

## WPŁYW CZASU I RODZAJU ROZPUSZCZALNIKA NA EFEKTYWNOŚĆ EKSTRAKCJI POLIFENOLI Z CZARNEJ HERBATY I WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWRODNIKOWE OTRZYMANÝCH EKSTRAKTÓW

Beata Drużyńska<sup>✉</sup>, Joanna Sułek, Marta Ciecierska, Dorota Derewiaka,  
Jolanta Kowalska, Ewa Majewska, Rafał Wołosiak  
SGGW w Warszawie, Wydział Nauk o Żywności

**Streszczenie.** Celem pracy było zbadanie wpływu rodzaju rozpuszczalnika i czasu prowadzenia procesu na efektywność ekstrakcji polifenoli oraz właściwości przeciwrodnikowe ekstraktów z czarnej herbaty. Ekstrakcję prowadzono w temperaturze pokojowej z użyciem pięciu rozpuszczalników: wody oraz 80- i 100-procentowych roztworów wodnych acetonu i metanolu w czasie 30 i 60 minut. W otrzymanych ekstraktach oznaczono zawartość polifenoli ogółem i katechin. Właściwości przeciwrodnikowe ekstraktów zbadano metodą z wykorzystaniem kationorodników ABTS i stabilnych rodników DPPH. Określono również zdolności ekstraktów do chelatowania jonów żelaza(II).

Zaobserwowano, iż najlepszym rozpuszczalnikiem do ekstrakcji związków polifenolowych jest 80-procentowy roztwór acetonu, a do ekstrakcji katechin – woda. Wszystkie badane ekstrakty posiadały zdolność do chelatowania jonów żelaza(II) i wykazywały aktywność przeciwrodnikową. Stwierdzono, iż wydłużenie czasu ekstrakcji powodowało nieznaczne zwiększenie wyekstrahowania związków polifenolowych oraz wzrost aktywności przeciwrodnikowej badanych ekstraktów. W większości nie były to jednak różnice istotne statystycznie.

**Słowa kluczowe:** ekstrakcja, polifenole, aktywność przeciwrodnikowa, czarna herbata

### WSTĘP

Polifenole to związki o silnych właściwościach antyoksydacyjnych. Działanie przeciwutleniające polifenoli przejawia się w zapobieganiu powstawania reaktywnych form tlenu, inaktywowaniu już istniejących rodników oraz w ich zdolności do chelatowania

---

<sup>✉</sup>beata\_druzynska@sggw.pl

jonów metali przejściowych. Ponadto związki te potrafią hamować działanie enzymów przyczyniających się do wytworzenia wolnych rodników tlenowych, a także biorą udział w regeneracji witamin [Khan i Mukhtar 2015]. Zbyt duże nagromadzenie się reaktywnych form tlenu w organizmie człowieka powoduje zachwianie równowagi między procesami przeciwutleniającymi a wolnorodnikowymi, co może prowadzić do wystąpienia stresu oksydacyjnego, którego efektem może być wiele chorób [Tsao 2010, Lopez de Dicastillo i in. 2013, Afzal i in. 2015]. Podobnie, reaktywne formy azotu – tlenek azotu czy nadtlenoazotyn działają negatywnie na komórki lub wytwarzają produkty toksyczne [Rutkowski i in. 2007]. Jednym z mechanizmów obronnych przed wolnymi rodnikami jest właśnie działanie antyoksydantów. Bogatym źródłem związków o charakterze polifenolowym są warzywa, owoce oraz napoje, takie jak herbata, kawa i czerwone wino. Na zawartość polifenoli w żywności ma wpływ wiele czynników. W głównej mierze zależy ona od rodzaju i odmiany surowców. Do środowiskowych czynników wpływających na zawartość polifenoli zaliczamy: rodzaj gleby, ekspozycje na słońce oraz ilość opadów. Do pozostałych czynników należą warunki przechowywania surowców oraz metody obróbki kulinarnej [Manach i in. 2004].

Równie ważnym elementem jest sposób ekstrakcji z materiału roślinnego. Związki te różnią się budową strukturalną. Ich struktura chemiczna i interakcje z innymi składnikami żywności nie są w pełni znane, a jest to bardzo ważny aspekt przy wyborze rozpuszczalników i ustalaniu warunków prowadzenia procesu ekstrakcji. Polifenole są również podatne na utlenianie. Wysoka temperatura oraz środowisko alkaliczne powodują ich degradację. Z tego powodu przygotowanie prób do ekstrakcji oraz parametry prowadzenia procesu są bardzo ważnymi czynnikami, na które należy zwrócić szczególną uwagę [Drużyńska 2007, Dai i Mumper 2010, Simon i in. 2014].

Mimo rozwoju nowych technik ekstrakcji, klasyczna ekstrakcja dominuje w wielu laboratoriach ze względu na swoją prostotę oraz niski koszt. Wydajność procesu można regulować poprzez dobór odpowiednich rozpuszczalników oraz czas trwania procesu [Drużyńska i in. 2007].

Celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu pięciu różnych rozpuszczalników (80- i 100-procentowego acetonu, 80- i 100-procentowego metanolu i wody) oraz dwóch czasów ekstrakcji (30 i 60 minut) na efektywność ekstrakcji polifenoli z czarnej herbaty, a także zbadanie właściwości przeciwrodnikowych otrzymanych ekstraktów. Do analizy wybrano czarną herbatę, która jest źródłem przede wszystkim polifenoli (katechin, teafławin, tearubigin, kwasów fenolowych i antocyjanidyn), a także alkaloidów [Li i in. 2013, Pan i in. 2013, Zhu i in. 2016, Peluso i Serafini 2017].

## MATERIAŁ I METODY

Materiałem badawczym w pracy była czarna cejlońska herbata liściasta Dilmah. Jest to herbata trzeciej klasy Orange Pekoe, charakteryzująca się dużymi, niełamanymi liśćmi. Miejscem pochodzenia i zapakowania była Sri Lanka. W trakcie badań herbata była przechowywana w zaciemnionym, suchym miejscu w oryginalnych opakowaniach.

W celu przygotowania ekstraktów naważano 10 g badanej herbaty i dodawano po 100 ml roztworu ekstrahującego (wody, 80- i 100-procentowego metanolu oraz

80- i 100-procentowego acetonu – roztwory wodne, v/v) [Perva-Uzunalic i in. 2006]. Ekstrakcję prowadzono na wytrząsarce WL-1, Biosan w temperaturze pokojowej, w czasie 30 i 60 minut w każdym z roztworów ekstrahujących. Ekstrakty wodne przechowywano w warunkach zamrażalniczych, z kolei ekstrakty acetonowe i metanolowe przechowywano w lodówce w temperaturze ok. 2°C, nie dłużej niż 4 tygodnie.

Charakterystyka chemiczna otrzymanych ekstraktów obejmowała określenie zawartości polifenoli ogółem (wynik wyrażano w przeliczeniu na kwas galusowy) [Singleton i Rossi 1965] i katechin (wynik przeliczano na (-)epikatechinę) [Price i in. 1978].

Oznaczanie zdolności do chelatowania jonów żelaza(II) wykonano metodą Lai i inych [2001]. Oznaczanie zdolności ekstraktów do dezaktywacji stabilnych rodników DPPH [Song i in. 1999] oraz oznaczanie zdolności ekstraktów do dezaktywacji kationorodników ABTS<sup>+</sup> [Re i in. 1999] przeprowadzono metodami spektrofotometrycznymi. Aktywność przeciwrodnikową wyrażano w %.

Analizę statystyczną wyników przeprowadzono z użyciem programu Microsoft Excel 2007 i Statgraphics Centurion XVI (analiza korelacji, analiza wariancji, test Tukeya). Wszystkie oznaczenia wykonano w co najmniej trzech powtórzeniach. Za wynik badania przyjmowano średnią wartość oznaczeń. Wykorzystane w obliczeniach statystycznych  $p > 0,05$  potraktowano jako informację statystycznie nieistotną.

## WYNIKI I DISKUSJA

Najbardziej skutecznym ekstrahentem polifenoli spośród badanych rozpuszczalników okazał się 80-procentowy roztwór acetonu – 2,8 g/100 g s.s. po 30. minutowej ekstrakcji i 3,2 g/100 g s.s. po 60-minutowej ekstrakcji (tab. 1). Mniejszą efektywność ekstrakcji w stosunku do 80-procentowego acetonu wykazały 80-procentowy metanol – o 25% i woda – o 29%, natomiast najmniej efektywnymi ekstrahentami były metanol 100% (efektywność ekstrakcji niższa o 71%) oraz aceton 100% (efektywność niższa o 97%). Ponadto 30-minutowa ekstrakcja przy użyciu 80-procentowego acetonu była bardziej efektywna niż trwające 60 minut ekstrakcje przeprowadzane za pomocą pozostałych rozpuszczalników. Ekstrakcje przy użyciu wody jako rozpuszczalnika zarówno po czasie 30, jak i 60 minut były efektywniejsze niż ekstrakcje prowadzone za pomocą stężonych rozpuszczalników (metanol 100% oraz aceton 100%).

