

Wpływ rozpuszczalnika na właściwości antyoksydacyjne ekstraktów z zielonej herbaty (*Camellia sinensis* L.)

The effect of a solvent on the antioxidant properties of green tea (*Camellia sinensis* L.) extracts

ANNA NOWAK^{1/}, ANNA MACIEJEWSKA^{2/}, WIKTORIA DUCHNIK^{1/}, KATARZYNA FLORKOWSKA^{1/}, ADAM KLIMOWICZ^{1/}

^{1/} Katedra i Zakład Chemii Kosmetycznej i Farmaceutycznej, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

^{2/} absolwentka Kosmologii, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

Wprowadzenie. Zielona herbata (*Camellia sinensis* L.) jest jednym z najbardziej popularnych napojów spożywanych na świecie. Znalazła ona zastosowanie jako źródło antyoksydantów, chroniących m.in. przed chorobami sercowo-naczyniowymi, nowotworowymi oraz chorobami neurodegeneracyjnymi (m.in. Parkinsona i Alzheimer). Cechuje się również działaniem przeciwcukrzycowym, przeciwstarzeniowym oraz przeciwzapalnym.

Cel. Ocena aktywności antyoksydacyjnej alkoholowych i wodnych ekstraktów z suchych liści zielonej herbaty.

Materiały i metody. Surowiec roślinny stanowiły suszone liście zielonej herbaty, zakupione w lokalnym hipermarkecie. Aktywność antyoksydacyjna była oceniana przy użyciu metod DPPH, ABTS, FRAP oraz Folina-Ciocalteu, za pomocą której oznaczono ogólną zawartość polifenoli. Ekstrakty do analiz były poddawane działaniu ultradźwięków przez 15, 30, 60 min. Jako rozpuszczalnik zastosowano 70% (v/v) i 96% (v/v) etanol, a także 70% (v/v) i 99,5% (v/v) metanol oraz wodę. Zbadano również działanie przeciwutleniające i ogólną zawartość polifenoli w naparach, przygotowanych przez 5, 15 lub 30 min w temp. 80 i 100°C.

Wyniki. Najwyższą aktywność antyoksydacyjną, mierzoną metodą DPPH, zaobserwowano w ekstraktach przygotowanych w stężonym metanolu, w czasie 30 min. W przypadku metody ABTS, najwyższą aktywnością przeciwutleniającą charakteryzowały się badane próby w 70% (v/v) metanolu ekstrahowane przez 60 min. Natomiast najbardziej wartościowe, mierzone metodą FRAP, okazały się napary sporządzone w wyniku parzenia przez 30 min w temp. 80°C. Najwyższą ogólną zawartość polifenoli zaobserwowano w wyciągach wodnych ekstrahowanych przy użyciu łaźni ultradźwiękowej przez 60 min.

Wnioski. Ekstrakty z suchych liści zielonej herbaty charakteryzują się wysoką aktywnością antyoksydacyjną, co sugeruje możliwość wykorzystania tych roślin jako surowców w przemyśle kosmetycznym i farmaceutycznym.

Słowa kluczowe: zielona herbata, aktywność antyoksydacyjna, wyciągi roślinne

Introduction. Green tea (*Camellia sinensis* L.) is one of the most popular beverages in the world. As a source of antioxidant properties it is used for prevention of cardiovascular; neoplastic, and neurodegenerative (e.g. Parkinson's and Alzheimer's) diseases. It also features antidiabetic, anti-aging and anti-inflammatory properties.

Aim. To assess the antioxidant activity of alcoholic and aqueous extracts of dried leaves of green tea.

Materials & methods. The raw material consisted of dried leaves of green tea purchased in a local hypermarket. Its antioxidant activity was determined by means of the DPPH, ABTS, and FRAP methods, while the total polyphenols content was tested by the Folin-Ciocalteu method. The extracts for analysis were subjected to ultrasound for 15, 30, and 60 minutes. The extraction solvents used were 70% (v/v) and 96% (v/v) ethanol, 70% (v/v) and 99.5% (v/v) methanol, and water. Also evaluated were the antioxidant activity and the total polyphenols content of the tea infusions, depending on the infusion time (5, 15, or 30 minutes) at temperatures of 80 and 100°C.

Results. The highest antioxidant activity, measured by the DPPH method, was observed in extracts prepared in concentrated methanol over a period of 30 minutes. In the case of the ABTS method, the highest antioxidant activity was found in the test samples in 70% (v/v) methanol extracted for a period of 60 minutes. The most effective green tea infusions, measured by the FRAP method, were those made as a result of infusion for 30 minutes at a temperature of 80°C. The highest total polyphenols content was observed in aqueous infusions extracted using an ultrasonic bath for 60 minutes.

Conclusion. Extracts from dry green tea leaves are characterized by high antioxidant activity, which suggests the possibility of using these plants as raw materials in the cosmetics and pharmaceutical industries.

Key words: green tea, antioxidant activity, plant extracts

© Probl Hig Epidemiol 2018, 99(3): 245-251

www.phie.pl

Nadesłano: 07.03.2018

Zakwalifikowano do druku: 10.07.2018

Adres do korespondencji / Address for correspondence

dr inż. n. rol. Anna Nowak
Katedra i Zakład Chemii Kosmetycznej i Farmaceutycznej
Pomorski Uniwersytet Medyczny
ul. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin
tel. 509 49 71 15, e-mail: anowak@pum.edu.pl

Wprowadzenie

Zielona herbata (*Camellia sinensis* L.) jest rośliną pochodzącą z Chin, skąd rozpowszechniła się na pozostałe kraje Azji, a następnie na inne kontynenty.

