

# KINETICS OF POLYPHENOLS EXTRACTION DURING PREPARATION OF DIFFERENT TEAS

## KINETIKA EKSTRAKCIJE POLIFENOLA TIJEKOM PRIPRAVE RAZLIČITIH ČAJEVA

OBRADOVIC, Valentina; ERGOVIC RAVANCIC, Maja; SKRABAL, Svjetlana; MARCETIC, Helena & ODAK, Petra

**Abstract:** *The object of this work was to determine the kinetics of polyphenol extraction during preparation of different teas. Commercial green tea, chamomile tea, rosehip and hibiscus tea and rosehip tea were used as samples. Each tea has been extracted for 3, 6 and 9 minutes. Colour density, antioxidant activity and total polyphenol content were determined. Results have shown that conditions of tea preparation, had significant influence on polyphenol content. Green tea, extracted for 9 minutes, had the highest antioxidant activity and total polyphenol content.*

**Key words:** *polyphenols, antioxidant activity, tea*

**Sažetak:** *Cilj ovog rada bio je ispitati kinetiku ekstrakcije polifenola tijekom pripreve različitih čajeva. Korišteni su zeleni čaj, čaj od kamilice, čaj od šipka i hibiskusa, te čaj od čistog šipka. Sve vrste čaja podvrgnute su ekstrakciji u trajanju od 3, 6 i 9 minuta. Određena je gustoća boje, antioksidativna aktivnost, te ukupni sadržaj polifenola. Rezultati su pokazali da uvjeti tijekom pripreme čajeva, imaju značajan utjecaj na sadržaj polifenola. Zeleni čaj, pri ekstrakciji u trajanju od 9 minuta, imao je najveću antioksidativnu aktivnost i sadržaj ukupnih polifenola.*

**Ključne riječi:** *Polifenoli, antioksidativna aktivnost, čaj*



**Authors' data:** Valentina Obradović, dr.sc., Veleučilište u Požegi, Vukovarska 17, Požega, vobradovic@vup.hr; Maja Ergović Ravančić, dr.sc., Veleučilište u Požegi, Vukovarska 17, Požega, mergovic@vup.hr; Svjetlana Škrabal, dr.sc., Zvečevo d.d., Kralja Zvonimira 1, Požega, svjetlana.skrabal@zvecevo.hr; Helena Marčetić, dipl.ing., Veleučilište u Požegi, hmrcetic@vup.hr; Petra Odak, Veleučilište u Požegi, Vukovarska 17

