

**METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE EPIGALOCATEQUINA
GALATO EN TÉ VERDE POR UPLC-PDA**

ÁNGELA MARÍA LÓPEZ GIL

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICAS
QUIMICA FARMACEUTICA
SANTIAGO DE CALI
2013**

**METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE EPIGALOCATEQUINA
GALATO EN TÉ VERDE POR UPLC-PDA**

ÁNGELA MARÍA LÓPEZ GIL

Trabajo de grado para optar por el título de Químico Farmacéutico

**TUTOR
GUILLERMO LEÓN MONTOYA PELÁEZ Ph.D**

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICAS
QUÍMICA FARMACÉUTICA
SANTIAGO DE CALI
2013**

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN.....	8
ABSTRACT.....	9
INTRODUCCIÓN.....	10
1. DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO.....	12
1.1 MARCO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE.....	12
1.2.1 Aspectos generales de <i>Camellia sinensis</i>	13
1.2.2 Propiedades físicas y químicas de las catequinas.....	14
1.2.2.1 Estructura químicas de las Catequinas.....	14
1.2.2.2 Propiedades físicas de las catequinas.....	15
1.2.2.3 Estabilidad de las Catequinas.....	16
1.2.2.4 Propiedades Terapéuticas de la EGCG.....	17
1.2.3 Identificación y cuantificación de EGCG.....	18
1.3 OBJETIVOS.....	20
1.3.1 Objetivo General.....	20
1.3.2 Objetivos Específicos.....	20
1.4 METODOLOGÍA.....	20
1.4.1 Diseño del estudio.....	20
1.4.2 Materiales.....	20
1.4.3 Condiciones del método (UPLC-PDA).....	21
1.4.4 Valoración de EGCG.....	21
1.4.5 Preparación de las muestras.....	22
1.4.6 Tratamiento de las muestras.....	22

1.4.6.1 Tratamiento por Extracción Líquido-Líquido	22
1.4.6.2 Tratamiento por SPE (Extracción en Fase Solida).....	23
2. RESULTADOS.....	24
2.1 VALORACIÓN DE EGCG	24
2.2 RESULTADOS DE LA METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE EGCG EN TÉ VERDE MEDIANTE UPLC-PDA CON TRATAMIENTO DE MUESTRA POR SPE	25
2.3 RESULTADOS DE LA METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE EGCG EN TÉ VERDE MEDIANTE UPLC-PDA CON TRATAMIENTO DE MUESTRA POR EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO.....	28
2.4 COMPARACIÓN HPLC VS UPLC EN LA DETERMINACIÓN DE EGCG	31
3. DISCUSIÓN	33
3.1 METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE EGCG EN TÉ VERDE MEDIANTE UPLC-PDA CON TRATAMIENTO DE MUESTRA POR SPE.....	33
3.1.1 Tratamiento de la Muestra	33
3.1.2 Cromatografía líquida (UPLC).....	34
3.2 METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE EGCG EN TÉ VERDE MEDIANTE UPLC-PDA CON TRATAMIENTO DE MUESTRA POR EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO	37
4. CONCLUSIONES	41
5. RECOMENDACIONES.....	42
BIBLIOGRAFIA.....	43
ANEXOS	47

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Principales características de Camelliasinensis.....	13
Tabla 2. Condiciones del método para la determinación de EGCG mediante UPLC-PDA.....	21
Tabla 3. Resultados de la caracterización de EGCG por UPLC-PDA, con tratamiento de las muestras mediante extracción en fase solida (SPE)	25
Tabla 4. Resultados de la caracterización de EGCG por UPLC-PDA, con tratamiento de las muestras mediante extracción líquido-líquido.....	28
Tabla 5. Comparación de tiempo de retención relativo aproximado para polifenoles con la Figura 7, para la identificación del pico con un tR 1,565 min	36
Tabla 6. Comparación de tiempo de retención relativo aproximado para polifenoles con la Figura 14, para la identificación de las posibles catequinas presentes en el Té Verde Hindú.	38

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Esquemas representativos de la estructura química de la familia catequinas	15
Figura 2. Oxidación de Catequinas.....	16
Figura 3. Epimerización de las Catequinas.....	17
Figura 4. Montaje para el tratamiento de las muestras mediante extracción líquido-líquido.....	22
Figura 5. Curva de Calibración de estándar de EGCG.....	24
Figura 6. Cromatograma del estándar de EGCG a una concentración de 150ppm.....	26
Figura 7. Cromatograma Muestra de Té Verde- Hindú con tratamiento por SPE.....	26
Figura 8. Cromatograma Muestra Agua Cristal Vitality-TEAVIGO con tratamiento por SPE.....	27
Figura 9. Cromatograma Muestra Agua Cristal Vitality-TEAVIGO sin tratamiento por SPE.....	27
Figura 10. Cromatograma de muestra de recuperación del estándar de EGCG a una concentración de 60ppm tratadas mediante extracción líquido-líquido.....	29
Figura 11. Cromatograma de muestra de recuperación del estándar de EGCG a una concentración de 150ppm tratadas mediante extracción líquido-líquido.....	29

Figura 12. Cromatograma de muestra de recuperación del estándar de EGCG a una concentración de 200ppm tratadas mediante extracción líquido-líquido.....	30
Figura 13. Cromatograma de una Muestra Agua Cristal Vitality con TEAVIGO tratada mediante extracción líquido-líquido.....	30
Figura 14. Cromatograma de una Muestra Té Verde– Hindú tratada mediante extracción líquido-líquido.....	31
Figura 15. Cromatograma extracción de compuestos de catequinas de té verde chino mediante HPLC.	31
Figura 16. Cromatograma separación EGCG de té verde Korean mediante HPLC.	32
Figura 17. Estructura Química Cartucho Strata X.....	33

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1: Cromatogramas de muestras de recuperación del estándar tratada mediante extracción en fase sólida (SPE)	47
Anexo 2. Estudios realizados mediante extracción en fase solida (SPE)	49

RESUMEN

En este proyecto se estandarizó una metodología para la determinación de Epigallocatequina Galato -EGCG en té verde mediante una nueva categoría de separación analítica conocida como cromatografía líquida de ultra alta-eficiencia (UPLC) acoplado a un detector de diodos PDA en algunos productos comerciales, Agua Cristal Vitality con TEAVIGO y una infusión de Té Verde Hindú. Como complemento a esta valoración se realizó un tratamiento de muestra mediante extracción líquido-líquido, donde se utilizó como solventes de partición cloroformo y acetato de etilo. La identificación de EGCG fue establecida por comparación de espectros de absorbancia UV y tiempos de retención de un estándar de referencia tratado bajo las mismas condiciones. Se logró observar la presencia de EGCG en las muestras con un tiempo de retención de 1,6min y una absorción máxima a 275nm. El contenido de EGCG fue de 137 mg/L en la muestra de Agua Cristal Vitality y de 594 mg/L en la infusión de Té Verde Hindú. El método establecido mediante UPLC-PDA trae como ventaja que es rápido e ideal para los análisis de rutina.

Palabras claves: Té verde, Catequinas, UPLC, Extracción Líquido-Líquido, SPE, EGCG

ABSTRACT

A Ultra-high performance liquid chromatography method employing diode array detection (PDA) was developed to determine Epigallocatechin gallate (EGCG) in commercial products as Té Verde Hindú and Agua Cristal Vitality with TEAVIGO. A sample treatment by liquid-liquid extraction was developed to complement this method, for this treatment was used as solvent partition chloroform and ethyl acetate. The identities of EGCG were established by comparing UV absorbance spectra and retention time to a reference standard treated under the same conditions. In the results, we could observe the presence of EGCG with a retention time of 1.6 min and a maximum absorption at 275nm. The content of EGCG was 137 mg/L in the sample of Agua Cristal Vitality con TEAVIGO and in the sample of Té Verde Hindu was 594 mg/L. The method established by UPLC-PDA brings the advantage that it's fast and ideal for routine analysis.

Keywords: Green tea, Catechins, UPLC, EGCG, Liquid-liquid extraction, SPE

INTRODUCCIÓN

La planta del té es un arbusto procedente del sudeste asiático, denominado *Camelliasinensis (L)*. Existen tres grandes productos derivados a partir de ella: el té verde (no fermentados), té Oolong (semi-fermentados), y té negro (fermentados). En China y Japón el té verde es el más popular, mientras que en India, Europa, Norte América y Norte de África prefieren el té negro (El-Shahawi, Hamza, Bahaffi, Al-Sibaai y Abduljabbar, 2012).

El té es una bebida milenaria que ha acompañado a los hombres desde hace muchos años y es la segunda bebida más consumida en el mundo, después del agua natural.

Según datos de la Tea Association of The United States, las ventas anuales de té crecieron entre 1990 y 2007 un 375%, y se espera que siga incrementando a un ritmo acelerado. Estas cifras son reflejo del auge que ha tenido el té desde la década de los 80 en que empezó a hacerse popular en Estados Unidos y Europa (“El té es la segunda bebida más consumida en el mundo”, 2013).

Las infusiones de té tienen componentes esenciales de la dieta para la salud humana, como polifenoles, cafeína, aminoácidos, vitaminas y carbohidratos. El té verde se caracteriza por tener una mayor conservación de catequinas debido a que no presenta una oxidación de polifenoles. Existen diferentes tipos de catequinas, está el grupo de las catequinas libres entre las que se encuentran la epicatequina (EC), la epigalocatequina (EGC) y galocatequina (GC) las cuales, se caracterizan por dar un sabor ligeramente dulce y por ser menos astringentes. Adicionalmente, se encuentran las catequinas esterificadas que proporcionan una mayor astringencia y sabor amargo, dentro de este grupo se encuentran epigalocatequina galato (EGCG), epicatequina galato (ECG), galocatequina galato (GCG) y catequina galato (CG) (Vuong, Golding, Nguyen y Roach, 2010).

Uno de los componentes más utilizados en medicamentos y bebidas, y a los que se les atribuye los efectos benéficos del té verde es una de las principales catequinas, la epigalocatequina galato (EGCG). Esta molécula es bien conocida por su potente efecto antioxidante, además recientes estudios han reportado que juegan un papel importante en la prevención de enfermedades cardiovasculares y muchos tipos de cáncer (El-Shahawi et al, 2012). A inicios del 2000, el equipo Morroede la Universidad Purdue demostró mediante varios estudios el efecto de la EGCG en la inhibición de la secreción de enzimas necesarias para el crecimiento de células cancerosas, evidenciando por primera vez el mecanismo quimiopreventivo del té verde (Bum y Ho, 2002).

Teniendo en cuenta la importancia de este tipo de molécula bioactiva, las investigaciones del té verde cada vez son mayores, y nace la necesidad de las industrias e institutos de investigación de desarrollar técnicas o métodos rápidos, sensibles y selectivos con el fin de identificar activos en diferentes productos como infusiones de té o bebidas con la presencia de EGCG.

Existen diferentes métodos que permiten cuantificar e identificar las catequinas del té verde, uno de los más efectivos y que ha permitido determinar la concentración, rendimiento y pureza de catequinas en productos, ha sido la cromatografía líquida de alta eficiencia, HPLC.

Después de varias interlocuciones con la compañía “Agrícola Himalaya” con sede en el Valle del Cauca, la principal comercializadora y productora de té en Colombia y cuya principal marca “Té Hindú”, se dejó al descubierto que sus productos que tienen alta aceptación en el país, adolecen de valoraciones analíticas que determinen su calidad y puedan al mismo tiempo aportar criterios de exclusividad (como una denominación de origen) en el mercado nacional e internacional. Teniendo en cuenta la importancia económica de este producto tanto como su posible aporte en salud y nutrición, se decidió estandarizar una metodología para la determinación de EGCG en té verde mediante una nueva categoría de separación analítica conocida como cromatografía líquida de ultra alta-eficiencia (UPLC) que proporciona resultados en menor tiempo, da una mayor resolución y sensibilidad. Para ello se realizó un estudio de la naturaleza y el comportamiento de las catequinas, se establecieron parámetros para el tratamiento de la muestra y para la valoración cromatográfica de las catequinas mediante UPLC-PDA.

1. DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO

1.1 MARCO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE

Estado del arte

En el 2008 la industria de las bebidas creció 4,8% a nivel nacional. El sector de las bebidas gaseosas que presenta una participación del 47% en el mercado, ha ido disminuyendo debido a las tendencias de estilo de vida saludable (Bustos, 2013). Esto ha impulsado que otras líneas como jugos de fruta, té y agua tengan una mayor participación, y además que empresas como Coca-Cola y Postobón, que dominan el mercado de bebidas en Colombia, creen nuevas líneas que se adapten a las nuevas necesidades de los consumidores.

Por ejemplo, la compañía Postobón se enfocó en el sector del té y ha desarrollado productos innovadores como Mr Tea y Cristal Vitality TEA, los cuales contienen uno de los ingredientes principales del té verde, Epigallocatequina Galato (EGCG), que ofrece las propiedades antioxidantes más revolucionarias para la industria de bebidas saludables. En Colombia el consumo de bebidas de té y agua ha tenido un crecimiento del 4,6%, lo que ha impulsado a las industrias de bebidas incluir este ingrediente, conocido comercialmente como TEAVIGO, en sus productos comerciales (Pérez & Romero, 2012).

Dentro las industrias de medicamentos, bebidas y alimentos, la eficiencia y la velocidad de análisis cromatográfico se han convertido en un factor importante con el fin de aumentar el rendimiento y reducir los costos de análisis.

Si bien el HPLC ha sido uno de los métodos más utilizados para la identificación y valoración de catequinas, para el año 2013 se tiene el propósito de desarrollar una nueva metodología eficiente y reproducible a través de una nueva categoría de separación analítica denominada cromatografía líquida de UPLC acoplada a un detector de fotodiodos PDA. Este sistema es óptimo para operar a altas presiones lo que permite el uso de columnas con partículas de diámetro pequeño (Sub-1,7 μm), dando un efecto positivo en la eficiencia del sistema y en cortos tiempos de análisis (WATERS, 2013).

Es un factor de éxito para cada empresa establecer ventajas competitivas, creando nuevos productos que contribuyan con el bienestar y la salud de las personas, ya que son los consumidores los encargados de que un producto tenga éxito. Por lo tanto, con este proyecto se busca contribuir en el desarrollo de una nueva metodología rápida y eficiente para la determinación de EGCG en diferentes productos comerciales.

1.2.1 Aspectos generales de *Camellia sinensis*

Tabla 1. Principales características de *Camellia sinensis*

 <p>Hojas de la planta de té (<i>Camelliasinensis</i>)</p>	CLASIFICACION CIENTIFICA	
	Reino:	<i>Plantae</i>
	División:	<i>Magnoliophyta</i>
	Clase:	<i>Magnoliopsida</i>
	Orden:	<i>Ericales</i>
	Familia:	<i>Theaceae</i>
	Tribu:	<i>Theeae</i>
	Género:	<i>Camellia</i>
	Especie:	<i>C. sinensis</i>
	NOMBRE BINOMIAL	
<i>Camellia sinensis</i>		

Camellia: nombre genérico otorgado en honor del botánico y misionero jesuita Jiri Josef Carnel (conocido como Camellus)

sinensis: es un epíteto latino geográfico que alude a su localización en china.

