acetaminophen and their applications in the analysis of effervescent dosage forms*, J. Pharm. Biomed. Anal., 23 (2000) 77

[11] W. Zeng, F. Martinuzzi, A. MacGregor, *Development and application of a novel UV method for the analysis of ascorbic acid*, J. Pharm. Biomed. Anal., 36 (2005) 1107

[12] S. Gupta, R.K. Sharma, H. Chandra, *Electronic absorption spectra of L-ascorbic acid in nonaqueous media*, J. Appl. Spectr., 73 (2006) 297

[13] E. Kleszczewska, W. Misiuk, *Spectrometric assay of reaction of L-ascorbic acid with promethazine occurring in quantitative determination of vitamin C*, Acta Polon. Pharm. 56 (1999) 347

[14] M. Kleinwächter, D. Selmar, *A novel approach for reliable activity determination of ascorbic acid depending myrosinases*, J. Biochem. Biophys. Methods 59 (2004) 253

\* Agata Skorupa, Andrzej Gierak, Iwona Łazarska – Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach, Instytut Chemii

Artykuł uzupełniony, część wyników została przedstawiona na V Ogólnopolskim Sympozjum „Nauka i przemysł – metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania i możliwości” 12-14 czerwca 2012 r. w Lublinie: „Badanie przemian substancji biologicznie aktywnych metodami analizy instrumentalnej”.