## 1. Uvod

Funkcionalni proizvodi zauzimaju sve značajnije mjesto na tržištu, a samim time i izrada novih proizvoda sa funkcionalnim svojstvima jedan je od stalnih izazova s kojim se susreću prehrambeni tehnolozi. [1] U tom kontekstu posebno mjesto zauzimaju proizvodi bogati antioksidansima.[2] Antioksidansi se mogu podijeliti u tri skupine: endogeni spojevi sa antioksidativnom aktivnošću, egzogeni nutrijenti (vitamini A, E, C) i egzogeni ne-nutritivni spojevi od kojih su najpoznatiji flavonoidni spojevi.[2] Ti spojevi nalaze se u prirodi u gotovo svim biljkama i namirnicama biljnog porijekla. Nazivaju se još i polifenoli, a uključuju spojeve različite kemijske strukture od jednostavnih hidroksicimetnih kiselina do složenijih flavonoida i tanina. [3] Gotovo svi fenolni spojevi imaju nekoliko važnih bioloških i kemijskih svojstava: antioksidativnu aktivnost, sposobnost hvatanja aktivnih molekula kisika, sposobnost hvatanja elektrofilnih molekula, sposobnost stvaranja kelatnih spojeva sa metalima. [4] Brojna istraživanja su dokazala protuupalna, protualergijska i protukarcinogena djelovanja polifenolnih spojeva kao i namirnica koje ih sadržavaju, pri čemu se osobito ističu crno vino i zeleni čaj. [3] Dokazano je kako su polifenoli iz čaja jači antioksidansi od većine drugih poznatih spojeva s ovim svojstvom kao što su askorbinska kiselina, tokoferoli, butilirani hidroksianisol, butilirani hidroksitoluen i td. [2] Glavni polifenoli u zelenom čaju su katehini, te je dokazana obrnuta razmjernost između konzumiranja zelenog čaja i smrtnosti od koronarnih bolesti tj. pojave infarkta miokarda. Osim antioksidativnim, to se objašnjava i drugim učincima poput blažim sniženjem arterijskog tlaka, protutrombotičkim učincima, kočenjem enzima važnih u biosintezi lipida, smanjenjem apsorpcije lipida u crijevima i td. [5] Kada se govori o učinku polifenola iz čaja na pojavu i liječenje karcinoma, u studijama na ljudima je vrlo teško separirati učinke samog čaja od ostalih faktora. Ipak, neke studije su dokazale protektivnu ulogu čaja protiv raka crijeva, a to su potvrdile i studije *in vitro*, te na životinjama.[2] Na tržištu postoje različite vrste čaja koje se razlikuju po porijeklu, klimi, načinu proizvodnje, [6] ali najpoznatiji su crni, zeleni, bijeli i oolong čaj. Također se sve češće konzumiraju i različiti voćni čajevi osobito popularni zbog privlačne arome i lake pripreme. [7] Fenolni spojevi čine 25-35% suhe tvari u svježem, mladom lišću čaja. Flavanoli čine 80 % od toga, dok su ostalo proantocijanidini, fenolne kiseline, flavoni i flavonoli. Tijekom fermentacije flavanoli se enzimski oksidiraju do spojeva koji su odgovorni za aromu i boju crnog čaja. [6] Prema preporukama, konzumacijom 5 komada voća i 5 komada povrća dnevno, unos polifenola iznosio bi između 500 – 1000 mg, pri čemu flavonoidi čine 150-300 mg od tog iznosa, ali taj se iznos značajno povećava konzumacijom čaja, kakaovih proizvoda i kave, a može se dostići unos do jednog grama dnevno. [8] Pokazano je kako su bioaktivni sastojci poput polifenola biodostupni ljudima nakon konzumacije napitaka bogatih ovim sastojcima, te kako su aktivni kao antioksidansi *in vivo*. [9] Cilj ovog rada bio je ispitati kinetiku ekstrakcije polifenola tijekom pripreme različitih čajeva, kako bi se utvrdile razlike u udjelu polifenola, te antioksidativnoj aktivnosti između njih, te odrediti optimalno vrijeme ekstrakcije.

## 2. Eksperimentalni dio

Uzorci čaja su kupljeni u lokalnim trgovinama, originalno zapakirani (podaci poznati autorima). Od svake vrste čaja po jedan uzorak je bio iz ekološke proizvodnje, a drugi iz konvencionanog načina proizvodnje. Uzorci su označeni na slijedeći način: Z1-E, Z2, K1-E, K2, ŠH1-E, Š2-E. Uzorci su pripremljeni tako da se u 6 laboratorijskih časa volumena 200 mL ulila kipuća voda, te se u svaku času stavila po 1 vrećica uzorka čaja. Svaki čaj se ekstrahirao u vremenskim intervalima od 3, 6 i 9 minuta. Nakon svakog intervala, u svrhu provođenja analiza, odvojilo se 20 mL uzorka u manju laboratorijsku čašu.

### 2.1 Određivanje gustoće boje

Parametar tona i gustoće boje direktno se očitava na displayu uređaja (HI 83742 COLOR & PHENOLS ISM for wine analysis), prema uputama proizvođača.

#### 2.1. Mjerenje antioksidativne aktivnosti DPPH metodom

Za pripremu DPPH otopine potrebno je otopiti 4 mg DPPH u 100 mL etanola. U kivetu se odpipetira 2 mL DPPH otopine te se izmjeri početna apsorbancija otopine radikala (Ao). U kivetu se potom doda 100  $\mu$ L čaja tj. antioksidansa, smjesa se dobro promiješa i prati se promjena apsorbancija otopine tijekom pola sat pri valnoj duljini od 517 nm.