La hoja de té verde al no sufrir el proceso de fermentación, conserva una gran cantidad de constituyentes activos, entre estos se encuentran:

Los polifenoles: constituyen entre el 15 y el 20% del té verde y están compuestos por siete tipos diferentes de catequinas: (+) - catequina (C), (-) –epicatequina (EC), (+) –galocatequina (GC), (-) –epigalocatequina (EGC), (-) –epicatequina-3-galato (ECG), (-) –galocatequina-3-galato (GCG) y (-) –epigalocatequina-3-galato (EGCG).

Cafeína: el contenido de cafeína de las hojas de té verde alcanza el 5%.

Vitaminas: el té verde contiene vitamina A, vitamina B, Vitamina B₂, niacina y Vitamina C.

Amino ácidos: la teanina es el aminoácido mayoritario en el té verde, seguida de ácido glutámico, arginina, ácido aspártico y glutamina.

Compuestos Nitrogenados: cafeína, purina, amidas, proteínas y ácidos nucleicos.

Elementos Inorgánicos: el contenido en aluminio, manganeso y fluor es relativamente alto comparado con el de otras plantas. Otros elementos mayoritarios son hierro, boro y selenio.

Carbohidratos, celulosa y almidón: el contenido total en carbohidratos es aproximadamente el 40% de la hoja del té verde, siendo 1/3 celulosa. El contenido de almidón varía de una muestra a otra (Derma Thea, 2010).

1.2.2 Propiedades físicas y químicas de las catequinas

1.2.2.1 Estructura químicas de las Catequinas

Las catequinas tienen una estructura química general de $C_6-C_3-C_6$ con dos anillos aromáticos y muchos grupos hidroxilos.

En la figura 1, se puede observar la estructura química de las principales catequinas que se encuentran de manera natural en las hojas del té verde: (-)-epigallocatequina galato [(-)-EGCG], (-) epigallocatequina[(-)-EGC], (-)-epicatequina galato [(-)-ECG], (-)- epicatequina[(-)-EC], (+)-galocatequina[(+)-GC], y catequina[(+)-C].

Durante el proceso de fabricación del té verde, algunas catequinas sufren isomerización en la posición C-2 de flavan-3-ol, (-)- EGCG, (-)-EGC, (-)-ECG y (-)-EC se convierten en (-)-galocatequina galato [(-)-GCG], (-)-galocatequina [(-)-GC], (-)-catequina galato [(-)-CG] y (-)-C, respectivamente (Nishitani & Sagesaka, 2004).

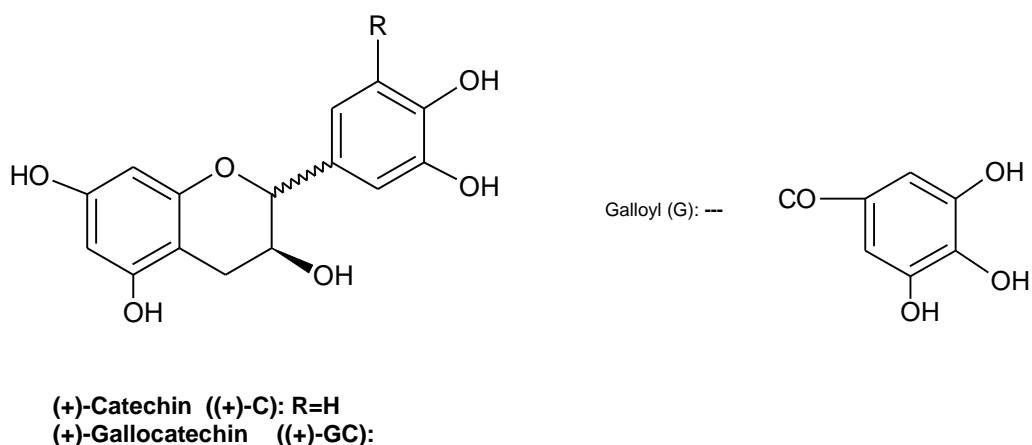
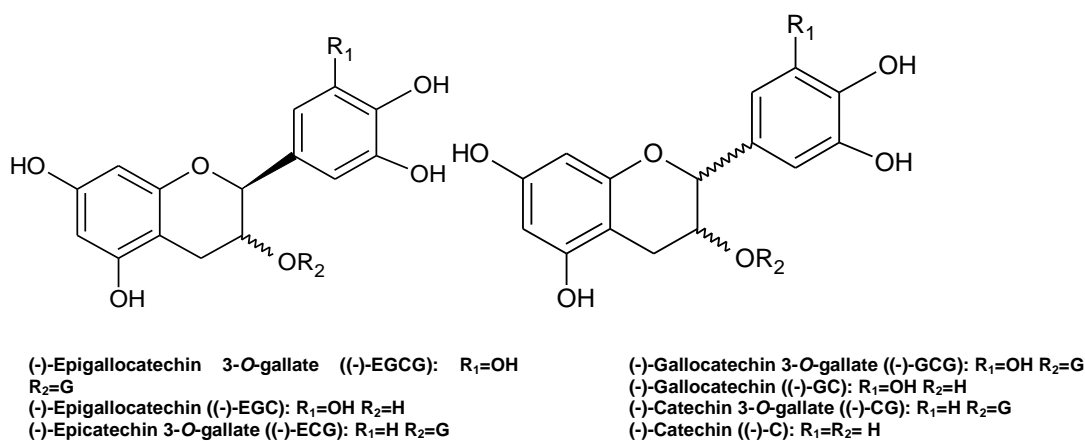


Figura 1. Esquemas representativos de la estructura química de la familia catequinas

Fuente: Nishitani, E. & Sagesaka, Y. (2004). Simultaneous determination of catechins, caffeine and other phenolic compounds in tea using new HPLC method. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17, 675-685.

1.2.2.2 Propiedades físicas de las catequinas

Las catequinas se constituyen en uno de los componentes más abundantes de las hojas de té verde, son solubles en medios acuosos y solventes orgánicos polares. Sin embargo, la solubilidad de las catequinas individuales varía y algunas dependen de la temperatura de extracción, tiempo de extracción o del tipo de solvente. Estos factores son muy importantes y se deben tener en cuenta para la identificación y cuantificación de la catequina de interés EGCG, que depende tanto de la temperatura como del tiempo de la extracción.

Por otro lado, la absorción UV de las catequinas, EGCG, EGC, ECG y EC se encuentra en un intervalo de 269 a 280nm (Vuong et al, 2010).

1.2.2.3 Estabilidad de las Catequinas

Las catequinas del té son sensibles a la oxidación por enzimas, ácidos y calor. En la figura 2, se observa que en presencia de la enzima polifenol oxidasa (PPO), las catequinas sufren oxidación y se convierten en Teaflavinas y Tearubinas. Las hojas del té verde al someterse a un proceso de calentamiento después de su cosecha, inactivan la enzima oxidante PPO, lo que permite una mayor conservación de catequinas y una menor presencia de Teaflavinas.

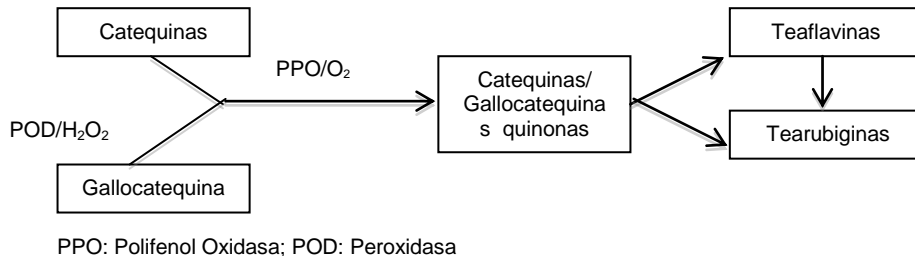


Figura 2. Oxidación de Catequinas

Fuente: Vuong, Q., Golding, J., Nguyen, M. & Roach, P. (2010). Extraction and isolation of catechins from tea. *J. Sep. Sci.*, 33 (1), 3415-3428.

Se ha identificado que la temperatura y el pH son dos factores críticos que afectan la estabilidad fisicoquímica de las catequinas. En un ambiente de temperatura alta, es más probable que se produzca la epimerización de las catequinas. En la figura 3, se observa que a una temperatura mayor a 90°C la configuración 2,3-cis de las catequinas sufre una epimerización reversible a su epímero correspondiente 2,3-trans. Se ha encontrado que la exposición al agua hirviendo durante 30 minutos solo conduce a la reducción del 12,4% de la cantidad total de EGCG, por lo tanto la pérdida en una breve exposición al proceso de calentamiento es insignificante.

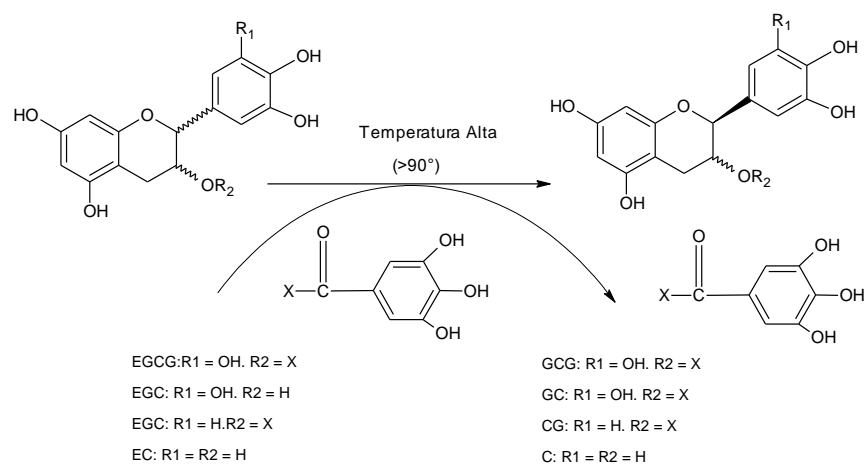


Figura 3. Epimerización de las Catequinas

Fuente: Vuong, Q., Golding, J., Nguyen, M. & Roach, P. (2010). Extraction and isolation of catechins from tea. *J. Sep. Sci.*, 33 (1), 3415-3428

Las catequinas son susceptibles e inestables en soluciones alcalinas ($\text{pH} > 8$), mientras que con valores de pH menores a 4 son estables (Li, N., Taylor, L. & Mauer, L., 2011). Normalmente la adición de ácidos a soluciones de catequinas, incrementan la estabilidad de estas. Sin embargo el efecto de algunos ácidos varía, por ejemplo, se ha demostrado que la adición de ácido ascórbico incrementa la estabilidad de las catequinas, en comparación al ácido cítrico cuyo efecto es mínimo.

1.2.2.4 Propiedades Terapéuticas de la EGCG

Se ha encontrado que la EGCG el constituyente más activo de té verde, altera favorablemente procesos patológicos como cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes, obesidad, Alzheimer y Parkinson (El-Shahawi et al, 2012).

Rezai-Zadeh et al (2005), obtuvieron datos que plantean la posibilidad de que la EGCG, suplemento dietético, puede ser utilizado para la prevención y el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer. Esta enfermedad se caracteriza por la deposición de péptidos β -amiloides ($A\beta$) como placas seniles en el cerebro. En este caso se trataron ratones transgénicos y encontraron que la EGCG reduce la generación de $A\beta$ y placas asociadas con la promoción de la ruta proteolítica α -secretasa no amilodogénica.

Raederstorff et al (2003), investigaron la respuesta y el mecanismo de acción de las catequinas en la reducción de los niveles de colesterol en plasma y su tasa de absorción en las ratas. Encontraron que el efecto reductor del colesterol es provocado principalmente por la EGCG, se sugiere que afecta el metabolismo de los lípidos al interferir con la solubilización micelar de colesterol en el tracto digestivo, que a su vez disminuye la absorción de colesterol.

Bose et al (2008), investigaron sobre la obesidad, los síntomas del síndrome metabólico y el hígado graso en ratones. Los resultados indicaron que a largo plazo la suplementación con EGCG atenuó el desarrollo de la obesidad y a corto plazo parece revertir patologías metabólicas en ratones obesos. Estos efectos pueden estar mediados por una disminución de la absorción de lípidos, disminución de la inflamación, y otros mecanismos.

1.2.3 Identificación y cuantificación de EGCG

Uno de los métodos analíticos más efectivos y que ha permitido determinar la concentración, rendimiento y pureza de catequinas ha sido la cromatografía líquida de alto rendimiento, HPLC.

Kang et al. (2000), utilizaron dos columnas analíticas de octadecilo C18, con características: i) 4,6 x 250 nm, 15 μm y ii) 3,9 x 300 mm, 10 μm . Basado en 5 g de peso seco de té verde Koreano se obtuvo 121.3 mg de EGCG con una pureza de 98%. Se utilizó cloroformo para aislar la cafeína, y las catequinas fueron extraídas utilizando acetato de etilo. La fase móvil consistió en 0,1% ácido acético en agua/acetato de etilo/acetonitrilo, 87/1/12 vol%.

Bronner & Beecher (1998), desarrollaron un método mediante HPLC-PDA para la determinación de los niveles de catequina en infusión de té negro, verde y jasmín. Se realizaron separaciones en fase reversa en una columna C18 usando tres gradientes: acetonitrilo- acetato de etilo, metanol-acetato de etilo y acetonitrilo-acetato de etilo con ácido ascórbico. Epicatequina, epigalocatequina, epicatequina galato y epigalocatequina catequina se encontraron en todas las infusiones examinadas, en una concentración entre 1-13 mg/dL.

La cromatografía en columna tal como cromatografía de fase inversa líquida de alto rendimiento (RP-HPLC) ha sido ampliamente utilizada en separación de productos naturales incluyendo las catequinas del té verde. Esta técnica se ha caracterizado por sus ventajas respecto a otro tipo de técnicas analíticas en cuanto que permiten una mayor resolución, velocidad de análisis, las columnas son de considerable duración (alrededor de 2000 inyecciones), pueden ser reutilizadas, proporciona un mejor control de los parámetros que afectan la eficiencia de la separación (Thermo Scientific, 2013), entre otras características

que ha hecho de esta técnica un método ideal para el análisis sencillo y preciso en la determinación de catequinas en diferentes productos de té.

Una de las tendencias actuales en las técnicas de separación es la miniaturización de los instrumentos, principalmente en las dimensiones y el tamaño de partícula de las columnas (Nováková et al, 2006). Cuando en 1990 se redujo el tamaño de partícula de $10\mu m$ a $3\mu m$, el rendimiento y la capacidad de resolución de las columnas de HPLC aumentó de manera significativa. Sin embargo, el uso de tamaños de partícula pequeño en columnas cortas generó límites en la combinación de velocidad y poder de resolución, debido a que los sistemas de bombeo no tenían la capacidad de resistir presiones en exceso de varios miles de psi (Swartz, 2005).

La tecnología avanza de manera continua y con el fin de mejorar la separación analítica se creó una nueva categoría conocida como cromatografía líquida de ultra-alta eficiencia (UPLC). Esta conserva los principios de la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), pero se diferencia en que proporciona resultados en menor tiempo, da una mayor resolución, velocidad y sensibilidad (Swartz, 2005).