Aby otrzymać zieloną herbatę w postaci gotowej do przygotowania naparów, liście natychmiast po zbiorze, zostają poddane procesowi suszenia i podgrzania w celu zahamowania rozwoju procesu fermentacyj-

nego [1]. Herbata (zielona, czarna i inne), jest zaraz po wodzie najczęściej konsumowanym napojem na świecie [2]. Najbardziej popularnym sposobem jej spożywania jest napar sporządzony z liści [3, 4]. W przypadku herbaty zielonej, liście można parzyć nawet do trzech razy, uzyskując kolejno inny aromat i właściwości [5, 6]. Napar uzyskany z pierwszego parzenia działa pobudzająco. Jest to spowodowane tym, iż teina przez krótki czas parzenia nie wiąże się z garbnikami. Drugie parzenie prowadzi do otrzymania napoju o działaniu relaksującym i o mocniejszym aromacie, co powoduje, że jest on bardziej ceniony niż napój z pierwszego parzenia [7]. Stwierdzono, że w przypadku kolejnych procesów parzenia maleje zawartość całkowitych flawonoidów, jak również fenoli niebędących flawonoidami. Podobne obserwacje poczyniono w przypadku metyloksantyn (teobrominy, teofiliny i kofeiny) [8]. Zielona herbata posiada cenne właściwości lecznicze ze względu na występowanie w niej wielu minerałów i mikroelementów, takich jak: żelazo, fluor, sód, potas, wapń i cynk [9]. Jej liście są bogatym źródłem polifenoli, stanowiących nawet do 36% ich suchej masy. Do tej grupy związków zaliczamy przede wszystkim katechiny, takie jak: epikatechina (EC) – 6%, epigallokatechina (EGC) – 19%, galusan epikatechiny (ECG) – 14% oraz galusan epigallokatechiny (EGCG) – 59% [10]. Wykazano, że najsilniejszy potencjał antyoksydacyjny ma EGCG, zawierający osiem grup hydroksylowych, które decydują o wysokiej aktywności przeciwutleniającej [11, 12]. Właściwości antyoksydacyjne EGCG są niemal stukrotnie silniejsze od wit. C, zaś od wit. E – ponad 20-krotnie. Wszystkie związki należące do katechin posiadają zdolność chelatowania jonów metali przejściowych, będących katalizatorami reakcji wolnorodnikowych, a także hamowania powstawania i wychwytywania wolnych rodników [13]. Aktywne jony metali oraz wolne rodniki wpływają negatywnie na organizm ludzki, gdyż powodują uszkodzenia struktury białek, lipidów, kwasów nukleinowych, a także cząsteczek DNA. Cennymi składnikami zielonej herbaty są również teina (czyli kofeina) i tanina, których zawartość w suszu wynosi 4-12% [14]. Ekstrakty z zielonej herbaty chronią błony erytrocytów i organelli komórkowych przed utlenieniem. Obecność katechin i fenolokwasów powoduje, że niszczone są pierwotne i wtórne reaktywne formy wolnych rodników [15]. Suszenie herbaty może wpływać na właściwości odżywcze i zawartość takich składników, jak witaminy, chlorofil, całkowita ilość flawonoidów i fenoli oraz aktywność przeciwutleniająca produktu końcowego [12].

Cel

Ocena właściwości antyoksydacyjnych ekstraktów z suszonych liści zielonej herbaty sporządzonych w następujących rozpuszczalnikach: woda destylo-

wana, etanol, metanol oraz ich 70% (v/v) roztwory wodne przy wykorzystaniu ekstrakcji wspomaganą ultradźwiękami trwającej 15, 30 i 60 min. Oceniono również wpływ czasu zaparzania naparów wodnych (5, 15, 30 min) w temp. 80 i 100°C na badane właściwości.

Materiały i metody

2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl (DPPH), 2,4,6-tri(2-pirydylo)-s-triazyna (TPTZ), kwas 2,2-azyno-bis(etylobenzotiazolino-6-sulfonowy) ABTS pochodziły z firmy Sigma Aldrich, USA; siarczan(VI) żelaza(II) heptahydrat i chlorek żelaza(III) heksahydrat oraz odczynnik Folina-Ciocalteu były produkcji Merck, Darmstadt, Niemcy; lodowaty kwas octowy, bezwodny węgiel sodu, kwas askorbinowy, bezwodny octan sodu; kwas solny 36% (wszystkie o czystości cz.d.a.) pochodziły z firmy Chempur, Piaskary Śląskie.

Surowiec roślinny w postaci wysuszonych liści zielonej herbaty (*Teae folium*) został zakupiony w jednym ze szczecińskich hipermarketów.

W badaniu oznaczono aktywność antyoksydacyjną oraz ogólną zawartość polifenoli suszonych liści zielonej herbaty. Ekstrakty przygotowano przy użyciu stężonych oraz 70% (v/v) roztworów dwóch alkoholi, etanolu i metanolu. Wyciągi uzyskano z wykorzystaniem łaźni ultradźwiękowej w czasie 15, 30 oraz 60 min. W przypadku wody zbadano również wpływ temperatury parzenia na badane parametry, przy czym w celu przygotowania naparów zalano suszone liście wodą o temp. 80 oraz 100°C i pozostawiono odpowiednio przez okres 5, 15 i 30 min.

Oznaczenie właściwości antyoksydacyjnych wykonano przy użyciu metod DPPH, FRAP i ABTS, natomiast ogólną zawartość polifenoli metodą Folina-Ciocalteu'a. Sposób postępowania był analogiczny, jak w poprzednich pracach [16-18]. Jako substancję wzorcową w przypadku wszystkich powyższych metod zastosowano kwas askorbinowy (KA), który posłużył do wyznaczenia krzywej kalibracyjnej. Wyniki przedstawiono jako %RSA – % zmiatania wolnych rodników w przypadku metody DPPH i ABTS. W odniesieniu do metod DPPH, ABTS, FRAP i F-C wyznaczono również równoważniki kwasu askorbinowego w mg KA/g surowca.