Postotak inhibicije DPPH radikala uzoraka računati prema jednadžbi:

$$\% \text{ inhibicije} = [(A_o - A_t) / A_o] \times 100 \quad (1)$$

A<sub>o</sub> - apsorbancija otopine DPPH radikala kod vremena t = 0 min

A<sub>t</sub> - apsorbancija reakcije smjese kod vremena T = X min

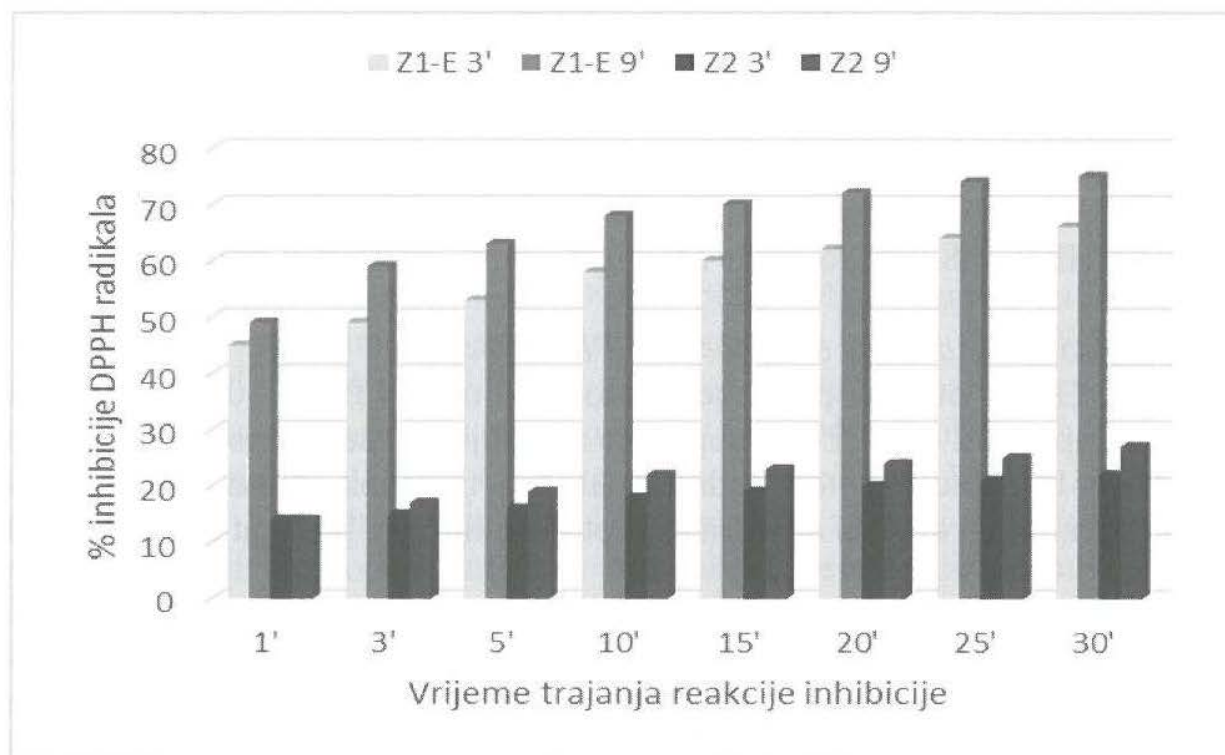
#### 2.3. Određivanje ukupnih polifenola mikro Folin-Ciocalteu metodom

Za određivanje sadržaja ukupnih fenola u pripremljenim uzorcima koristi se uređaj HI 83742 COLOR & PHENOLS ISM, te Folin Ciocalteu metoda, takozvana FC metoda. U praznu kivetu pomoću plastične pipete stavi se točno 5 mL kiselinskog reagensa HI 83742A-0. Zatim, se doda 0,2 mL uzorka čaja (ovaj postupak je učinjen sa svakim uzorkom kuhanim 9 minuta), te se dodaje 6 kapi Folinovog reagensa, odnosno otopina koju čini smjesa fosfomolibdenove kiseline i fosfovolframove kiseline. Stavi se čep, te nježno protrese. Nakon jedne minute dodaje se 3 ml HI 83742C-0 reagensa, odnosno karbonatni pufer u kivetu do oznake 10 mL. U reakciji s fenolnim spojevima, Folinov reagens oksidira fenolne spojeve. Otopina postaje intenzivno plave boje, a intenzitet boje razmjeran je količini fenolnih spojeva. Nakon inkubacije od 30 minuta udio polifenola se očitava direktno na displayu uređaja u g/L.