Esta nueva tecnología que se basa en el rendimiento cromatográfico busca mediante la evolución de los materiales de empaque obtener muchas ventajas. Tiene la capacidad de alcanzar presiones de más del doble que HPLC y sus columnas están elaboradas de materiales con partículas de $1,7\mu m$. UPLC satisface los criterios de aceptación del ensayo basándose en el número de platos, la resolución y la retención del analito, además de reducir los tiempos de análisis (Swartz, 2005).

Para esta nueva tecnología de separación que ha permitido un nuevo nivel de rendimiento se deben tener en cuenta diferentes factores para su correcta utilización, uno de estos es la sensibilidad. UPLC debe ser aproximadamente 2-3 veces más sensible que HPLC, por lo tanto la velocidad de detección y capacidad del detector debe ser lo suficientemente alta para capturar datos a través del pico (Swartz, 2005).

Se requieren de detectores rápidos con el fin de aceptar y procesar datos en tiempos menores. Uno de los detectores más usados que permiten cuantificar concentraciones bajas de analitos en muestras, y comparar los espectros a distintas longitudes de onda, es el detector de matriz de fotodiodos PDA. Este permite cuantificar impurezas traza a niveles de 0,004% con una relación señal-ruido baja, logra separaciones con control de parámetros y frecuencias de muestreo flexibles para lograr una integración precisa y reproducible, y además abarca longitudes de onda de 190 a 500 nm (Waters, 2013).

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo General

Evaluar condiciones para la estandarización de una metodología fácil y rápida para la detección de Epigallocatequina Galato (EGCG) en té verde a través de UPLC-PDA

1.3.2 Objetivos Específicos

1. Estandarizar un método para la preparación y tratamiento de muestras de té verde
2. Establecer las condiciones adecuadas para la valoración cromatográfica de epigallocatequina galato (EGCG) en té verde mediante UPLC-PDA
3. Evaluar en diferentes productos comerciales el contenido de EGCG mediante UPLC-PDA

1.4 METODOLOGÍA

1.4.1 Diseño del estudio

El diseño de estudio se basó en utilizar un estándar puro que sirva de referencia para la identificación y comportamiento de EGCG. Posteriormente, se procedió a realizar un tratamiento de muestra mediante extracción líquido-líquido, y por último un análisis cromatográfico.

1.4.2 Materiales

Muestras. Se utilizó dos productos comerciales para la determinación de Epigallocatequina Galato, Agua Cristal Vitality y Té Verde Hindú comprados en el supermercado Carulla.

Estándar. Epigallocatequina Galato (EGCG, mayor o igual 80%). Peso molecular 458,37, fórmula molecular $C_{22}H_{18}O_{11}$, CAS 989-51-5. Producto de Japón.

Solventes. Metanol grado HPLC, agua tipo 1 (conductividad de 0,05 $\mu\text{s}/\text{cm}$ y filtrada por membrana de 0,22 μm), cloroformo, acetato de etilo y ácido fórmico.

1.4.3 Condiciones del método (UPLC-PDA)

Para la determinación de EGCG mediante UPLC-PDA se seleccionó una columna de fase reversa que tiene una combinación ideal de alta eficiencia, mediante un rango de pH amplio y su gran selectividad. Estas características hacen de esta columna la mejor opción para la valoración de nuestro analito de interés EGCG.

Tabla 2. Condiciones del método para la determinación de EGCG mediante UPLC-PDA

Columna	ACQUITY UPLC BEH (Bridged ethyl-siloxane/silica hybrid) C18 130Å, 1.7 µm, 2.1 mm X 100 mm		
Velocidad Flujo	0,500 mL/min		
Volumen de Inyección	1,0 µL		
Temperatura de la Muestra	10°C		
Detector	PDA Detector		
Temperatura de la Columna	30°C		
Eluentes	A: Agua Tipo 1: 0,05%-Acido Fórmico		
	B: Metanol : 0,05%- Acido Fórmico		
Gradiente	Tiempo (min)	A%	C%
	Inicial	90.0	10.0
	2.00	20.0	80.0
	2.50	10.0	90.0
	2.51	90.0	10.0
	4.00	90.0	10.0

1.4.4 Valoración de EGCG

Preparación del Estándar EGCG 1000ppm y Curva de Calibración

En una balanza analítica marca Radwag AS 220, se pesó 10mg del estándar EGCG y se llevó a un balón volumétrico de 10mL. Se aforó con agua tipo 1. De esta solución se prepararon diluciones en serie de las siguientes concentraciones: 150 ppm, 100 ppm, 50 ppm y 30 ppm. Para la obtención de la curva de calibración.

1.4.5 Preparación de las muestras

Té Verde Hindú: En una balanza analítica marca Radwag AS 220, se pesó 500mg del polvo de té verde y se adicionó 10mL de agua tipo 1. Finalmente, se pasó en ultrasonido por 10min a una temperatura de 50°C.

Estándares 60ppm, 150ppm y 200ppm de EGCG: a partir de la solución madre de una concentración de 1000 ppm, se tomó con una micropipeta 600 μL de esta, teniendo en cuenta la ecuación $C_1V_1=C_2V_2$, y se llevó a un balón volumétrico de 10mL. Se aforó con agua tipo 1 y se obtuvo una solución de concentración de 60 ppm. Se realizó el mismo procedimiento para las muestras de soluciones del estándar de EGCG a concentraciones de 150ppm y 200ppm.

1.4.6 Tratamiento de las muestras

Desde un inicio para el tratamiento de la muestra se había propuesto usar la técnica de extracción en fase sólida (SPE), sin embargo se presentaron varios inconvenientes por lo que se decidió usar extracción líquido-líquido.

1.4.6.1 Tratamiento por Extracción Líquido-Líquido

Las muestras que se utilizaron fueron Agua Cristal Vitality con Teavigo y Té Verde Hindú. Se realizó una extracción líquido-líquido con cloroformo y acetato de etilo, en la figura 4 se observa el montaje realizado para el tratamiento de las muestras mediante esta técnica.



Figura 4. Montaje para el tratamiento de las muestras mediante extracción líquido-líquido.

Se utilizó 10 embudos de decantación para realizar el tratamiento de las dos muestras comerciales y de los estándares de concentraciones de 60ppm, 150ppm y 200ppm, por duplicado. En cada embudo se colocó una muestra diferente. Primero, se adiciona 10mL de las muestras en su embudo y 20 mL de cloroformo, se dejó 15 min y posteriormente se recogió la fase acuosa. Se realizó una segunda partición con 20mL de acetato de etilo, se dejó por 15min y se recogió la fase orgánica. Finalmente, se concentran las muestras en el rota-evaporador y se reconstituye con 2mL de metanol grado HPLC.

1.4.6.2 Tratamiento por SPE (Extracción en Fase Sólida)

SPE se caracteriza por ser un método que requiere de instrumentación sencilla, económica y el uso de disolventes es menor. Su función se basa en el empleo de adsorbentes dispuestos en cartuchos o discos, la selección de estos es clave para lograr un tratamiento de muestra adecuado y hacer esta técnica efectiva. La extracción en fase sólida consiste en cuatro etapas que son acondicionamiento, carga de la muestra, lavado y elución (Fontanal et al, 2010).

Para el tratamiento de las muestras se utilizó el cartucho referencia Strata X que es un polímero modificado químicamente con un grupo funcional polar (grupo vinil-pirrolidona). En total se utilizaron seis cartuchos, dos para la muestra de Té Hindú, dos para agua Vitality con Teavigo y dos para el estándar 150ppm.

Etapas 1 Acondicionamiento: La activación del adsorbente y de los grupos funcionales se llevó a cabo al pasar un volumen de 3mL de agua tipo 1 seguido de MetOH.

Etapas 2 Carga: Se adicionó 1mL de cada muestra a cada cartucho, al abrir la llave se tuvo precaución de que el flujo de elución fuera moderado (una velocidad aproximada de 1 gota por segundo).

Etapas 3 Lavado: Para la eliminación de cualquier resto de compuesto sin la eliminación del analito se utilizó 3mL de agua.

Etapas 4 Elución: Como solvente adecuado para la eliminación de la interacción analito-solvente y la elución del 100% del analito, se utilizó metanol-ácido fórmico 0,2% del cual se adicionó a cada cartucho 1mL.

Se recogieron las muestras obtenidas en el paso de elución y mediante un filtro de nylon 0,22µm se filtró 1mL y se adicionó en viales, cada uno con su rótulo respectivo. Finalmente se realizó el corrido de las 6 muestras en UPLC-PDA.

2. RESULTADOS

A continuación se reportan los resultados que permiten evidenciar que la extracción de las muestras en fase líquida-líquida es el tratamiento más adecuado comparado con el tratamiento en fase solida (SPE), para la determinación de EGCG.

2.1 VALORACIÓN DE EGCG

Curva de Calibración. Se obtiene una curva de calibración de 4 puntos con un coeficiente de correlación, $R^2 = 0,995$. Esta curva esta expresada en términos de área bajo la curva contra concentración de EGCG. Las concentraciones empleadas son diluciones obtenidas a partir de un estándar de 1000ppm de EGCG, estas fueron 150ppm, 100ppm, 50ppm y 30ppm.

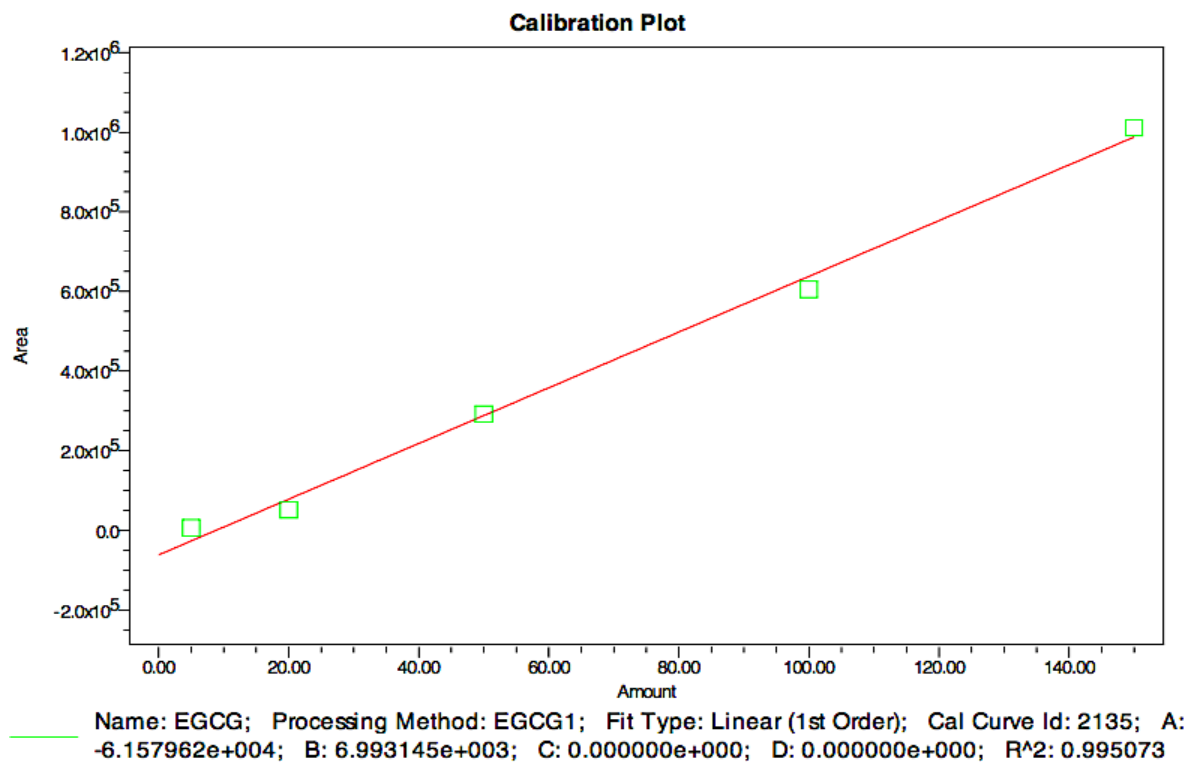


Figura 5. Curva de Calibración de estándar de EGCG

2.2 RESULTADOS DE LA METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE EGCG EN TÉ VERDE MEDIANTE UPLC-PDA CON TRATAMIENTO DE MUESTRA PORSPE

En la tabla 3, se presenta una recopilación de los datos obtenidos para la evaluación de la presencia de EGCG mediante UPLC-PDA, con tratamiento de las muestras mediante extracción en fase solida (SPE). Se encuentran los tiempos de retención, áreas, cantidades (mg/L) y los porcentajes de recuperación obtenidos tanto para las diferentes concentraciones utilizadas de estándar de EGCG como para las muestras comerciales, agua cristal Vitality con TEAVIGO y té Hindú.

Tabla 3. Resultados de la caracterización de EGCG por UPLC-PDA, con tratamiento de las muestras mediante extracción en fase solida (SPE)

	Nombre de la muestra	Detector	Tiempo de Retención	Área	Cantidad (mg/L)	%Recuperación
1	150ppm	Espectro PDA	1,669	1009697	150,000	
2	100ppm		1,666	604575	100,000	
3	50ppm		1,666	291934	50,000	
4	20ppm		1,670	50754	20,000	
5	5ppm		1,668	6365	5,000	
6	Té Hindú		1,663	1634871	242,743	100
7	Té Hindú		1,666	2202632	323,982	112
8	Agua TEAVIGO		1,662	332597	56,405	100
9	Agua TEAVIGO		1,660	151564	30,502	195
10	Agua TEAVIGO sin SPE		1,668	27841	12,799	170

Para la determinación del porcentaje de recuperación se utilizó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Recuperación (A)} = \left(\frac{\text{Área}_{\text{muestra}}}{\text{Área}_{\text{std}}} \times \frac{\text{Concentración}_{\text{std}}}{\text{Concentración}_{\text{muestra}}} \right) \times 100(1)$$

Cromatogramas de las muestras tratadas mediante extracción en fase sólida (SPE). Cada muestra analizada, Té Hindú, Agua Cristal Vitality-TEAVIGO y los estándares se realizaron por duplicado. A continuación se muestra una sola

representación de la caracterización por UPLC-PDA de cada muestra evaluada y en el anexo 1 se encuentra el duplicado de cada una.

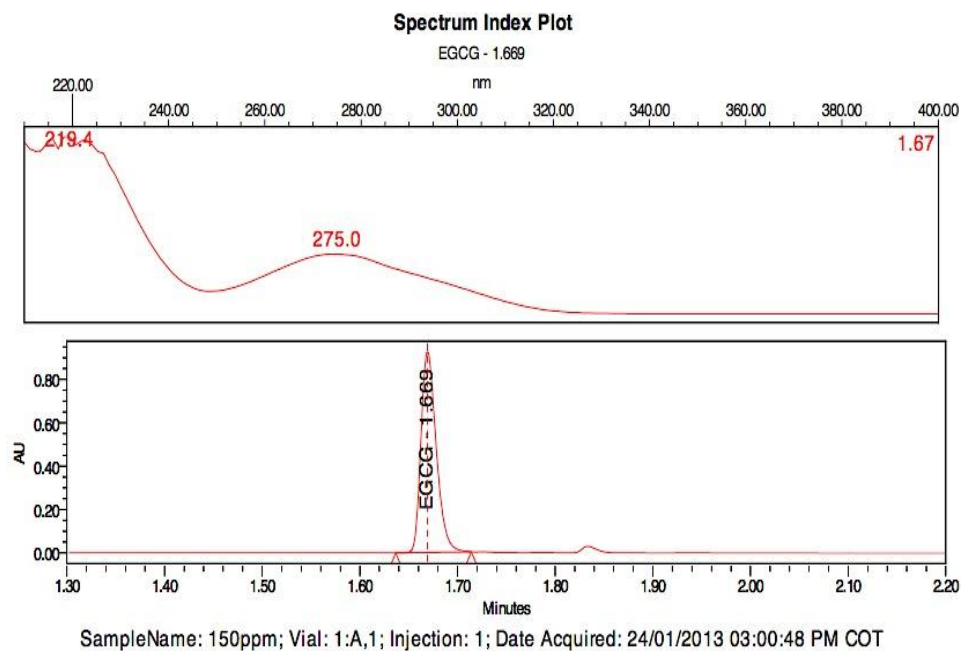


Figura 6. Cromatograma del estándar de EGCG a una concentración de 150ppm.