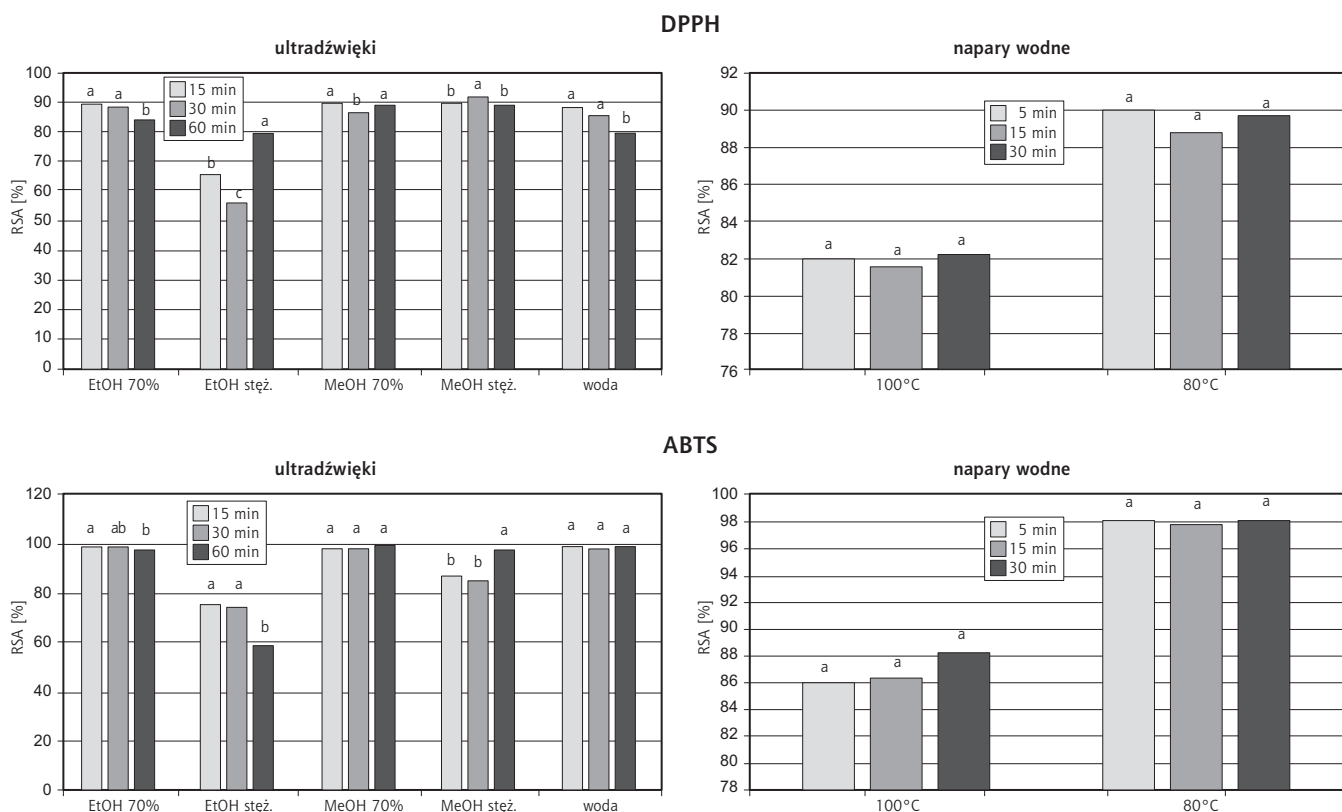
Analiza statystyczna otrzymanych wyników obejmowała jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA przy poziomie istotności $\alpha=0,05$. Różnice międzygrupowe wykonano testem Tuckeya ($n=3$), oceniając istotność statystyczną różnic pomiędzy poszczególnymi czasami ekstrakcji w każdym z rozpuszczalników. Wyznaczono również współczynnik korelacji liniowej Pearsona pomiędzy wynikami uzyskanymi poszczególnymi metodami oznaczania aktywności antyoksydacyjnej. Obliczeń dokonano z wykorzystaniem programu Statistica 12PL firmy Statsoft.

Wyniki

Na ryc. 1 przedstawiono wyniki pomiarów aktywności antyoksydacyjnej, oznaczonych metodami DPPH i ABTS. Różnice statystyczne oceniano pomiędzy zastosowanymi czasami ekstrakcji dla poszczególnych rozpuszczalników. Wyniki pomiarów aktywności antyoksydacyjnych zostały wyrażone jako % RSA. W tab. I i II zamieszczono wartości równoważnego stężenia kwasu askorbinowego (KA) oznaczone metodami DPPH, ABTS, FRAP oraz Foli-na-Ciocalteu (w mg KA/g surowca). Aktywność antyoksydacyjna liści zielonej herbaty, oznaczona metodą DPPH, wyrażona jako % RSA, mieściła się w zakresie od $56,07 \pm 2,48\%$ dla ekstraktów przygotowanych w stężonym etanolu metodą ekstrakcji wspomaganą ultradźwiękami trwającą 30 min do $92,02 \pm 0,96\%$ dla wyciągów przygotowanych w stężonym metanolu (30 min). Analizując próby sporządzone w etanolu, w przypadku metody DPPH, wysokim potencjałem antyoksydacyjnym wyróżniały się wyciągi przygotowane w 70% (v/v) etanolu, przy czym w grupie tej istotnie wyższy wynik odnotowano dla czasu ekstrakcji 15 i 30 min ($89,24 \pm 0,59$ i $88,53 \pm 0,69\%$), w porównaniu z 60 min. ($83,66 \pm 1,32\%$). Ekstrakty wykonane w stężonym etanolu, ekstrahowane przez 30 min, wykazywały niższą zdolność zmiatania wolnych

rodników, wynoszącą $56,07 \pm 2,78\%$ co było, biorąc pod uwagę metodę DPPH, najniższym wynikiem uzyskanym w całym badaniu. Nieco wyższe wartości przy wykorzystaniu stężonego etanolu, otrzymano w przypadku ekstrakcji trwającej 15 i 60 min (odpowiednio $65,67 \pm 3,54$ i $79,20 \pm 1,50\%$). Stosunkowo wysoką aktywnością antyoksydacyjną charakteryzowały się wyciągi przygotowane w metanolu, zarówno w 70% (v/v), jak i stężonym. W tym przypadku zdolność zmiatania wolnych rodników wynosiła od $86,37 \pm 1,11\%$ dla prób wykonanych w 70% metanolu (czas ekstrakcji 30 min) do $92,02 \pm 0,96\%$ dla wyciągów ekstrahowanych w stężonym metanolu (30 min). W przypadku naparów, wszystkie wyciągi przygotowane w temp. 100°C , wykazywały wysoką aktywność antyoksydacyjną, zmierzoną metodą DPPH, wynoszącą powyżej 81%. Wyższe właściwości przeciwutleniające zaobserwowano jednak w naparach wykonanych w wodzie o temp. 80°C . W przypadku parzenia przez 5 min wartość ta osiągnęła $90,02 \pm 0,84\%$, natomiast dla czasów 15 i 30 min odpowiednio $89,76 \pm 1,18$ i $88,86 \pm 0,84\%$ (ryc. 1).