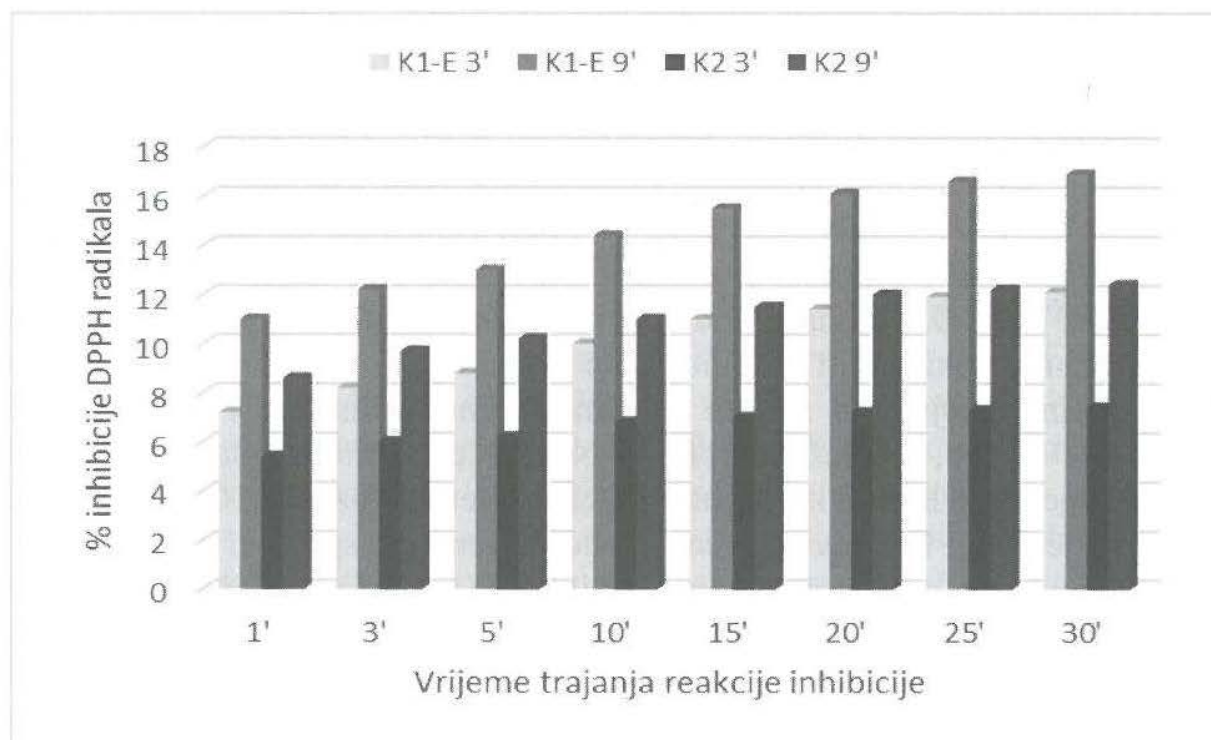
### 3. Rezultati i rasprava

|    | Z1-E | Z2 | K1-E | K2   | ŠH1-E | Š2-E |
|----|------|----|------|------|-------|------|
| 3' | 1    | 1  | 0,43 | 0,35 | 1     | 2,50 |
| 6' | 1    | 1  | 0,43 | 0,35 | 1,20  | 3,00 |
| 9' | 1    | 1  | 0,50 | 0,40 | 0,75  | 2,40 |