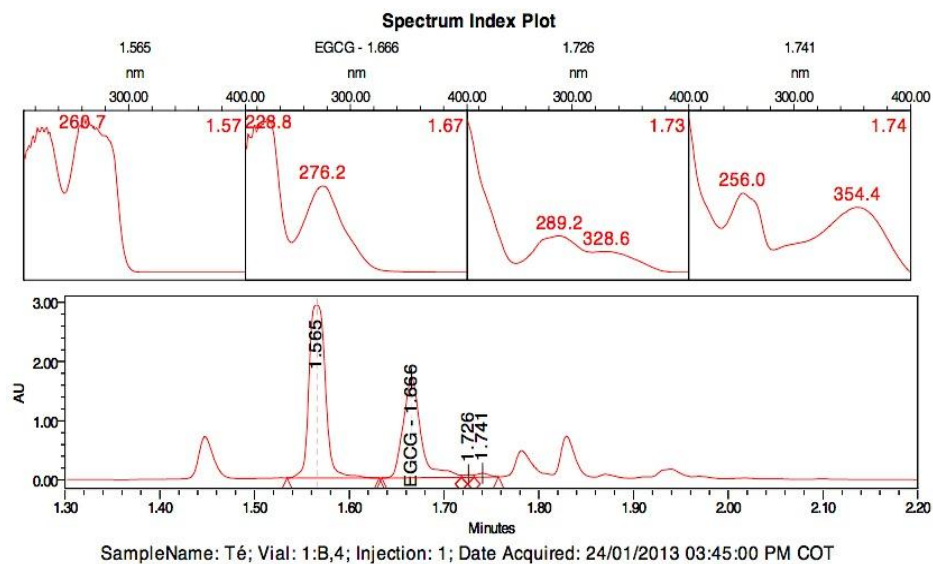


Figura 7. Cromatograma Muestra de Té Verde- Hindú con tratamiento por SPE

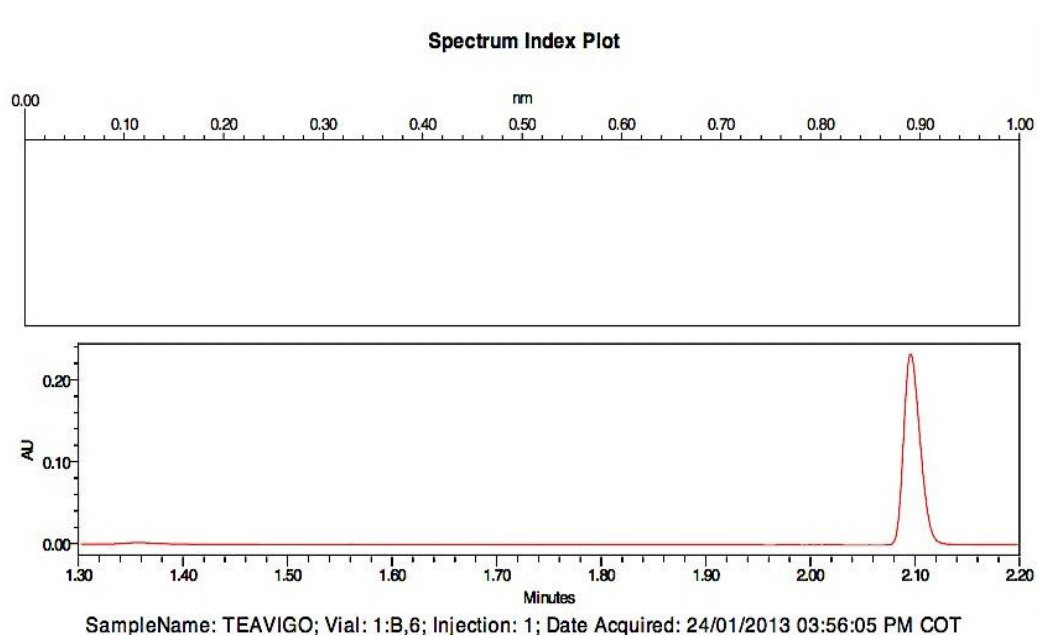


Figura 8. Cromatograma Muestra Agua Cristal Vitality-TEAVIGO con tratamiento por SPE

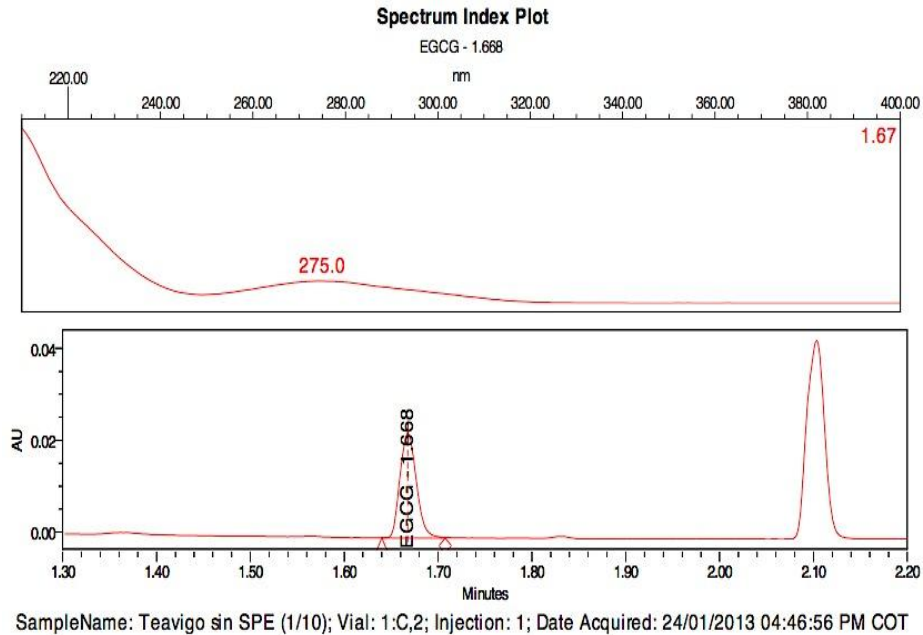


Figura 9. Cromatograma Muestra Agua Cristal Vitality-TEAVIGO sin tratamiento por SPE

2.3 RESULTADOS DE LA METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE EGCG EN TÉ VERDE MEDIANTE UPLC-PDA CON TRATAMIENTO DE MUESTRA POR EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO

En la tabla 4, se presenta una recopilación de los datos obtenidos para la evaluación de la presencia de EGCG mediante UPLC-PDA, con tratamiento de las muestras mediante extracción líquido-líquido. Se encuentran los tiempos de retención, áreas, cantidades (mg/L) y los porcentajes de recuperación obtenidos tanto para las diferentes concentraciones utilizadas de estándar de EGCG como para las muestras comerciales, agua cristal vitality con TEAVIGO y té Hindú.

Tabla 4. Resultados de la caracterización de EGCG por UPLC-PDA, con tratamiento de las muestras mediante extracción líquido-líquido.

	Nombre de la muestra	Detector	Tiempo de Retención	Área	Cantidad (mg/L)	%Recuperación
1	150ppm	Espectro PDA	1,669	1010370	150,000	
2	100ppm		1,666	604986	100,000	
3	50ppm		1,666	292335	50,000	
4	20ppm		1,670	50804	20,000	
5	5ppm		1,668	6380	5,000	
6	Recuperación 60ppm		1,605	314167	53,731	86,8
8	Recuperación 60ppm		1,565	355494	59,640	88,5
9	Recuperación 150ppm		1,582	640167	100,348	94,7
10	Recuperación 150ppm		1,587	645988	101,180	94,7
11	Recuperación 200ppm		1,586	1252053	187,846	98,9
12	Recuperación 200ppm		1,600	1336429	199,911	99,2
13	Agua TEAVIGO		1,585	902834	137,908	97,1
14	Agua TEAVIGO		1,602	880275	134,682	97,0
15	Té Hindú		1,604	4097124	594,683	102,2
16	Té Hindú		1,609	3807695	553,295	102,1

Para la determinación del porcentaje de recuperación se utilizó la ecuación (1).

Cromatogramas de las muestras analizadas tratadas mediante extracción líquido-líquido. Cada muestra analizada, Té Hindú, Agua Cristal Vitality-TEAVIGO y los

estándares se realizaron por duplicado. A continuación se muestra una sola representación de la caracterización por UPLC-PDA de cada muestra evaluada.

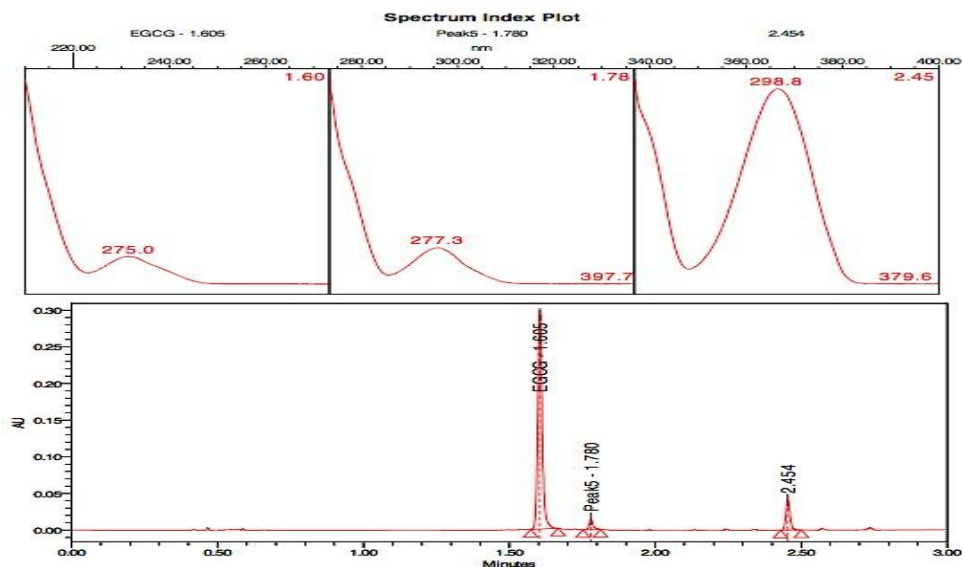


Figura 10. Cromatograma de muestra de recuperación del estándar de EGCG a una concentración de 60ppm tratadas mediante extracción líquido-líquido

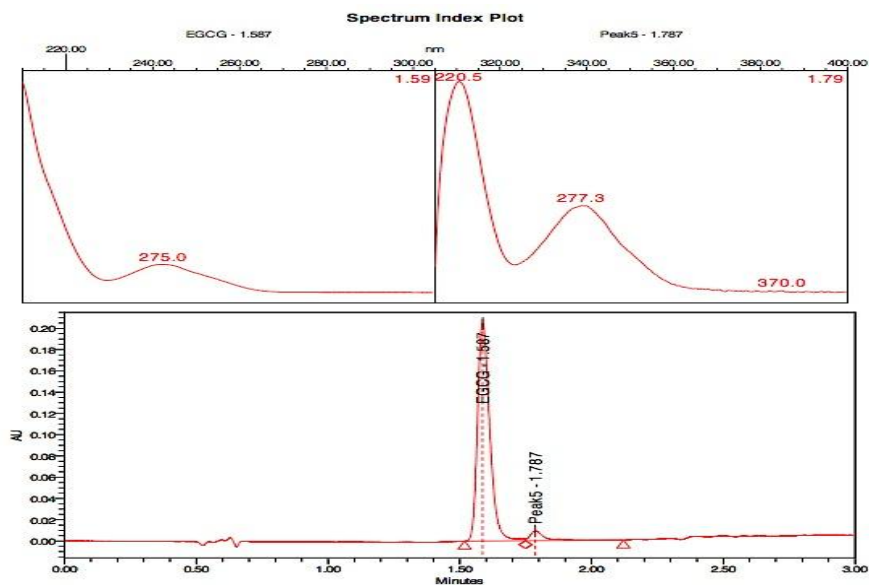


Figura 11. Cromatograma de muestra de recuperación del estándar de EGCG a una concentración de 150ppm tratadas mediante extracción líquido-líquido

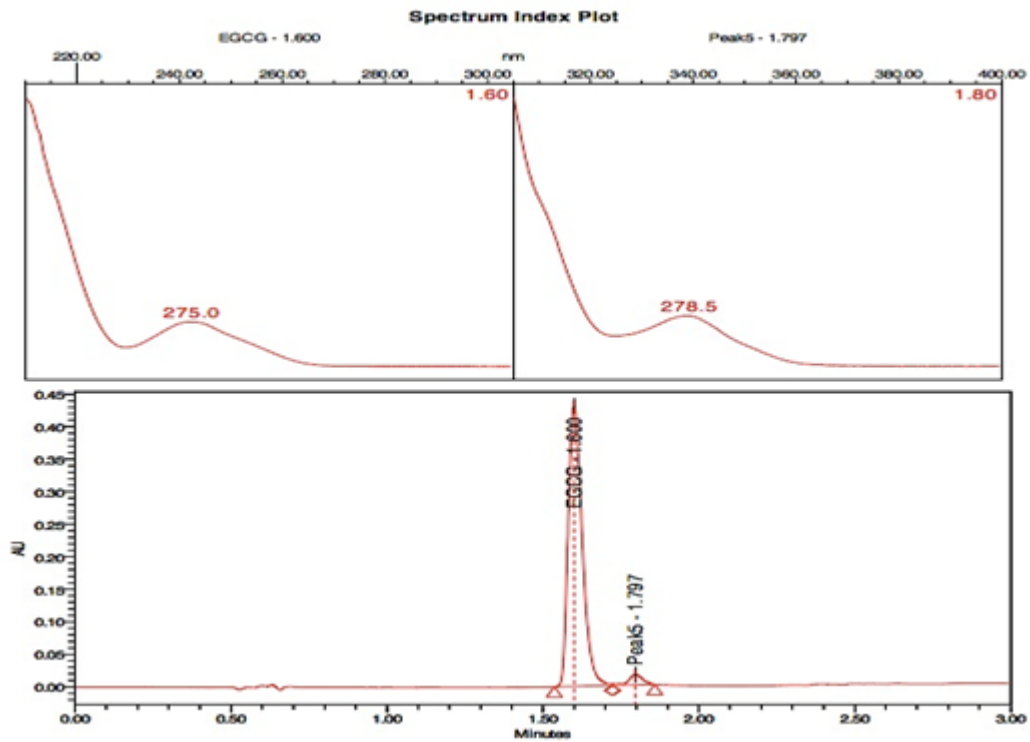


Figura 12. Cromatogramas de muestras de recuperación del estándar de EGCG a una concentración de 200ppm tratadas mediante extracción líquido-líquido.