Analizując wyniki wyrażone jako równoważnik KA, analogicznie jak w przypadku % RSA, największą wartość zaobserwowano dla ekstraktów przygotowanych w stężonym metanolu, w czasie 30 min



Ryc. 1. Porównanie średniej aktywności antyoksydacyjnej oznaczonych metodą DPPH i ABTS, ekstraktów z suchych liści zielonej herbaty otrzymanych z wykorzystaniem różnych rozpuszczalników i trzech czasów ekstrakcji oraz naparów wodnych; $n=3$. Wartości oznaczone tymi samymi literami (a, b, c) nie różnią się istotnie uwzględniając czas ekstrakcji

Fig. 1. Comparison of the mean antioxidant activity, determined by means of the DPPH and ABTS method, of dry green tea leaf extracts obtained by using different solvents and three extraction times as well as aqueous infusions; $n=3$. The bars of the graphs marked with the same letters (a, b, c) did not differ significantly taking into account the extraction times

(3,07±0,03 mg KA/g surowca), natomiast najniższą dla wyciągów przygotowanych w stężonym etanolu, w takim samym czasie (1,76±0,09 mg KA/g surowca – tabela I).

Aktywność antyoksydacyjna suszonych liści zielonej herbaty, mierzona metodą ABTS, wyrażona w % RSA, mieściła się w zakresie od 58,79±0,64% dla prób z użyciem etanolu stężonego (60 min) do 99,41±0,26% w przypadku wyciągów przygotowanych w 70% metanolu (60 min). Ekstrakty w 70% etanolu, sporządzone w czasie 15 min, odznaczały się istotnie wyższą aktywnością antyoksydacyjną, wynoszącą 99,10±0,31%, w porównaniu z ekstraktami otrzymanymi w czasie 30 i 60 min (odpowiednio 98,43±0,45 oraz 97,82±0,20%). Nieco niższe wartości wykazano dla ekstraktów sporządzonych w stężonym etanolu, w przypadku wyciągów przygotowanych w ciągu 15 i 30 min – odpowiednio 75,60±2,78 oraz 74,78±1,79%. Wynik ten różnił się statystycznie od wyniku prób ekstrahowanych w czasie 60 min (58,79±0,64%) i była to jednocześnie najniższa wartość otrzymana (w przypadku metody ABTS) w przeprowadzonym badaniu. Na podobnym poziomie kształtowały się wyniki dotyczące wyciągów metanolowych, zarówno w 70%, jak i w stężonym alkoholu. Nieco wyższą wartość uzyskano dla prób ekstrahowanych w 70% metanolu – średnio 98,82%, zaś w przypadku ekstrakcji stężonym metanolem trwającej 60 min – 97,76±0,37%, co różniło się statystycznie od krótszego czasu ekstrakcji (87,27±1,52% dla 15 min i 85,00±3,80% dla 30 min (ryc. 1). Stosunkowo wysokimi właściwościami przeciwutleniającymi, mierzonymi powyższą metodą, charakteryzowały się napary wodne, sporządzone w temp. 80°C. W tym przypadku aktywność antyoksydacyjna była wysoka, niezależnie od czasu zaparzenia, wynosiła odpowiednio 98,06±1,01%, 97,85±0,21%, 98,12±0,03% dla

naparów uzyskanych po 5, 15 i 30 min. W przypadku tej metody, podobnie jak poprzednio, aktywność antyoksydacyjną wyrażono również w postaci równoważnika KA który, podobnie jak wartości % RSA, był najwyższy dla ekstraktów przygotowanych w 70% metanolu, w czasie 60 min (27,81±0,08 mg KA/g surowca) w porównaniu do 15,99±0,19 mg KA/g surowca dla prób sporządzonych w etanolu stężonym, które ekstrahowano w czasie 60 min (tab. I).

Potencjał antyoksydacyjny mierzony metodą FRAP, wyrażony jako zdolność redukcji jonów żelaza Fe³⁺ do Fe²⁺, mieścił się w granicach od 0,98±0,10 mg KA/g surowca dla naparów przygotowanych z użyciem wody o temp. 80°C przez okres 30 min, do 33,74±0,02 mg KA/g surowca dla ekstraktów ekstrahowanych w 96% etanolu (czas ekstrakcji 30 min). Analizując wyciągi alkoholowe, dużo wyższymi zdolnościami redukcyjnymi charakteryzowały się ekstrakty przygotowane w obu alkoholach rozcieńczonych, w porównaniu z alkoholami stężonymi. Wśród tych grup, zdolność redukcyjna była istotnie wyższa dla ekstraktów w 70% etanolu, przygotowanych w czasie 60 min (33,38±0,72 mg KA/g surowca) w porównaniu z krótszymi czasami ekstrakcji, dla których otrzymano wartości 26,62±0,67 i 27,70±0,50 mg KA/g surowca (odpowiednio dla 15 i 30 min). Na podobnym poziomie kształtowały się wyniki dla ekstraktów przygotowanych w 70% metanolu, przy czym najwyższą wartością (33,73±0,06 mg KA/g surowca) charakteryzowały się wyciągi 30 min. W przypadku tej metody, stosunkowo wysokie wartości stwierdzono dla wyciągów wodnych, zarówno przyrządzanych przy użyciu łaźni ultradźwiękowej, jak i w formie naparów. W tym przypadku największą zdolnością redukcyjną cechowały się napary przygotowane przez okres 30 min w wodzie, zarówno o temp. 80, jak i 100°C (odpowiednio 33,74±0,02 i 33,73±0,01 mg KA/g surowca) – tabela II.