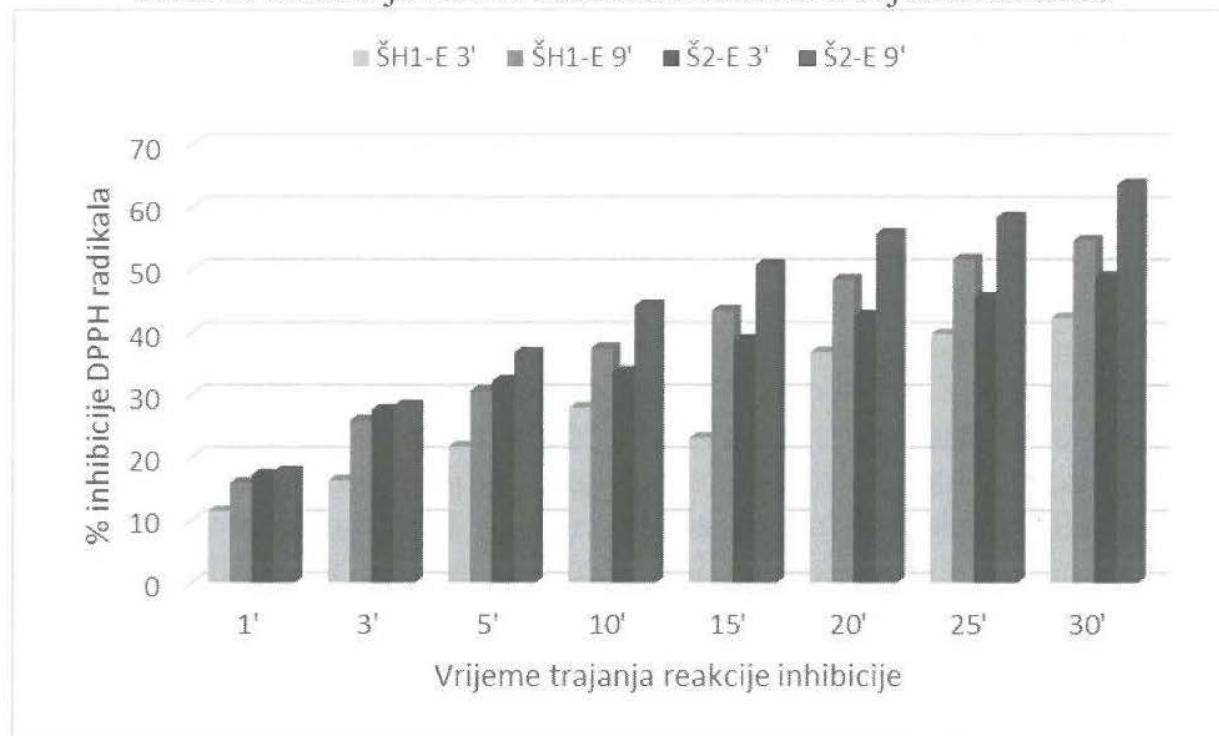
Tablica 1. Gustoća boje u uzorcima čaja



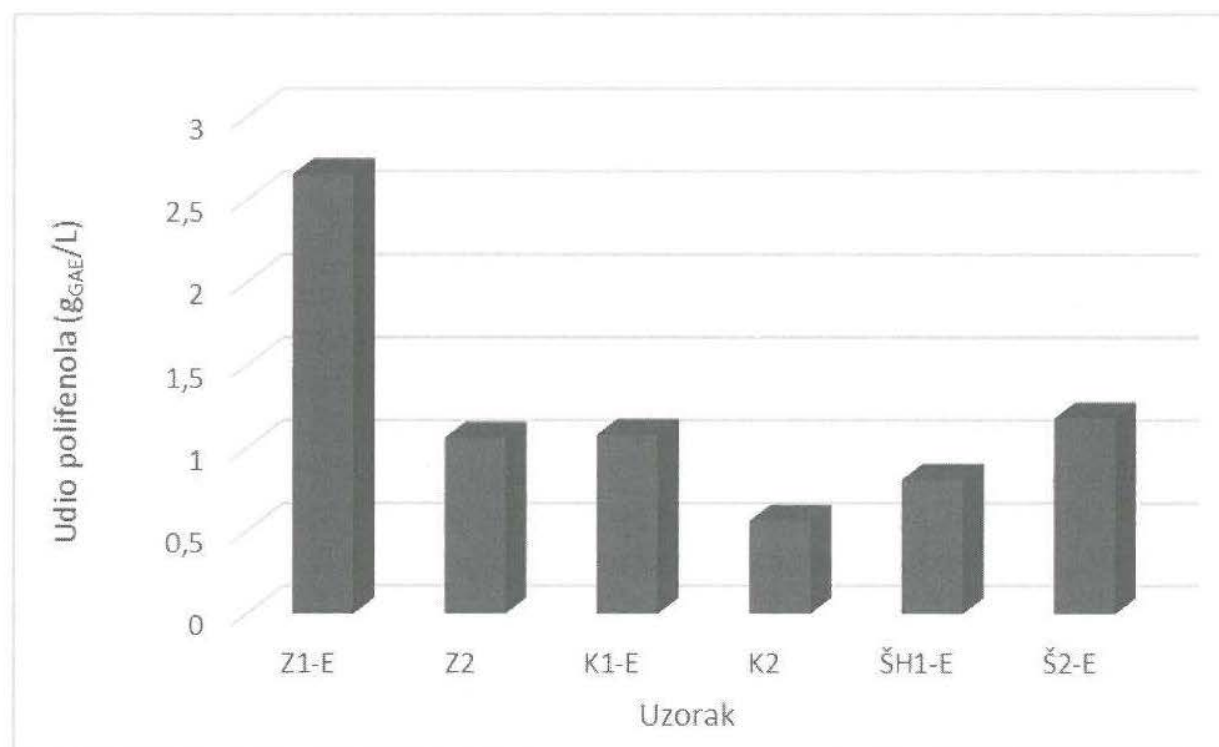
Slika 1. Inhibicija DPPH radikala u uzorcima zelenog čaja