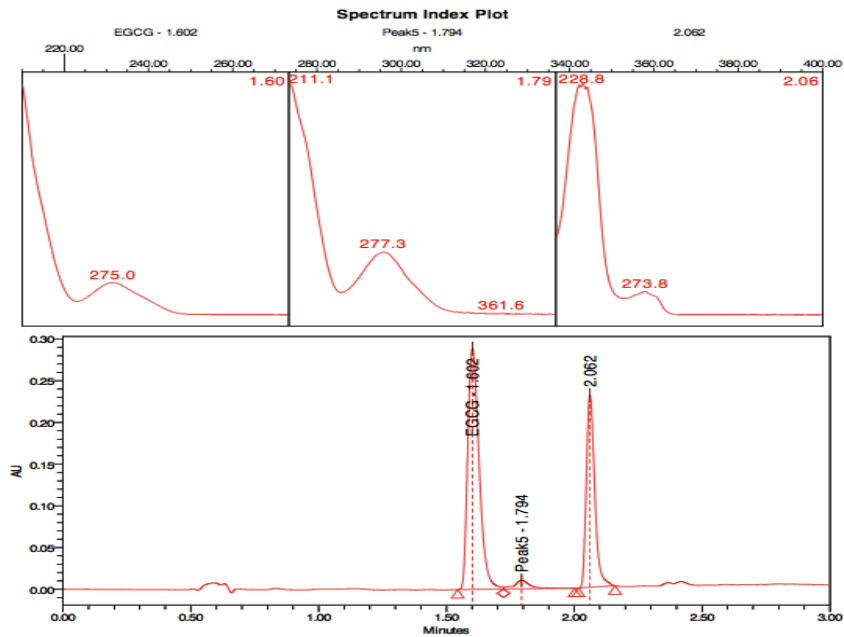


Figura 13. Cromatograma de una Muestra Agua Cristal Vitality con TEAVIGO tratada mediante extracción líquido-líquido

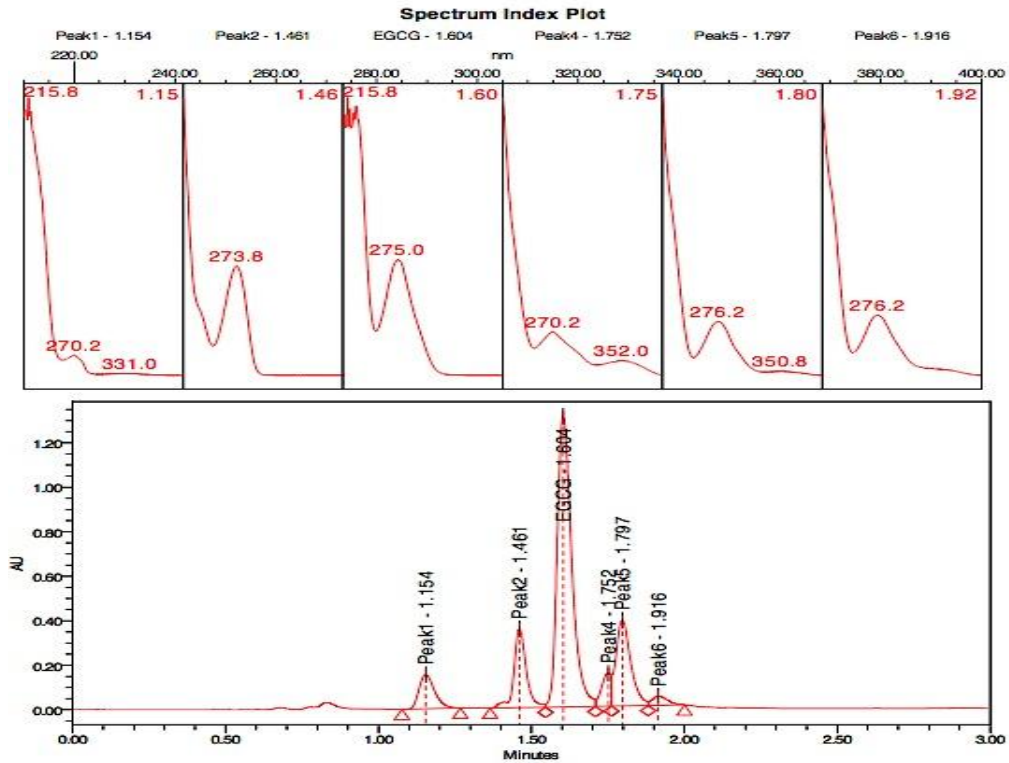


Figura 14. Cromatograma de una Muestra Té Verde– Hindú tratada mediante extracción líquido-líquido.

2.4 COMPARACIÓN HPLC VS UPLC EN LA DETERMINACIÓN DE EGCG

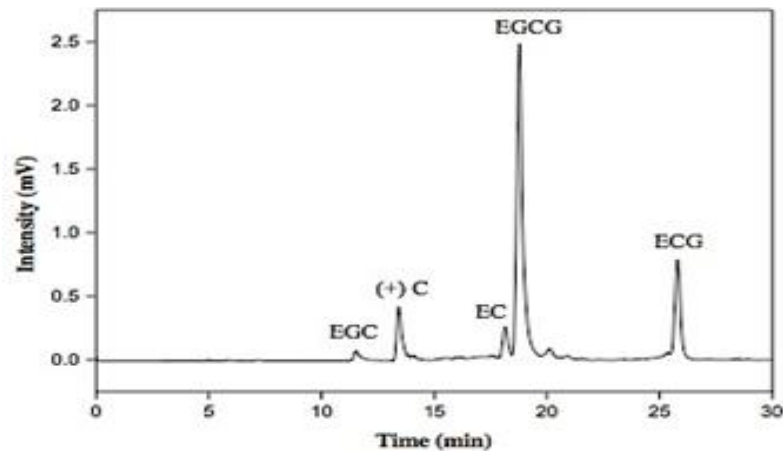


Figura 15. Cromatograma extracción de compuestos de catequinas de té verde chino mediante HPLC.

Fuente: Tomado del artículo Separation of catechin compounds from different teas (Jin et al, 2006)

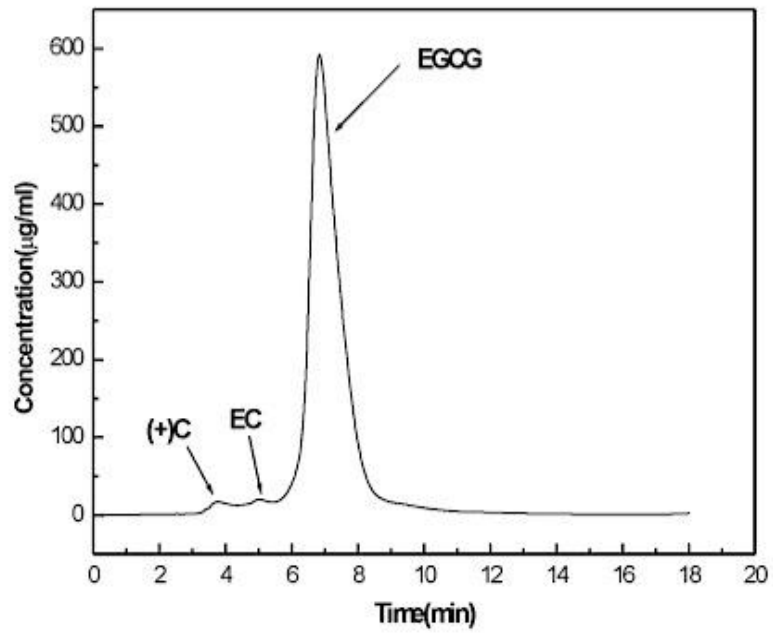


Figura 16. Cromatograma separación EGCG de té verde Korean mediante HPLC.

Fuente: Tomado del artículo Preparative separation of EGCG from Korean Green Tea by High Performance Liquid Chromatography (Hong et al, 2002)

3. DISCUSIÓN

3.1 METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE EGCG EN TÉ VERDE MEDIANTE UPLC-PDA CON TRATAMIENTO DE MUESTRA POR SPE

3.1.1 Tratamiento de la Muestra

En un inicio se planteó que para el tratamiento de la muestra se utilizaría la extracción en fase sólida (SPE) por su capacidad selectiva y la eliminación de cualquier tipo de interferencia de muestras complejas, como el té verde.

Teniendo en cuenta que las catequinas tienen una estructura $C_6-C_3-C_6$ con dos anillos aromáticos y grupos hidroxilos (Figura 1), se decidió usar un cartucho Phenomenex Strata X, el cual es un adsorbente hidrofílicopolimérico clásico poli(estireno-divinilbenceno) (PS-DVB) modificado con grupos pirrolidona (Figura 17). Este tipo de adsorbente se utiliza principalmente para la extracción de compuestos solubles en agua y solventes orgánicos polares, como el analito en estudio (EGCG).

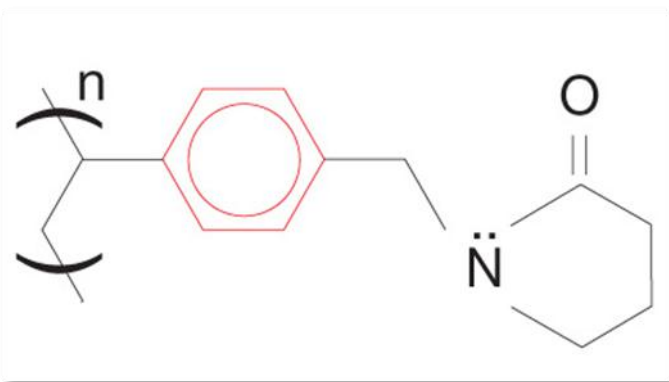


Figura 17. Estructura Química Cartucho Strata X

Fuente: Phenomenex. Strata X. Waters Corporation. Disponible en: <https://phenomenex.blob.core.windows.net/documents/e62d67d8-eef5-42f0-b829-4e188661ab57.pdf>

En la primera etapa se buscó activar los grupos funcionales del adsorbente para lograr que en la etapa posterior, donde se lleva a cabo la carga de la muestra,

exista una interacción entre este y el analito. Para el acondicionamiento del adsorbente Strata X, se seleccionó un solvente de elución que permitió la activación de los ligandos y un solvente que permitió equilibrar la capa del adsorbente estos fueron metanol y agua, respectivamente.

En la segunda etapa donde se lleva a cabo la carga de la muestra, se controló la velocidad del flujo logrando que el analito quede retenido de manera eficaz, y se establezca una interacción tipo Van der Waals entre el analito en estudio y el polímero del cartucho, teniendo en cuenta sus estructuras químicas.

Para la tercera etapa del tratamiento por SPE, lavado, se buscó poder eliminar cualquier tipo de interferencia. De las muestras utilizadas Té Verde Hindú y Agua Cristal Vitality con Teavigo, la más crítica para la eliminación de interferencia es la muestra de té verde Hindú puesto que además de contener catequinas tiene cafeína y teanina, principalmente. Teniendo en cuenta que la solubilidad de estos componentes es similar, se decide usar como solvente de lavado agua, corriendo el riesgo de que una parte del analito se perdiera durante esta etapa.

Se ha reportado que la extracción de catequinas de té usando solo agua resulta en una baja eficiencia comparada con los solventes polares como acetona, etanol o metanol, o una mezcla de estos (Vuong et al, 2010). Finalmente, en la etapa de elución se utilizó como solvente metanol-ácido fórmico 0,2%, para lograr una máxima interacción con el analito y eluir una cantidad considerable de EGCG. Se utilizó un porcentaje de ácido fórmico con el fin de ajustar el pH, teniendo en cuenta que la EGCG tiene en su estructura química muchos grupos hidroxilos que al exponerse a un medio polar pueden formar puentes de hidrogeno y modificar el pH, además se debe tener presente que la EGCG se mantiene estable a un PH menor a 4.

3.1.2 Cromatografía líquida (UPLC)

Para la determinación de EGCG mediante UPLC-PDA se utilizó la columna ACQUITY UPLCBEH (Bridged ethyl-siloxane/silica hybrid), 130Å, 1.7 µm, 2.1 mm X 100 mm debido a que es de fase reversa, su mecanismo de retención se rige por el carácter hidrofóbico del analito, es decir, la interacción es mayor al aumentar el número de grupos apolares. Es necesario tener en cuenta los grupos funcionales polares del compuesto porque aunque las interacciones hidrofóbicas gobiernen la retención, van a ser estos los que favorecen la interacción con la fase móvil. En el caso de la EGCG al tener en su estructura un grupo galato hay un aumento en las interacciones hidrofóbicas, por lo tanto la retención es mayor.

En la tabla 3 se presenta el resumen de los componentes con su respectiva área, tiempo de retención y cantidad. Las concentraciones se obtuvieron a partir de la curva de calibración realizada mediante la dilución de cinco concentraciones (20ppm, 50ppm, 20ppm y 5ppm) del stock de EGCG 1000ppm. En la Figura 5, se observa que la curva de calibración presenta una respuesta lineal con un coeficiente de correlación, $R^2 = 0,995$.

Se presentan varios cromatogramas que permiten realizar un análisis cualitativo sobre la presencia del analito de interés. La posición de los picos sobre el eje del tiempo permite identificar el componente a analizar. En la Figura 6, que corresponde al estándar de 150 ppm tratado bajo las mismas condiciones que las muestras, se observa un pico con un tiempo de retención de 1,669 min que corresponde a nuestro analito de interés EGCG, por lo tanto se tomó como referencia para el análisis de las muestras de Té Hindú y Agua Cristal Vitality con TEAVIGO.

En la Figura 7, que corresponde a la muestra de Té Hindú se observó varios picos, uno de ellos se encuentra a un tiempo de retención de 1,666min y corresponde a la EGCG, cercano al tiempo de retención del estándar de 150ppm. También se puede comprobar que para ambos cromatogramas el espectro ultravioleta indica que los picos se encuentran a una absorción de 275nm (Figura 6 y 7).

En un tiempo de retención menor que el de EGCG, se observa un pico con una absorbancia mayor (Figura 7). Este puede indicar dos posibilidades, la primera puede tratarse de que la EGCG no es el componente mayoritario en esta infusión de té verde hindú, y la segunda puede indicar que no se está recuperando una cantidad considerable de este. Existen diferentes tipos de catequinas, las que más sobresalen por encontrarse en una proporción mayor respecto a las otras son EGC, ECG y EC, por lo tanto se podría pensar que este pico se puede tratar de uno de estos tipos de catequina.

En la farmacopea de los Estados Unidos (USP 36-NF-31), en el capítulo de Suplementos Dietarios se encuentra información sobre las pruebas de identificación, composición, y pruebas específicas para *Extracto en Polvo de Té Verde Descafeinado*. Para la determinación de polifenoles se establecen los parámetros y las condiciones del sistema cromatográfico y se reportan los tiempos de retención relativos (RRT) aproximados para la identificación de los polifenoles. El RRT permite hacer una estimación cualitativa sobre la presencia de diferentes analitos, en este caso se utilizó para comparar y establecer la identidad de los diferentes tipos de catequinas.