Tabela I. Aktywność antyoksydacyjna (M±SD) alkoholowych i wodnych wyciągów z zielonej herbaty uzyskanych metodą ekstrakcji wspomaganą ultradźwiękami wyrażona jako równoważnik kwasu askorbinowego (KA) [mg KA/g surowca]; n=3
Table I. The antioxidant activity (M±SD) of green tea extracts obtained by means of ultrasonic-assisted extraction, expressed as an ascorbic acid (KA) equivalent [mg KA/g of raw material]; n=3

Czas ekstrakcji (min) /Extraction time (min)	Rozpuszczalnik /Solvent					
	Etanol 70% /Ethanol 70%	Etanol 96% /Ethanol 96%	Metanol 70% /Methanol 70%	Metanol 99,5% /Methanol 99.5%	Woda /Water	
DPPH	15	2,97±0,02 ^a	2,11±0,13 ^b	2,98±0,02 ^b	2,98±0,05 ^b	2,93±0,04 ^a
	30	2,94±0,02 ^a	1,76±0,09 ^c	2,86±0,04 ^a	3,07±0,03 ^a	2,83±0,09 ^a
	60	2,76±0,05 ^b	2,60±0,05 ^a	2,95±0,01 ^a	2,96±0,01 ^b	2,61±0,05 ^b
ABTS	15	27,72±0,09 ^a	20,88±2,26 ^a	27,53±0,16 ^a	24,28±0,44 ^b	27,62±0,26 ^a
	30	27,52±0,13 ^{ab}	20,64±1,39 ^b	27,58±0,10 ^a	23,62±1,11 ^b	27,56±0,22 ^a
	60	27,35±0,06 ^b	15,99±0,19 ^b	27,81±0,08 ^a	27,33±0,11 ^a	27,64±0,13 ^a
FRAP	15	26,62±0,67 ^c	3,40±0,61 ^a	24,03±1,00 ^c	11,72±0,09 ^b	16,66±4,14 ^b
	30	27,70±0,50 ^b	0,98±0,10 ^b	33,73±0,06 ^a	9,70±0,43 ^b	32,01±1,74 ^a
	60	33,38±0,72 ^a	1,41±0,52 ^b	30,11±0,06 ^b	25,57±0,81 ^a	31,27±1,47 ^a
Folin-Ciocalteu	15	2,84±0,7 ^b	1,12±0,16 ^a	2,21±0,39 ^b	2,32±0,10 ^b	2,83±0,09 ^c
	30	2,23±0,19 ^c	1,10±0,38 ^a	1,83±0,21 ^b	3,24±0,09 ^a	4,34±0,26 ^b
	60	3,56±0,17 ^a	0,94±0,36 ^a	3,28±0,24 ^a	2,85±0,25 ^a	5,02±0,62 ^a

Wartości oznaczone tymi samymi literami (^{a, b, c}) nie różnią się istotnie statystycznie uwzględniając czas ekstrakcji /Values marked with the same letters (^{a, b, c}) did not differ significantly taking into account the extraction times

Ogólna zawartość polifenoli, mierzona metodą Folina-Ciocalteu była zróżnicowana, co uzależnione było przede wszystkim od zastosowanego rozpuszczalnika. Parametr ten mieścił się w granicach od $0,94 \pm 0,36$ mg KA/g surowca (wyciągi przygotowane w wodzie o temp. pokojowej z użyciem łaźni ultradźwiękowej w czasie 60 min) do $5,02 \pm 0,62$ mg KA/g surowca (ekstrakty w stężonym etanolu, przygotowane przez 60 min) – tabela I. Największą ogólną zawartością polifenoli charakteryzowały się wyciągi wodne, zarówno przygotowane w wodzie o temp. pokojowej przy użyciu łaźni ultradźwiękowej, jak i napary przygotowane z użyciem wody o temp. 80 i 100°C. Ekstrakty wodne, otrzymane przy użyciu łaźni ultradźwiękowej, różniły się istotnie: w przypadku ekstrakcji trwającej 60 min ($5,02 \pm 0,62$ mg KA/g surowca) oraz trwającej 30 min ($4,34 \pm 0,26$ mg KA/g surowca), w porównaniu z czasem 15 min ($2,83 \pm 0,09$ mg KA/g surowca). Wśród naparów przygotowanych w temp. 80°C, największą ogólną zawartością polifenoli charakteryzowały się próby zaparzane przez okres 30 min ($3,59 \pm 0,06$ mg KA/g surowca) w przeciwieństwie do pozostałych naparów przygotowanych w tej temperaturze ($2,78 \pm 0,25$ i $2,82 \pm 0,21$ mg KA/g surowca, odpowiednio dla 5 i 15 min). Wyciągi otrzymane w różnym czasie oraz przygotowane w temp. 100°C napary, niezależnie od czasu zaparzania, charakteryzowały się podobną, nieróżniącą się między sobą, ogólną zawartością polifenoli i osiągnęły wartość $3,28 \pm 0,35$ mg KA/g surowca, $3,30 \pm 0,30$ mg KA/g surowca oraz $3,73 \pm 0,30$ mg KA/g surowca, odpowiednio dla czasu sporządzenia naparów 5, 15 i 30 min. Stosunkowo niską zawartość polifenoli (średnio $1,00$ mg KA/g surowca), wykazano dla ekstraktów wykonanych w stężonym etanolu, które wykazywały nawet 3-krotnie niższą wartość, w porównaniu z innymi wariantami badania (tab. I, II).

Tabela III przedstawia korelację pomiędzy wynikami aktywności uzyskanymi poszczególnymi metodami. Wysoce istotną zależność wykazano pomiędzy metodami FRAP a ABTS oraz pomiędzy FRAP i Folin-Ciocalteu. Współczynnik korelacji Pearsona w pierwszym przypadku wyniósł $r=0,780$ ($p<0,001$), natomiast w drugim przypadku $r=0,718$ ($p<0,001$).