Slika 2. Inhibicija DPPH radikala u uzorcima čaja od kamilice



Slika 3. Inhibicija DPPH radikala u uzorcima čaja od šipka



Slika 4. Udio polifenola u uzorcima čaja ekstrahiranim 9 minuta

Tablica 1. prikazuje gustoću boje u uzorcima ovisno o vremenu ekstrakcije. Rezultati za zeleni čaj prikazuju maksimalnu vrijednost koju je instrument mogao očitati za izabranu metodu. Međutim, moglo se uočiti kako sa produljenjem vremena ekstrakcije boja postaje tamnija. U oba uzorka čaja od kamilice između 3. i 6. minute ekstrakcije nema promjene u intenzitetu boje, da bi između 6. i 9. minute ponovo gustoća boje porasla. Čaj iz eko uzgoja imao je nešto veću gustoću boje od

konvencionalno uzgojenog čaja. Kod čaja od šipka (i hibiskusa) maksimalna gustoća boje je nakon 6. minute ekstrakcije, nakon čega je došlo do pada vrijednosti što se može pripisati oksidaciji tvari boje. Najveću vrijednost gustoće boje imao je čaj od šipka iz ekološkog uzgoja. Inhibicija DPPH radikala kontinuirano raste sa vremenom trajanja reakcije inhibicije (Slika 1.- 3.). Kao što se može vidjeti na Slici 1. razlika u antioksidativnoj aktivnosti između uzoraka zelenog čaja više se može pripisati porijeklu samog čaja nego vremenu ekstrakcije. Naime, nakon 30 minuta reakcije razlika između postotka inhibicije uzoraka istog porijekla je vidljiva ali nije velika. Uzorak Z1-E 3' pokazao je antioksidativnu aktivnost od 66 %, a Z1-E 9' 75 %. S druge strane uzorak Z2 nakon 9 minuta ekstrakcije imao je gotovo tri puta manju antioksidativnu aktivnost od uzorka zelenog čaja iz ekološkog uzgoja (27 %). I kod čaja od kamilice (Slika 2.) uzorci iz ekološkog uzgoja su imali veću antioksidativnu aktivnost (16,9 % nakon 9 minuta ekstrakcije) od konvencionalno uzgojenog čaja (12,4 % nakon 9 minuta ekstrakcije). Međutim razlike u vrijednostima između vremena ekstrakcije unutar istog uzorka i između različitih uzoraka ali istog vremena ekstrakcije su približno jednake i nisu toliko izražene kao kod zelenog čaja. Slično se može primijetiti i kod uzoraka čaja od šipka (Slika 3.). U ovom slučaju oba uzorka su iz ekološkog uzgoja, međutim uzorak ŠH1-E predstavlja mješavinu čaja od šipka i cvijeta hibiskusa (65:35), a uzorak Š2-E je čisti šipak. Oba uzorka su pokazala vrlo visoke vrijednosti za antioksidativnu aktivnost, čak i nakon 3 minute ekstrakcije (preko 40 %). Uzorak Š2-E 9' je nakon 30 minuta inhibicije pokazao antioksidativnu aktivnost od čak 63,9 %, što je odmah nakon uzorka Z1-E, a čak znatno više od uzorka zelenog čaja Z2. Vrlo visoke vrijednosti za antioksidativnu aktivnost zelenog čaja i čaja od šipka u odnosu na druge ispitivane čajeve pokazali su i Parmar & Vasantha Rupasinghe, [10] te Toydemir i sur. [11] U skladu sa vrijednostima za antioksidativnu aktivnost su i rezultati za ukupne polifenole (Slika 4.). Najveću vrijednost je imao uzorak zelenog čaja iz ekološke proizvodnje (Z1-E) 2,65 g<sub>GAE</sub>/L, slijedi uzorak čaja od šipka Š2-E sa dvostruko manjom vrijednosti (1,18 g<sub>GAE</sub>/L), te zatim slijede uzorci Z2 i K1-E. Rezultati su unutar raspona rezultata za navedene čajeve u drugim istraživanjima. [10, 11, 12] Zanimljivo je da uzorak K1-E pokazuje dosta visok udio polifenola, međutim to se nije odrazilo i na kvantitativnu vrijednost njegove antioksidativne aktivnosti. S druge strane uzorak K2 ima oko 5 puta manju količinu polifenola od uzorka Z1-E, a isto tako ima približno i pet puta manju antioksidativnu aktivnost.