Para establecer un análisis cualitativo sobre la identidad del pico desconocido de la muestra de té verde hindú (Figura 7), se tomó como referencia el tiempo de retención del analito principal EGCG, 1,666 min, y se multiplicó por el tiempo de retención relativo que corresponde a este analito. El valor obtenido se multiplicó

por los tiempos de retención relativos de los demás polifenoles y se comparó con el tiempo de retención 1,565 min del pico desconocido para poder establecer su identidad (USP 36, Capitulo <621>). De acuerdo a los resultados de la tabla 5, el tiempo de retención que más se aproxima es el de la (-)-Epicatequina (EC), 1.632 min, por lo tanto en esta infusión de té verde hindú se pudo observar también la presencia de la EC.

Tabla 5. Comparación de tiempo de retención relativo aproximado para polifenoles con la Figura 7, para la identificación del pico con un tiempo de retención 1,565 min

Analito	Tiempo De Retención Relativo (USP 36)	Tiempo de Retención Calculado (x 1,666 EGCG)	Tiempo de Retención del Pico Desconocido (Figura 4b)
(-)-Epigallocatequina	0,56	0,932	
(+)-Catequina	0,68	1,132	
(-)-Epicatequina	0,98	1,632	1,565
(-)-Epigallocatequin-3-O-galato	1,00	1,666	
(-)-Galocatequin-3-O-galato	1,09	1,816	
(-)-Epigallocatequin-3-O-(3'-O-metil)-galato	1,19	1,982	
(-)-Epicatequin-3-O-galato	1,27	2,115	

Fuente: USP 36. (2013). Suplementos Dietéticos: Extracto en Polvo de Té Verde Descafeinado. 1767-1768

Con las Figuras 8 y 9 se puede determinar que los resultados no fueron los esperados. En la Figura 8 que corresponde a la muestra de Agua Cristal Vitality con TEAVIGO tratada mediante SPE, se observa un pico desconocido con un tiempo de retención de 2,1min y no se observa el pico representativo de EGCG. Con el fin de confirmar que algo estaba pasando durante el tratamiento de las muestras por SPE, se decide evaluar la muestra de Agua Cristal Vitality con TEAVIGO sin tratamiento por SPE, en el cromatograma se observa la presencia del pico de EGCG, además del pico desconocido a un tiempo de retención de 2,1min (Figura 9).

Teniendo en cuenta estos resultados se realiza varios experimentos, donde se evalúa cada una de las etapas del tratamiento por SPE, se tomaron los lavados para comprobar si durante esta etapa se estaba perdiendo EGCG y se evaluó la carga para determinar si el cartucho estaba o no reteniendo el analito (Anexo 2). Se llega a la conclusión que el analito durante la etapa de elución no se estaba

recuperando totalmente, es decir, este puede estar retenido en el cartucho o las condiciones establecidas para este tratamiento no fueron las adecuadas.

3.2 METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE EGCG EN TÉ VERDE MEDIANTE UPLC-PDA CON TRATAMIENTO DE MUESTRA POR EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO

Tras una nueva revisión bibliografía se decide cambiar el tratamiento de las muestras y utilizar extracción líquido-líquido, se tuvo precaución con esta técnica debido a que generalmente está sujeta a variabilidad, lo que implica que en caso de realizar la validación de la metodología habría menor reproducibilidad y especificidad en los resultados. Basado en los artículos Separation of catechin compound from different teas (Jin et al, 2006), Preparative separation of EGCG from Korean Green tea by high performance Liquid chromatography (Hong et al, 2002) y Separation of Epigallocatechin gallate from Korean Green tea by RP-HPLC (Kang et al, 2000), se selecciona como solventes para el tratamiento mediante extracción líquido-líquido, cloroformo y acetato de etilo.

Se usó la partición de cloroformo con cada muestra y tres estándares (60ppm, 150ppm y 200ppm), para eliminar las posibles impurezas o componentes diferentes a las catequinas. Después de esto se realizó otro paso de partición utilizando acetato de etilo, donde se esperó que los compuestos de catequina como EGC, C, EGCG Y ECG migren hacia esta fase. Finalmente se filtraron y se recogieron las fracciones en viales para su caracterización mediante UPLC-PDA.

Para los estándar 60ppm, 150ppm y 200ppm se realizó el mismo tratamiento de extracción líquido-líquido de las muestras, con el fin de poder establecer una comparación y caracterización de estas. Para estas recuperaciones del estándar de EGCG se obtuvo porcentajes de recuperación de 88,5%, 94,7% y 99,2%, respectivamente (Tabla 4).

Para las muestras de Té Verde Hindú y Agua Cristal Vitality con TEAVIGO, se obtienen cromatogramas donde se observa el pico de EGCG. En la muestra de Té verde Hindú se observa que este pico es de una absorbancia mayor respecto a los otros picos, por lo tanto se logra recuperar una cantidad considerable (Figura 14). Para la muestra Agua Cristal Vitality con TEAVIGO, nos encontramos con dos picos, uno referente a la EGCG y otro pico desconocido con un tiempo de retención 2,1min (Figura 13).

En la figura 13 y 14 se presenta el espectro ultravioleta de EGCG para cada cromatogramas con un máximo de absorción de 275nm, obtenido con el detector

PDA. Este valor se encuentra dentro del rango establecido para la detección de catequinas que es entre 269 a 280nm (Vuong et al, 2010).

Teniendo en cuenta los tiempos de retención relativos aproximados para los polifenoles, establecidos en la USP 36 para Té verde, se puede hacer una aproximación sobre los otros tipos de catequinas presentes en la infusión de Té Verde Hindú. De acuerdo a los tiempos de retención obtenidos, teniendo como referencia el pico de EGCG con un tiempo de retención de 1,604 min y comparando con los tiempos de retención del cromatograma de la muestra de té verde Hindú (Figura 14), se podría establecer la presencia de (+)-catequina, (-)-Epicatequina, (-)-Galocatequina-3-O-galato y (-)-Epigalocatequin-3-O-(3'-O-metil)-galato (Tabla 6).

Tabla 5. Comparación de tiempo de retención relativo aproximado para polifenoles con la Figura 14, para la identificación de las posibles catequinas presentes en el Té Verde Hindú.

Analito	Tiempo De Retención Relativo (USP 36)	Tiempo de Retención Calculado (x 1,604 min EGCG)	Tiempos de Retención Muestra Té Verde Hindú (Figura 12)
(-)-Epigalocatequina	0,56	0,898	
(+)-Catequina	0,68	1,091	1,154
(-)-Epicatequina	0,98	1,571	1,461
(-)-Epigalocatequin-3-O-galato	1,00	1,604	
(-)-Galocatequin-3-O-galato	1,09	1,748	1,752
(-)-Epigalocatequin-3-O-(3'-O-metil)-galato	1,19	1,908	1,916
(-)-Epicatequin-3-O-galato	1,27	2,037	

Fuente: USP 36. (2013). Suplementos Dietéticos: Extracto en Polvo de Té Verde Descafeinado. 1767-1768

En los cromatogramas de las muestras de recuperación del estándar de EGCG, y de las muestras Té Verde Hindú y Agua Cristal Vitality se observa un pico común a un tiempo de retención de 1,7min, teniendo en cuenta los tiempos de retención relativos y tomando como referencia el pico principal EGCG a un tiempo de retención de 1,6min, se puede establecer que este pico indica la presencia de (-)-Galocatequin-3-O-galato. Se ha encontrado que la GCG solo representa 1,5% de las catequinas totales en el té verde, sin embargo, puede alcanzar el 50% de las

catequinas totales, en especial en las bebidas de té debido a la conversión térmica de la EGCG (Figura 3) (Yu-Chen et al, 2001).

En las figuras 8, 9 y 13 se observó la presencia de un pico desconocido a un tiempo de retención de 2,1min, tanto para la metodología establecida con el tratamiento mediante SPE como para la metodología con extracción líquido-líquido. Estas Figuras corresponden a la muestra de Agua Cristal Vitality con TEAVIGO, lo que significa que se estaba tratando una matriz pura que el único componente que tenía era EGCG. Teniendo en cuenta el artículo Degradation of Green Tea Catechins in Tea Drinks (Chen et al, 2001) donde evalúan la estabilidad de las catequinas en las bebidas embotelladas, se podría pensar que este pico se generó por la degradación de EGCG, sin embargo teniendo como referencia el tiempo de retención relativo de GCG, su epímero correspondiente, no se comprueba de que se trata de este analito. La estabilidad de las catequinas en estas bebidas aún se desconoce, solo se ha demostrado que el pH es un factor crítico que influye en su estabilidad, por ejemplo las bebidas con pH inferior a 4,5 durante 3 meses, conservan la mitad de las catequinas.

Este pico con un tiempo de retención 2,1 min, también se podría tratar de un tipo de oxidación de esta catequina, es decir podría indicar la presencia de Teaflavinas. Sin embargo, la presencia de este polifenol es mucho mayor en el té negro debido al proceso de fermentación donde la enzima PPO se activa y produce una oxidación y polimerización de las catequinas dando origen no solo a las Teaflavinas, sino también a estructuras más complejas como las Terubiginas. Dependiendo del tiempo de fermentación, el té oolong y el té negro tienen niveles muy bajos de catequinas y muy altos en Teaflavinas.

Las condiciones establecidas tanto para el tratamiento de la muestra, mediante extracción líquido-líquido, como los parámetros para la valoración mediante UPLC-PDA fueron satisfactorias, se logra separar y recuperar cantidades considerables de EGCG en las muestras analizadas. En los productos comerciales Agua Cristal Vitality con TEAVIGO y la infusión de Té Verde Hindú, se observa concentraciones altas de EGCG, en la muestra de Agua Cristal Vitality se obtuvo una concentración de aproximadamente 137 mg/L y para la infusión de Té verde Hindú de aproximadamente 594 mg/L.

Sin embargo, se observa una posible degradación del analito lo que indica que es un método complejo que debe tener en cuenta factores críticos como temperatura, humedad, pH y tiempo de extracción para no afectar la estabilidad de EGCG. A pesar de que el tratamiento de la muestra por extracción líquido-líquido es una técnica que presenta mucha variabilidad, y en caso de querer validar la metodología no se obtendría reproducibilidad en los resultados, se pudo comprobar que la valoración mediante UPLC-PDA tiene un efecto positivo en la eficiencia y en los tiempos de análisis.

Se toman dos cromatogramas de separación EGCG de té verde realizados mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) (Figura 15 y 16), y se compara con el cromatograma de muestra de Té verde Hindú realizado mediante Ultra-Cromatografía Líquida De Alto Rendimiento (UPL-PDA) (Figura 14). Con la evaluación visual de estos cromatogramas se encontró que la mayor diferencia se presenta en los tiempos de retención obtenidos para la EGCG. En la Figura 15, que corresponde a el cromatograma de extracción de compuestos de catequinas de té verde chino mediante HPLC, se observa que el pico de EGCG se obtiene a un tiempo de retención de aproximadamente 18min; para el cromatograma de la Figura 16, separación EGCG de té verde Korean mediante HPLC, en el cual realizaron un tratamiento de muestra similar al planteado se observa un tiempo de retención de 7 min; y por ultimo para el cromatograma de la muestra de té Hindú mediante UPLC-PDA, se obtuvo un pico de EGCG a un tiempo de 1,6min (Figura 14).

Por lo tanto, se puede determinar que si se realiza un tratamiento de muestra efectivo y que sea un buen complemento para la valoración mediante UPLC-PDA se lograría el objetivo planteado, que es separar EGCG y evaluar su presencia en productos comerciales, de manera específica y en tiempos de análisis cortos.

4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el trabajo indicaron, que un buen tratamiento de las muestras sería un buen complemento para la separación y caracterización de EGCG mediante UPLC-PDA. El tratamiento que se planteó desde un inicio mediante extracción en fase sólida, presento inconvenientes en la obtención de EGCG debido a que no se logra eliminar la interacción entre el analito y el adsorbente seleccionado, Strata X, en la etapa de elución.

Las condiciones establecidas para la valoración cromatográfica permitieron realizar una interpretación cualitativa de los cromatogramas y teniendo como referencia el estándar de EGCG a diferentes concentraciones, se observa el pico de EGCG con un tiempo de retención de 1,6 min, y en el espectro UV se observa un máximo de absorción de 275nm.

En las muestras comerciales, Agua Cristal Vitalityy Té verde Hindú se logró obtener cantidades considerables de EGCG, 137 mg/L y 594 mg/L respectivamente.

5. RECOMENDACIONES

Realizar estudios para la evaluación del efecto del pH, temperatura y tiempo de extracción en la determinación de EGCG, para así encontrar un tratamiento de muestra efectivo, y que junto con UPLC-PDA se logre separar y cuantificar EGCG en diferentes muestras.

Una vez se logre obtener las condiciones adecuadas para un tratamiento de muestra eficiente y una valoración mediante UPLC-PDA, se recomienda realizar una estandarización y validación de la separación de EGCG para así poder contar con una herramienta confiable que permita realizar la determinación de este analito en diferentes productos comerciales, esto teniendo en cuenta los beneficios que tiene este metabolito en la salud de las personas.