Dyskusja

Zielona herbata jest cenną rośliną o bardzo szerokim spektrum korzystnego działania. Wykazuje pozytywne oddziaływanie w schorzeniach, takich jak: otyłość, cukrzyca, miażdżycy, choroby układu sercowo-naczyniowego oraz choroby nowotworowe [10, 19, 20]. Zdrowotne właściwości przypisuje się przede wszystkim wysokiej aktywności antyoksydacyjnej [21, 22]. Zych i Krzepińko [23] podają, iż zielona herbata jest cenniejsza w porównaniu z popularną i częściej pitą herbatą czarną, której potencjał przeciwutleniający jest znacznie niższy i wynosi ok. 45%

Tabela II. Aktywność antyoksydacyjna ($M \pm SD$) naparów z zielonej herbaty przygotowanych w dwóch różnych temperaturach wody (80°C i 100°C) wyrażona jako równoważnik kwasu askorbinowego (mg KA/g surowca); $n=3$
Table II. The antioxidant activity ($M \pm SD$) of green tea aqueous infusions prepared at 80°C and 100°C expressed as an ascorbic acid equivalent (mg KA/g of raw material); $n=3$

Metoda /Method		Czas zaparzania (min) /Infusion time (min)	Temperatura zaparzania /Infusion temperature
		100°C	80°C
DPPH	5	$2,70 \pm 0,02^a$	$2,99 \pm 0,02^a$
	15	$2,69 \pm 0,04^a$	$2,95 \pm 0,03^a$
	30	$2,71 \pm 0,06^a$	$2,98 \pm 0,04^a$
ABTS	5	$23,09 \pm 0,49^a$	$28,76 \pm 0,55^a$
	15	$23,86 \pm 0,09^a$	$28,21 \pm 0,37^a$
	30	$24,87 \pm 0,05^a$	$28,73 \pm 0,30^a$
FRAP	5	$9,12 \pm 0,83^a$	$24,28 \pm 6,41^c$
	15	$31,37 \pm 1,13^a$	$32,32 \pm 8,03^b$
	30	$33,73 \pm 0,01^a$	$38,99 \pm 9,12^a$
Folin-Ciocalteu	5	$3,28 \pm 0,35^b$	$2,78 \pm 0,25^b$
	15	$3,30 \pm 0,30^b$	$2,82 \pm 0,21^b$
	30	$3,73 \pm 0,30^a$	$3,59 \pm 0,06^a$

Wartości oznaczone tymi samymi literami (^{a, b, c}) nie różnią się istotnie statystycznie uwzględniając czas ekstrakcji /Values marked with the same letters (^{a, b, c}) did not differ significantly taking into account the extraction times

Tabela III. Współczynnik korelacji pomiędzy aktywnością antyoksydacyjną [mg KA/g surowca] oznaczoną poszczególnymi metodami; $n=19$
Table III. Correlation coefficient between antioxidant activity [mg KA/g of raw material] determined by means of particular methods; $n=19$

Metoda /Method	Współczynnik korelacji /Correlation coefficient	Istotność statystyczna korelacji /Statistical significance of the correlation
ABTS/DPPH	0,454	$0,02 < p < 0,05$
ABTS/FRAP	0,780	$p < 0,001$
ABTS/F-C	0,645	$0,001 < p < 0,002$
F-C/DPPH	0,423	NS
F-C/FRAP	0,718	$p < 0,001$
FRAP/DPPH	0,512	$0,01 < p < 0,02$

RSA (pomiar metodą DPPH). Przyczyną może być m.in. konieczny proces utlenienia i fermentacji herbaty czarnej, w którym zachodzi utlenienie ok. 75% katechin zawartych w liściach. Porównując, średnia zawartość katechin w herbacie zielonej wynosi 30-42%, zaś w liściach herbaty czarnej jedynie 10-12%.

Przeprowadzone badania własne wykazały wysoką aktywność antyoksydacyjną badanego surowca, ocenianą metodą DPPH. Stosując taką metodę oznaczenia, zdolność zmiatania wolnych rodników była zróżnicowana, przy czym istotnie najwyższą była dla wyciągów przygotowanych w stężonym metanolu (92,02%), zaś najniższą dla ekstraktów w stężonym etanolu (56,07%). W obydwu powyższych przypadkach czas trwania ekstrakcji wspomaganą ultradźwiękami wynosił 30 min. Wyciągi wodne przygotowane w postaci naparów charakteryzowały się również dość wysoką zdolnością zmiatania wolnych rodników, wynoszącą ponad 81% (tab. I). W dostępnym piśmiennictwie można znaleźć potwierdzenie wysokich właściwości antyoksydacyjnych mierzonych metodą

DPPH, zarówno dla ekstraktów przygotowywanych w rozpuszczalnikach alkoholowych, jak i w wodzie [12, 19, 23-25]. Ważną cechą, mającą wpływ na właściwości antyoksydacyjne, jest sposób sporządzania wyciągu roślinnego. Zielona herbata przyrządzana jest najczęściej w postaci naparów, w których wysuszony surowiec roślinny zalewany jest wodą o odpowiedniej temperaturze, z reguły 80-100°C. Zych i Krzepińko [23] wykazali wysoki potencjał antyoksydacyjny naparu z zielonej herbaty przygotowanego w temp. 80°C w ciągu 8 min (89,92%). W badaniach własnych, przy takiej samej temperaturze parzenia, osiągnięto wynik na podobnym poziomie, wynoszący przy czasie parzenia 5 min – 90,02%, natomiast 15 min – 88,86%. Horżić i wsp. [8] podają, iż aktywność antyoksydacyjna (mierzona metodą DPPH) dla liści zielonej herbaty parzonej w różnych temperaturach (60, 80 oraz 100°C) różni się nieznacznie, wynosząc kolejno: 86, 88 oraz 89%, przy czym wszystkie napary były przygotowywane w czasie 3 min. Do nieco odmiennych wniosków doszli Shuyuan i wsp. [19], którzy stwierdzili, że temperatura zaparzenia ma wpływ na właściwości przeciwutleniające, ponieważ wraz ze wzrostem temperatury wody rośnie potencjał antyoksydacyjny surowca. W badaniach własnych stwierdzono, że przy wyższej temperaturze parzenia (100°C), zdolność zmiatania wolnych rodników otrzymanych naparów była nieco mniejsza w porównaniu z niższą (80°C). Przyczyną odmiennych wyników może być okres przechowywania zielonej herbaty, czego przykładem są wyniki badań Gramzały-Michałowskiej i wsp. [12], potwierdzające zmianę aktywności antyoksydacyjnej w liściach tej rośliny wraz z wydłużeniem czasu przechowywania oraz suszenia surowca.