#### 4. Zaključak

Vrijeme trajanja ekstrakcije čaja utječe na gustoću boje, antioksidativnu aktivnost i sadržaj ukupnih polifenola. Vrijeme ekstrakcije od 9 minuta, kao što je navedeno na uputama za pripremu čaja, pokazalo se kao optimalno, s tim da antioksidativna aktivnost čajeva kontinuirano raste s vremenom ekstrakcije, međutim gustoća boje ne. Također je pokazano kako na udio polifenola utječe vrsta čaja, ali i porijeklo i način uzgoja. Najveći udio polifenola imao je zeleni čaj, ali vrlo su velike razlike s

obzirom na porijeklo čaja. Znatno veći udio polifenola, ali i antioksidativnu aktivnost imali su čajevi iz ekološkog uzgoja od konvencionalno proizvedenih uzoraka.

## 5. Literatura

- [1] Drmić, H. & Režet Jambrak, A. (2010). Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat.J.Food Sci.Technol.*, 2(2), 22-33, 1848-9923.
- [2] Dreosti, I.E. (1996). Bioactive ingredients: Antioxidants and Polyphenols in Tea. *Nutrition Reviews*, 54, 11, S51-S58, 1753-4887.
- [3] Berend, S. & Grabarić, Z. (2008). Određivanje polifenola u namirnicama metodom ubrizgavanja u protok. *Arh Hig Rada Tokiskol*, 59, 205-212, 0004-1254.
- [4] Damodaran, S.; Parkin, K.L. & Fennema, O.R. (2008). *Fennema's Food Chemistry*, CRC Press, 978-0-8493-9272-6, Boca Raton.
- [5] Reiner, Ž. (2008). Uloga prehrane u prevenciji i terapiji kardiovaskularnih bolesti. *Medicus*, 17, 1, 93-103, 1848-8315.
- [6] Belitz, H.D.; Grosch, W. & Schieberle, P. (2004). *Food Chemistry*, Springer, 3-540-40818-5, Berlin Heidelberg New York.
- [7] Kopjar, M.; Knežević, I. & Piližota, V. (2013). Sadržaj Polifenola, antocijana i antioksidativna aktivnost voćnih čajeva. *Hrana u zdravlju i bolesti*, 2, 2, 42-49, 2233-1239.
- [8] Pravilović, N.R. (2016). *Difuzija polifolnih jedinjenja iz mikročestica dobijenih različitim tehnikama inkapsulacije*, Doktorski rad. Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd.
- [9] Netzel, M.; Netzel, G.; Ott, U.; Bitsch, R. & Frank, T. (2007). Biological antioxidant activity of a beverage containing polyphenols and ascorbic acid. *Ernährung/Nutrition*, 31, 3, 102-109, 0899-9007.
- [10] Parmar, I. & Vasantha Rupasinghe, H.P. (2015). Antioxidant capacity and Anti-diabetic activity of wild-berry stem infusions. *European Journal of Medicinal Plants*, 8, 1, 11-28, 2231-0894.
- [11] Toydemir, G.; Capanoglu, E.; Kamiloglu, S.; Firatligil-Durmus, E.; Sunay, A.E.; Samanci, T. & Boyacioglu, D. (2015). Effects of Honey addition on antioxidative properties of different herbal teas. *Pol.J.Food Nutr.Sci.*, 65, 2, 127-135, 1230-1322.
- [12] Gramza, A.; Pawlak-Lemanska, K.; Korczak, J.; Easowicz, E. & Rudzinska, M. (2005). Tea extracts as free radical scavengers. *Polish Journal of Environmental Studies*, 14, 6, 861-867, 1230-1485.