BIBLIOGRAFIA

- Álvarez, J., Botero, D., Suárez, R., Zapata, G., Malaver, N. & Rivera, H. (2011). *Análisis de la industria del té y las aromáticas en Colombia* (103). Recuperado del sitio de internet de Universidad del Rosario, Facultad de Administración:
<http://www.urosario.edu.co/Administracion/ur/Investigacion/ur/Documentos-de-investigacion/>
- Bonoli, M., Pelillo, M., Gallina, T. & Lercker, G. (2003). Analysis of Green tea catechins: comparative study between HPLC and HPCE. *Food Chemistry*, *81*(1), 631-638.
- Bronner, W. & Beecher, G. (1998). Method for determining the content of catechins in tea infusions by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, *805*(1), 137-142.
- Bose, M., Lambert, J., Ju, J., Reuhl, K., Shapses, S. & Yang, C. (2008). Major Green Tea Polyphenol, (-)-Epigallocatechin-3-Gallate, Inhibits Obesity, Metabolic Syndrome, and Fatty Liver Disease in High-Fat-Fed Mice. *J. Nutr.*, *138* (9), 1677-1638.
- Bum, S., IL, J. & Ho, K. (2002). Preparative separation of EGCG from Korean Green tea by high performance liquid chromatography. *Separation science and technology*, *37*(7), 1631-1640
- Bustos, J. (2013, 11 de marzo). Comportamiento de las bebidas en los últimos tempos (Web log post). Recuperado de <http://jovbus3.blogspot.com/2013/03/comportamiento-de-las-bebidas-en-los.html>
- El té es la segunda bebida más consumida en el mundo (2013). *Cronica.com.mx*. Recuperado de <http://www.cronica.com.mx/notas/2013/778427.html>
- Chen, Z., Yan, Q., Tsang, D. & Huang, Y. (2001). Degradation of Green Tea Catechins in Tea Drinks. *J. Agric. Food Chem*, *49*, 477-482.
- Dalluge, J. & Nelson, B. (2000). Determination of tea catechins. *Journal of Chromatography A*, *881*, 411-424

- El-Shahawi, M., Hamza, A., Bahaffi, S., Al-Sibaai, A. & Abduljabbar, T. (2012). Analysis of some selected catechins and caffeine in Green tea by high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 134(1), 2268-2275.
- Fontanals, N., Marcé, R. & Borrull, F. (2010). Tendencias en sorbentes poliméricos para la extracción en fase sólida de compuestos polares. *SECYTA*, 31(1).
- Jin, Y., Jin, C. & Ho, K. (2006). Separation of catechin compounds from different teas. *Biotechnology journal*, 1, 209-213.
- Jin, Y. & Ho, K. (2007). Solid-Phase Extraction of Caffeine and Catechin Compounds from Green Tea by Caffeine Molecular Imprinted Polymer. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 28(2), 276-280
- Jo, W., Hee, M., Won, G., Ho, J. & Jin, Y. (2005). Determination of Catechin Compounds in Korean Green Tea Infusions under Various Extraction Conditions by High Performance Liquid Chromatography. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 26(5), 747-754
- Kang, J., Chung, S., Go, H. & Row, K. (2000). Separation of Epigallo catechin Gallate from Korean Green tea by RP-HPLC. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 23(17), 2739-2749.
- Krincun, P. Contenido de catequinas en cultivares argentinos de té (*Camelia sinensis*), elaborados como té verde Sencha. *RIA*, 37(3), 249-255.
- Li, N., Taylor, L. & Mauer, L. (2011). Degradation Kinetics of catechins in green tea powder: Effects of Temperature and Relative Humidity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 6082-6090.
- Neilson, A., Green, R., Wood, K. & Ferruzzi, M. (2006). High-throughput analysis of catechins and theaflavins by high performance liquid chromatography with diode array detection. *Journal of Chromatography A*, 1132, 132-140.
- Nishitani, E. & Sagesaka, Y. (2004). Simultaneous determination of catechins, caffeine and other phenolic compounds in tea using new HPLC method. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17, 675-685.
- Prakash, V. & Prakash I. (2011). The aroma, taste, color and bioactive constituents of tea. *Journal of Medicinal Plants Reserch*, 5(11), 2110-2124.

- Pelillo, M., Biguzzi, B., Bendini, A., Gallina, T., Vanzini, M. & Lercker, G. (2002). Preliminary investigation into development of HPLC with UV and MS-electrospray detection for the analysis of tea catechins. *Food Chemistry*, 78(1), 369-374.
- Peña, A. (2011). *Estudio De Sistemas De Extracción En Fase Sólida Para Su Aplicación En La Determinación Del Plaguicida Dimetoato*. Universidad Politécnica de Valencia, España.
- Phenomenex. Strata X. Waters Corporation. Disponible en: <https://phenomenex.blob.core.windows.net/documents/e62d67d8-eef5-42f0-b829-4e188661ab57.pdf>
- Rezai-Zadeh, K., Shytle, D., Sun, N., Mori, T., Hou, H., Jeanniton, D., Ehrhart, J., Townsend, K., Zeng, J., Morgan, D., Hardy, J., Town, T. & Tan, J. (2005). Green Tea Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) Modulates Amyloid Precursor Protein Cleavage and Reduces Cerebral Amyloidosis in Alzheimer Transgenic Mice. *The Journal of Neuroscience*, 25(38), 8807-8814.
- Raederstorff, D., Schlachter, M., Elste, V. & Weber, P. (2003). Effect of EGCG on lipid absorption and plasma lipid levels in rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 14(6), 326-332.
- Swartz, M. (2005). UPLC: An Introduction and Review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 28, 1253-1263.
- Swartz, M. (2005). Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC): An Introduction. *Separation Science Redefined*. Recuperado de www.chromatographyonline.com/.../article.pdf
- TEAVIGO. (2013). Beneficios para la salud del extracto de té verde. Obtenido de http://www.teavigo.com/Beneficios_para_la_salud.aspx
- USP 36. (2013). Suplementos Dietéticos: Extracto en Polvo de Té Verde Descafeinado. 1767-1768
- USP 36. (2013). Cromatografía. *Relative Retention Time (RRT)*. Capítulo <621>
- Vuong, Q., Golding, J., Nguyen, M. & Roach, P. (2010). Extraction and isolation Of catechins from tea. *J. Sep. Sci.*, 33 (1), 3415-3428.
- Vidal, L. (2009). *Desarrollo Y Evaluación De Nuevas Estrategias Para La Miniaturización De La Preparación De La Muestra*. Universidad de Alicante, Alicante, España.

- Wang, K., Liu, Z., Huang, J., Dong, X., Song, L., Pan, Y. & Liu, F. (2008). Preparative isolation and purification of theaflavins and catechins by high-speed counter current chromatography. *Journal of Chromatography B*, 867, 282-286.
- Wang, L., Xu, R., Hu, B., Li, W., Sun, Y., Tu, Y. & Zeng, X. (2010). Analysis of free amino acids in Chinese teas and flower of tea plant by high performance liquid chromatography combined with solid-phase extraction. *Food Chemistry*, 123, 1259-1266.
- Wang, H. & Helliwell, K. (2000). Epimerisation of catechins in Green tea infusions. *Food Chemistry*, 70(1), 337-344.
- WATERS. (2013). *ACQUITY UPLC PDA eλ Detector*. Obtenido de http://www.waters.com/waters/es_ES/ACQUITY-UPLC-PDA-e%CE%BB-Detector/nav.htm?cid=10013843&locale=es_ES
- Zuo, Y., Chen, H. & Deng, Y. (2002). Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in Green, Oolong, black and pu-erh teas using HPLC with a photodiode array detector. *Talanta*, 57(1), 307-316.

ANEXOS

Anexo 1: Cromatogramas de muestras de recuperación del estándar tratada mediante extracción en fase sólida (SPE)

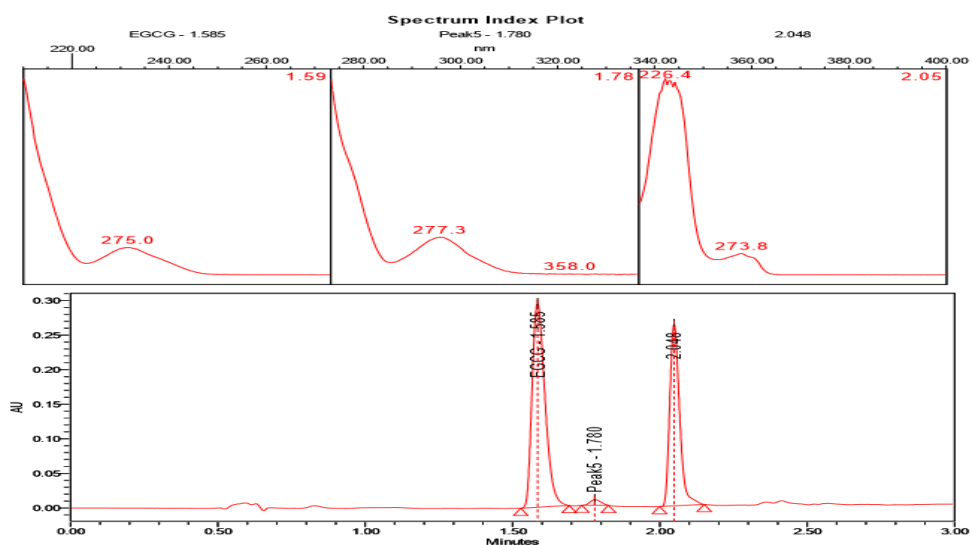


Figura 1. Cromatograma de una Muestra Agua Cristal Vitality con TEAVIGO tratada mediante extracción líquido-líquido

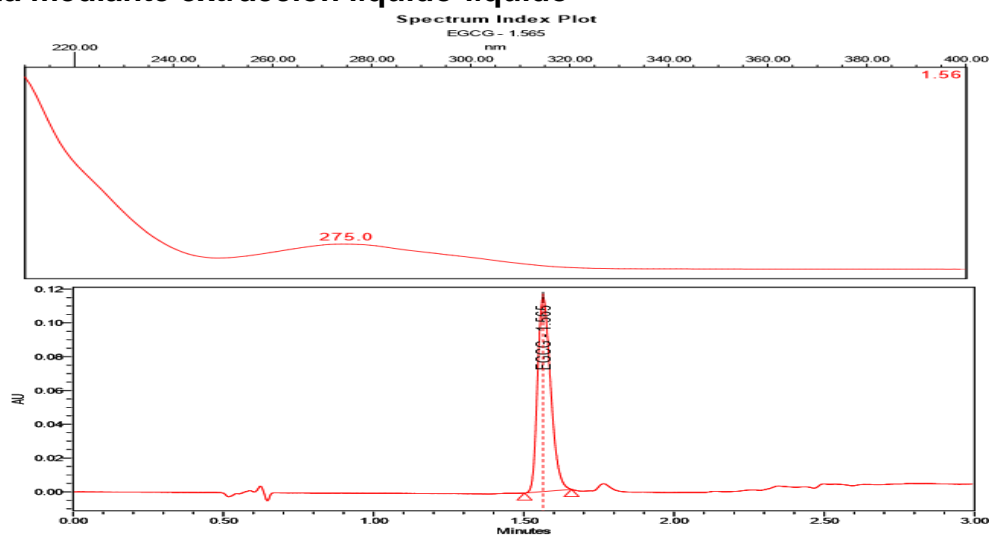


Figura 2. Cromatogramas de muestras de recuperación del estándar de EGCG a una concentración de 60ppm tratadas mediante extracción líquido-líquido

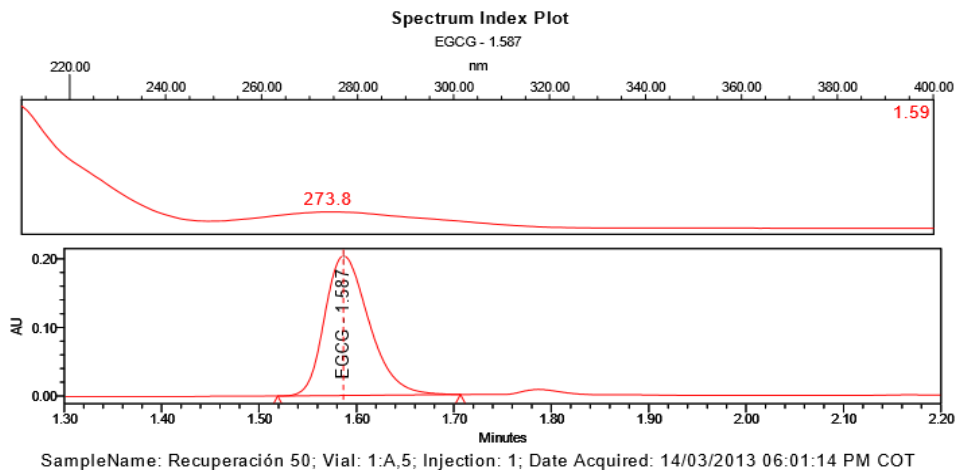


Figura 3. Cromatogramas de muestras de recuperación del estándar de EGCG a una concentración de 150ppm tratadas mediante extracción líquido-líquido

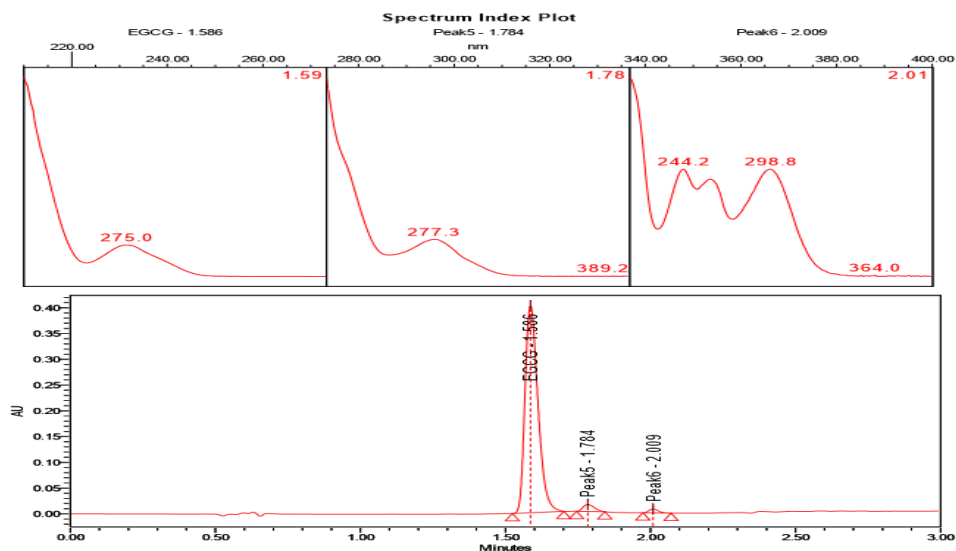


Figura 4. Cromatograma de muestras de recuperación del estándar de EGCG a una concentración de 200ppm tratadas mediante extracción líquido-líquido.

Anexo 2. Estudios realizados mediante extracción en fase solida (SPE)

A continuación se reportan los estudios realizados para el tratamiento mediante extracción en fase solida (SPE), sobre los lavados y cargas de las muestras. Esto con el fin de establecer si durante estas etapas se estaba perdiendo nuestro analito de interés EGCG.

ETAPA 2: CARGA DE LAS MUESTRAS

Se realizó la evaluación sobre la muestra de Agua Cristal con TEAVIGO y sobre el estándar de 150ppm. Una vez se realizó la carga de la muestra se evaluó la solución recogida, con el fin de establecer si el adsorbente y el analito estaba estableciendo interacciones químicas o simplemente el analito no era retenido.