W badaniu własnym oznaczono także zdolność redukcji jonów żelaza Fe^{3+} do Fe^{2+} metodą FRAP. Otrzymane wartości były zróżnicowane w zależności od rodzaju rozpuszczalnika, przy czym najwyższą stwierdzono dla naparów przygotowanych z użyciem wody o temp. 80 oraz 100°C, przez 30 min. Wieczorek i wsp. [22] stwierdzili potencjał przeciwutleniający zielonej herbaty na poziomie 607 $\mu\text{mol } Fe^{2+}/100 \text{ ml}$ badanego surowca. Autorzy jednak stosowali dużo krótszy czas parzenia (temp. 70°C przez okres 3 min).

Zielona herbata jest jednym z cenniejszych surowców roślinnych ze względu na dużą zawartość składników o działaniu przeciwnadciśnieniowym, do których zaliczamy przede wszystkim polifenole [10, 25-27]. W badaniu własnym ogólna zawartość polifenoli w poszczególnych próbach była dość rozbieżna, co uzależnione było przede wszystkim od zastosowanego rozpuszczalnika. Największą ilością charakteryzowały się wyciągi przygotowane w wodzie o temperaturze pokojowej z użyciem łaźni ultradźwiękowej w czasie 60 min, zaś najmniejszą ekstrakty w stężonym etanolu, przygotowane w czasie 60 min. Duży wpływ na zawartość substancji czynnych może

mieć rodzaj rozpuszczalnika zastosowanego do ekstrakcji. W badaniach Krawczyk i Drużyńskiej [28] do oznaczania stężenia polifenoli, wykorzystywano różne rozpuszczalniki, takie jak metanol z wodą (8:2) oraz aceton z wodą (7:3), przy czym 2-krotnie wyższą zawartością flawonoli charakteryzowały się ekstrakty przygotowane w mieszaninie acetonu z wodą. Na zawartość polifenoli może wpływać również temperatura parzenia. Shuyuan i wsp. [19] informują o wzroście zawartości tych substancji w naparach z liści zielonej herbaty wraz ze wzrostem temperatury parzenia, gdyż przy maceracji w wodzie o temp. 20°C ich zawartość wynosiła ok. 32%, natomiast gdy temperatura wynosiła 100°C – wzrosła do 37%. Wyższą zawartość cennych składników, wraz ze wzrostem temperatury parzenia zielonej herbaty, stwierdzili również Horżić i wsp. [8] podając, że w przypadku parzenia w temp. 100°C przez okres 3 min, zawartość ogólna polifenoli wynosiła 1830 mg kwasu galusowego/l, zaś przy 60°C – 1380 mg. Znalazło to potwierdzenie w badaniach własnych, w których zaobserwowano nieco większą ogólną zawartość polifenoli przy wyższej temperaturze, przy wszystkich czasach parzenia (5, 15, 30 min), natomiast przy temperaturze niższej (80°C), zawartość ogólna polifenoli wzrastała proporcjonalnie do czasu parzenia. Podobną tendencję zaobserwowali Kłódka i wsp. [29], którzy stwierdzili wzrost stężenia kwasu galusowego i kwercetyny wraz z wydłużeniem czasu parzenia, ale autorzy ci przygotowywali napary tylko w jednej temperaturze (100°C). Podobnie Rusinek-Prystupa [30] zaobserwowała wzrost cennych składników, takich jak flawonoidy i fenolokwasy wraz z wydłużeniem czasu zaparzenia liści zielonej herbaty, od 1 do 6 min. Podczas przygotowywania naparu w temp. 60°C rozpuszczają się aminokwasy, natomiast w wyższych temperaturach izolowane są lepiej taniny [7]. Ponadto, podczas 2-3 pierwszych minut parzenia do naparu przedostaje się znaczna ilość alkaloidów, zaś w kolejnych minutach przechodzą garbniki i związki polifenolowe [29], co może być również przyczyną odmiennej aktywności antyoksydacyjnej, w zależności od różnego czasu zaparzenia.

Wnioski

1. Ekstrakty z suszonych liści zielonej herbaty w badanych rozpuszczalnikach charakteryzowały się wysoką aktywnością antyoksydacyjną, mierzoną metodami DPPH, FRAP, ABTS, a także wysoką zawartością polifenoli, ocenianą metodą Folina-Ciocalteu.
2. Zdolności przeciwutleniające badanego surowca były zróżnicowane, zależnie od zastosowanego rozpuszczalnika i czasu ekstrakcji, a także zastosowanej metody pomiaru.
3. Najbardziej korzystne przy sporządzaniu naparów z zielonej herbaty jest zastosowanie wody o temp. 80°C, przy krótkim czasie zaparzenia. Napary

takie charakteryzują się najwyższą aktywnością antyoksydacyjną. Z kolei dłuższy czas zaparzenia prowadzi do zwiększonej ogólnej zawartości cennych polifenoli.

4. Zielona herbata jest cennym surowcem o silnym działaniu przeciwutleniającym. Wyciągi z tej rośliny, zarówno alkoholowe, jak i wodne, korzystnie wpływają na eliminowanie negatywnych skutków stresu oksydacyjnego, przez co mogą być

z powodzeniem wykorzystywane w przemyśle kosmetycznym, jak i w codziennym żywieniu człowieka.

Źródło finansowania: Praca nie jest finansowana z żadnego źródła.

Konflikt interesów: Autorzy deklarują brak konfliktu interesów.