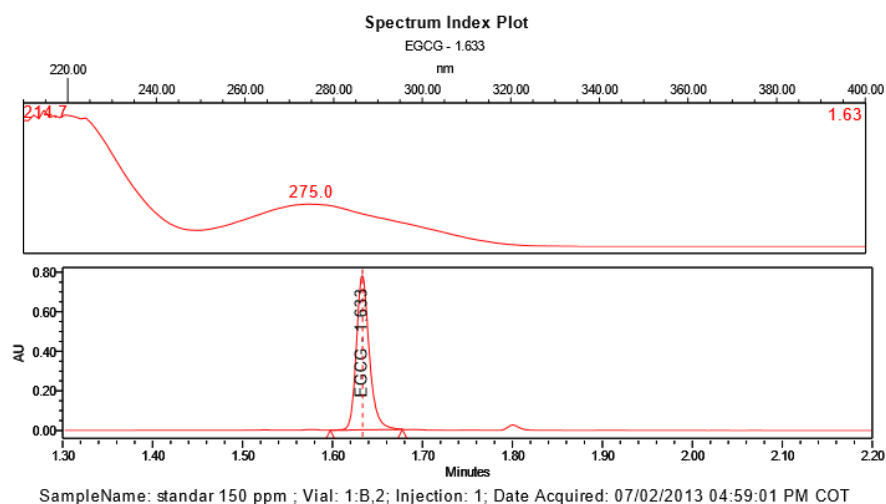


Figura 1. Cromatograma del estándar de EGCG a una concentración de 150 ppm

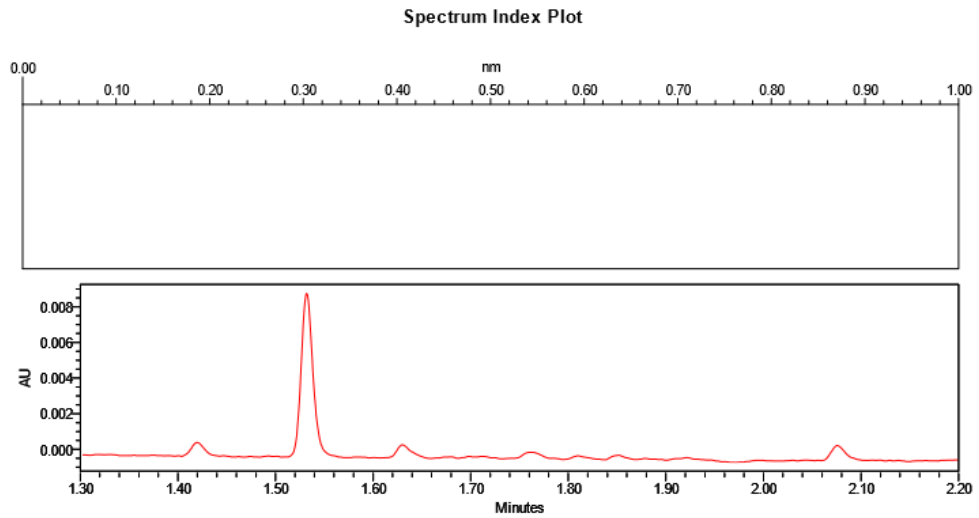


Figura 2. Cromatograma de la carga de la muestra del estándar de EGCG a una concentración de 150 ppm tratado mediante extracción en fase solida (SPE)

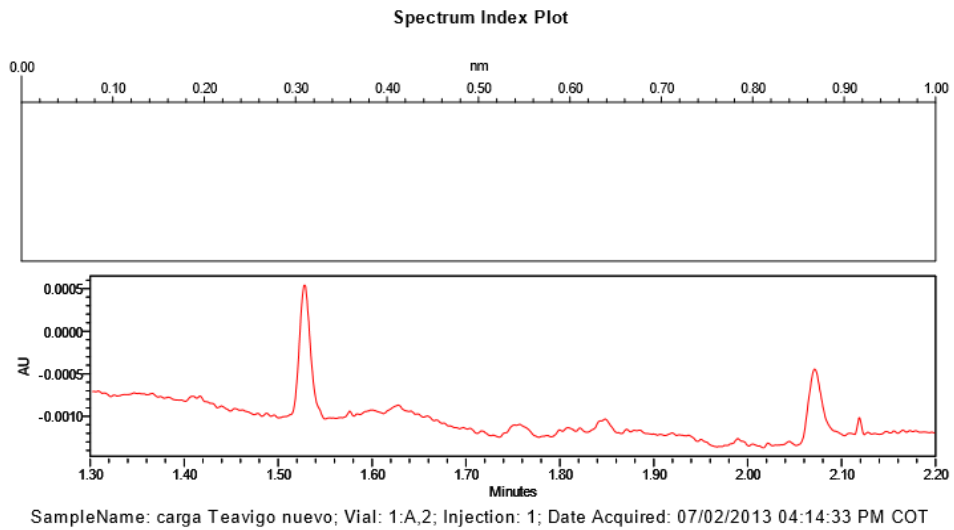


Figura 3. Cromatograma de la carga de la muestra de agua cristal con TEAVIGO tratado mediante extracción en fase solida (SPE)

ETAPA 3: LAVADO DE LAS MUESTRAS

Se realizó la evaluación sobre la muestra de Agua Cristal con TEAVIGO, Té verde Hindú y sobre el estándar de 150ppm. Una vez se realizó la etapa de lavado se evaluó la solución recogida, con el fin de establecer si durante esta etapa al utilizar agua como solvente para la eliminación de las interferencias, también se estaba perdiendo EGCG teniendo en cuenta que este es soluble en soluciones acuosas.

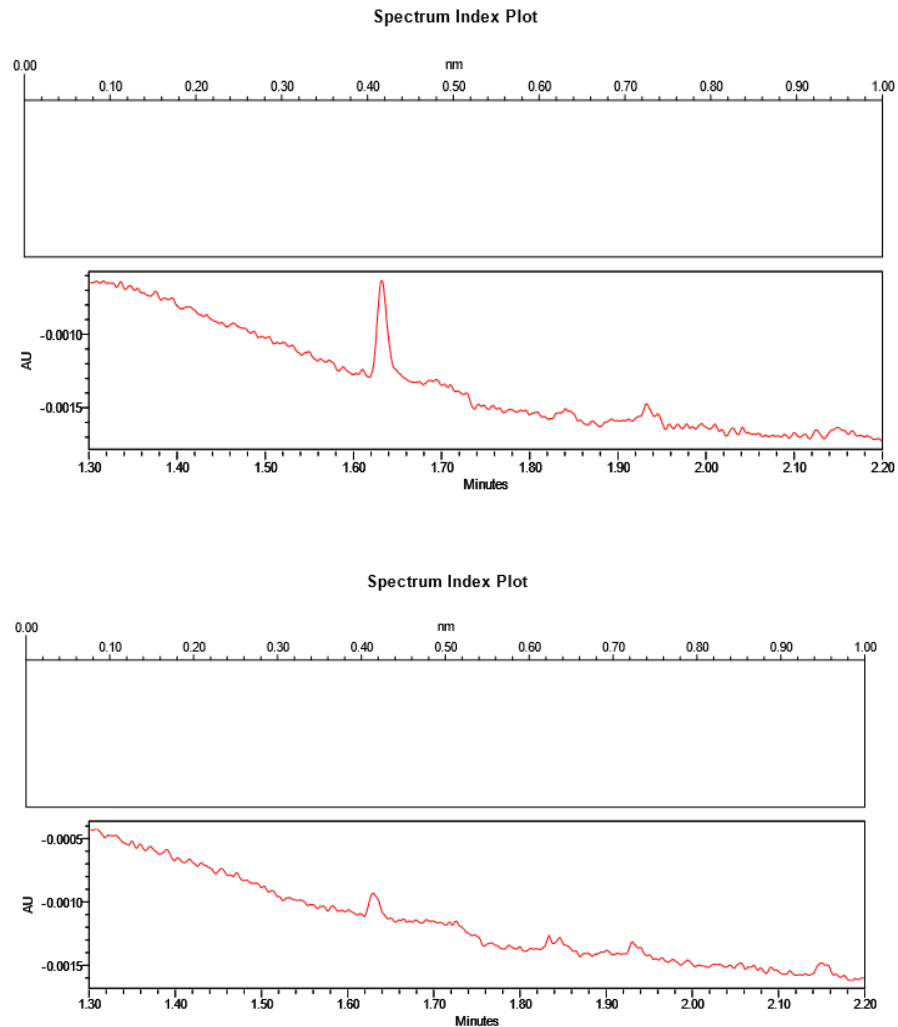


Figura 4. Cromatogramas de la etapa de lavado de la muestra del estándar de EGCG a una concentración de 150 ppm tratado mediante extracción en fase sólida (SPE)

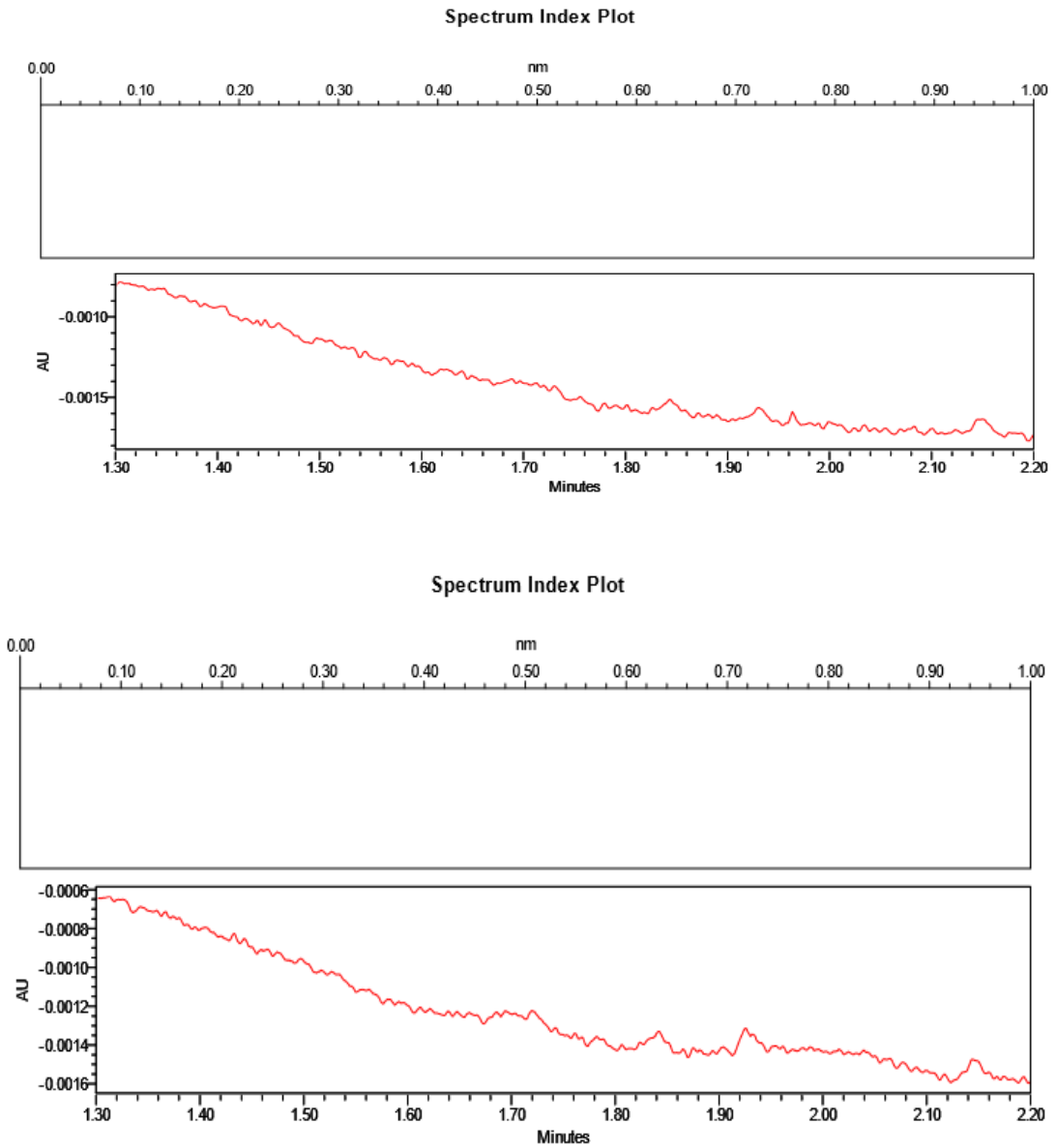


Figura 5. Cromatogramas de la etapa de lavado de la muestra de Agua Cristal con TEAVIGO tratado mediante extracción en fase solida (SPE)

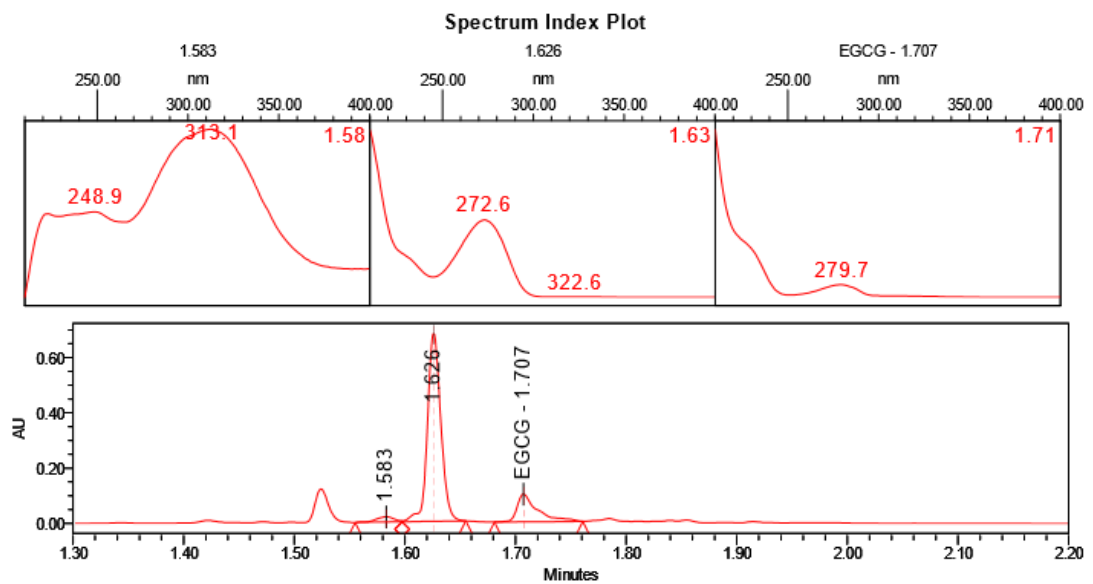
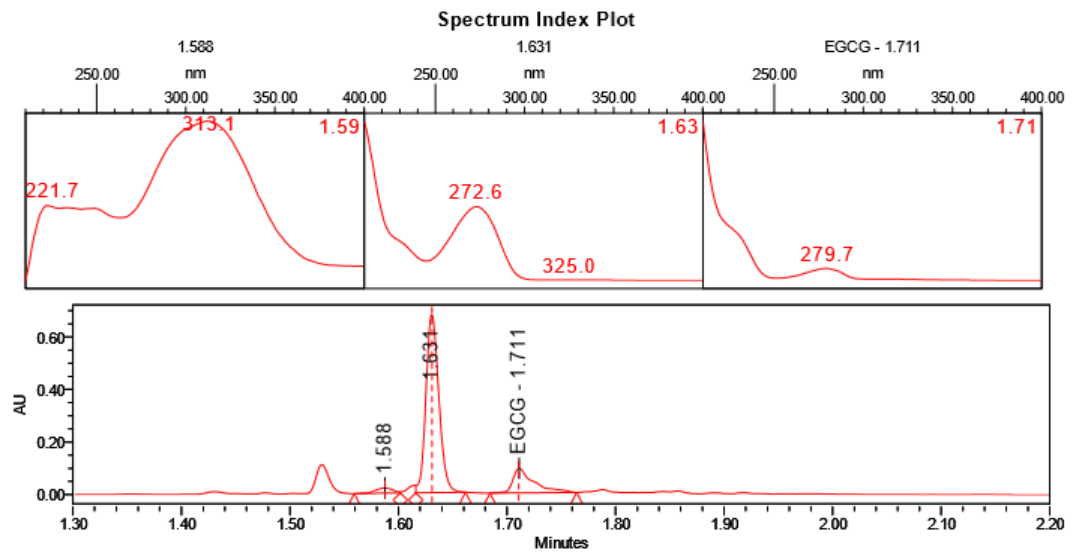


Figura 6. Cromatogramas de la etapa de lavado de la muestra de Té Verde Hindú tratado mediante extracción en fase solida (SPE)