Piśmiennictwo / References

1. Balentine DA, Wiseman SA, Bouwens LC. The chemistry of tea flavonoids. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1997, 37(8): 693-704.
2. Malongane F, McGaw LJ, Mudau FN. The synergistic potential of various teas, herbs and therapeutic drugs in health improvement: a review. *J Sci Food Agric* 2017, 97(14): 4679-4689.
3. Kurleto K, Kurowski G, Laskowska B i wsp. Wpływ warunków parzenia na zawartość antyoksydantów w naparach różnych rodzajów herbat. *Wiad Chem* 2013, 67: 11-12.
4. Górecka D, Korczak J, Długosz B, Heś M. Ocena jakości wybranych gatunków herbat różnego pochodzenia. *Bromat Chem Toksykol* 2004, 37(2): 145-150.
5. Ambrożewicz E, Zapora E, Szczepaniak M i wsp. Porównanie działania czarnej i zielonej herbaty na komórki śródbłonka. *Bromat Chem Toksykol* 2010, 43(1): 66-72.
6. Całka J, Zasadowski A, Juranek J. Niektóre aspekty leczniczego działania zielonej herbaty. *Bromat Chem Toksykol* 2008, 41(1): 5-14.
7. Cieślęwicz J, Grzelakowska A. Zawartość związków polifenolowych w wybranych gatunkach herbat zielonych. *Bromat Chem Toksykol* 2014, 47(2): 155-162.
8. Horżić D, Komes D, Belščak A, et al. The composition of polyphenols and methylxanthines in teas and herbal infusions. *Food Chem* 2009, 115(2): 441-448.
9. Procyk A. O herbacie – prawie wszystko. *Wiad Ziel* 1991, 11: 11-13.
10. Nowak A, Klimowicz A. Zdrowotne oddziaływanie polifenoli zielonej herbaty (*Camellia sinensis* L.). *Kosmos* 2013, 62(1): 87-93.
11. Salah N, Miller NJ, Paganga G, et al. Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and chain-breaking antioxidants. *Arch Biochem Biophys* 1995, 322(2): 339-346.
12. Gramza-Michałowska A, Kobus-Cisowska J, Kmiecik D, et al. Antioxidative potential, nutritional value and sensory profiles of confectionery fortified with green and yellow tea leaves (*Camellia sinensis*). *Food Chem* 2016, 211: 448-454.
13. Ostrowska J. Herbaty – naturalne źródło antyoksydantów. *Gazeta Farm* 2008, 1: 46-50.
14. Burdzenia O. Renesans zielonej herbaty. Cz. I. *Lek w Polsce* 2004, 11(14): 85-95.
15. Nowak A, Zielonka J, Turek M, Klimowicz A. Wpływ przeciwutleniaczy zawartych w owocach na proces fotostarzenia się skóry. *Post Fitoter* 2014, 15 (2): 94-99.
16. Nowak A, Zielonka-Brzezicka J, Pechaiko D i wsp. Ocena właściwości antyoksydacyjnej liści *Ginkgo biloba* L. po zakończeniu wegetacji. *Pomeranian J Life Sci* 2017, 63(1): 24-30.
17. Muzykiewicz A, Zielonka-Brzezicka J, Klimowicz A i wsp. Jarząb pospolity (*Sorbus aucuparia* L.) jako źródło składników o potencjalnym działaniu antyoksydacyjnym – porównanie właściwości przeciwutleniających ekstraktów z liści, kwiatów i owoców. *Probl Hig Epidemiol* 2017, 98(2): 125-132.
18. Zielonka-Brzezicka J, Nowak A, Zielińska M, Klimowicz A. Porównanie właściwości przeciwutleniających wybranych części maliny właściwej (*Rubus idaeus*) i jeżyny europejskiej (*Rubus fruticosus*). *Pomeranian J Life Sci* 2016, 62(4): 52-59.
19. Liu S, Ai Z, Qu F, et al. Effect of steeping temperature on antioxidant and inhibitory activities of green tea extracts against α -amylase, α -glucosidase and intestinal glucose uptake. *Food Chem* 2017, 234: 168-173.
20. Aree T, Jongrungruangchok S. Enhancement of antioxidant activity of green tea epicatechins in β -cyclodextrin cavity: single-crystal X-ray analysis, DFT calculation and DPPH assay. *Carbohydr Polym* 2016, 151: 1139-1151.
21. Ranjbar Nedamani E, Sadeghi Mahoonak A, Ghorbani M, Kashaninejad M. Evaluation of antioxidant interaction in combined extracts of green tea (*Camellia sinensis*), rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and oak fruit (*Quercus branti*). *J Food Sci Technol* 2015, 52(7): 4565-4571.
22. Wieczorek D, Cieszyńska A, Michocka K. Właściwości przeciwutleniające naparów herbat zielonych z różnymi dodatkami. *Probl Hig Epidemiol* 2013, 94(4): 866-868.
23. Zych I, Krzepiło A. Pomiar całkowitej zdolności antyoksydacyjnej wybranych antyoksydantów i naparów metodą redukcji rodnika DPPH. *Chem Dydakt Ekol Metrol* 2010, 15(1): 51-54.
24. Zaiter A, Becker L, Karam MC, Dicko A. Effect of particle size on antioxidant activity and catechin content of green tea powders. *J Food Sci Technol* 2016, 53(4): 2025-2032.
25. Anissi J, El Hassouni M, Ouardaoui A, Sendide K. A comparative study of the antioxidant scavenging activity of green tea, black tea and coffee extracts: a kinetic approach. *Food Chem* 2014, 150: 438-447.
26. Csepregi K, Neugart S, Schreiner M, Hideg É. Comparative evaluation of total antioxidant capacities of plant polyphenols. *Molecules* 2016, 21(2): E208.
27. Koczka N, Móczár Z, Stefanovits-Bányai É, Ombódi A. Differences in antioxidant properties of ginkgo leaves collected from male and female trees. *Acta Pharm* 2015, 65(1): 99-104.
28. Krawczyk P, Drużyńska B. Porównanie oznaczania zawartości katechin w liściach zielonej i czarnej herbaty metoda waniolinową i metodą HPLC. *Żywn Nauka Technol Jakość* 2007, 5(54): 260-266.
29. Klódko D, Bońkowski M, Telesiński A. Zawartość wybranych metyloksantyn i związków fenolowych w naparach różnych rodzajów herbat rozdrobnionych (dust i fannings) w zależności od czasu parzenia. *Żywn Nauka Technol Jakość* 2008, 1(56): 103-113.
30. Rusinek-Prystupa E. Zawartość związków biologicznie czynnych w naparach różnych gatunków herbat w zależności od czasu parzenia. *Bromat Chem Toksykol* 2013, 46(1): 48-52.