Turkmen i inni [2006], badając skuteczność różnych rozpuszczalników w wydobywaniu polifenoli z czarnej herbaty również stwierdzili wysoką zdolność ekstrakcyjną 80-procentowego roztworu acetonu, a woda dla zastosowanych przez nich warunków prowadzenia procesu wydobywała polifenole słabiej niż roztwory alkoholowe. Podobne wyniki uzyskano w niniejszej pracy. Według badań Dmowskiego i inych [2013], zawartość polifenoli w czarnych herbatach zaparzanych wodą kształtowała się na poziomie 2017,1–9733,8 mg/100 g s.s. W niniejszej pracy oznaczona zawartość polifenoli zarówno po czasie 30, jak i 60 minut wynosiła około 2000 mg/100 g s.s. Dmowski i inni [2013] zauważają, że zawartość polifenoli w czarnych herbatach zależy od wielu różnych czynników, między innymi od jakości badanego surowca, miejsca pochodzenia, a także sezonu zbioru. Zwracają oni też uwagę, że podczas transportu herbata jest narażona na działanie czynników środowiskowych, takich jak zmienna wilgotność

Tabela 1. Zawartość polifenoli ogółem i katechin w czarnej herbacie po 30- i 60-minutowej ekstrakcji

Table 1. The content of total polyphenols and catechins in black tea after 30 and 60 minutes extraction

Ekstrakcja 30 minut 30 minutes extraction	Polifenole ogółem Total polyphenols [g/100 g s.s].	Katechiny Catechins [g/100 g s.s.]
Metanol 80% Methanol 80%	2,09 ( $\pm 0,11$ ) a	0,65 ( $\pm 0,01$ ) b
Metanol 100% Methanol 100%	0,80 ( $\pm 0,05$ ) b	0,12 ( $\pm 0,003$ ) c
Aceton 80% Acetone 80%	2,83 ( $\pm 0,56$ ) a	0,80 ( $\pm 0,01$ ) a
Aceton 100% Acetone 100%	0,09 ( $\pm 0,01$ ) c	0,07 ( $\pm 0,001$ ) c
Woda Water	2,04 ( $\pm 0,09$ ) a	0,92 ( $\pm 0,09$ ) a
Ekstrakcja 60 minut 60 minutes extraction		
Metanol 80% Methanol 80%	2,42 ( $\pm 0,23$ ) b	0,75 ( $\pm 0,06$ ) b
Metanol 100% Methanol 100%	0,92 ( $\pm 0,01$ ) c	0,11 ( $\pm 0,002$ ) c
Aceton 80% Acetone 80%	3,16 ( $\pm 0,40$ ) a	0,82 ( $\pm 0,02$ ) a
Aceton 100% Acetone 100%	0,11 ( $\pm 0,002$ ) d	0,09 ( $\pm 0,004$ ) c
Woda Water	2,12 ( $\pm 0,03$ ) b	0,95 ( $\pm 0,11$ ) a

a–d – różnice między wartościami średnimi oznaczonymi różnymi literami są statystycznie istotne ( $p < 0,05$ )/  
/differences among mean values denoted by different letters are statistically significant ( $p < 0.05$ ).

powietrza, fluktuacje temperatury, co może niekorzystnie wpływać na ich jakość. Należy również zauważyć, że oznaczanie polifenoli ogółem metodą Folina-Ciocalteu'a jest metodą niedokładną i zawyżoną w roztworach zawierających inne związki o charakterze redukującym (np. białka). W niniejszej pracy dotyczy to przede wszystkim ekstraktów wodnych.

Najwyższą zawartość katechin uzyskano przez wytrząsanie herbaty z wodą – 30- i 60-minutowe ekstrakcje dały podobne rezultaty (około 0,9 g/100 g s.m. herbaty) – tabela 1. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono również, że wysoką zawartość katechin uzyskuje się, ekstrahując katechiny 80-procentowym roztworem acetonu. Ilość uzyskanych katechin za pomocą tego rozpuszczalnika była podobna po obu czasach ekstrakcji (około 0,8 g/100 g s.m.). Efektywność ekstrakcji tym rozpuszczalnikiem w stosunku do

ekstrakcji wodą była o około 14% niższa. Ekstrakcje przy użyciu wody jako rozpuszczalnika zarówno po czasie 30, jak i 60 minut były efektywniejsze niż ekstrakcje prowadzone za pomocą stężonych rozpuszczalników (metanol 100% oraz aceton 100%).

Na poziomie istotności  $\alpha = 0,05$  wykonano analizę wariancji (ANOVA) dwuczynnikowego doświadczenia, badającego wpływ czasu ekstrakcji (na dwóch poziomach zmienności) oraz rodzaju rozpuszczalnika (na pięciu poziomach zmienności) na efektywność ekstrakcji polifenoli z czarnej herbaty. Czynniki głównymi istotnie wpływającymi na zawartość polifenoli były: rodzaj rozpuszczalnika, czas ekstrakcji oraz ich współdziałanie. Nie stwierdzono statystycznie istotnego wpływu ( $p > 0,05$ ) czasu ekstrakcji na efektywność wydobycia katechin z czarnej herbaty.

Perva-Uzunalic i inni [2006], którzy zajmowali się badaniem wydajności ekstrakcji katechin z zielonej herbaty stwierdzili, że 80-procentowy roztwór acetonowy działa bardziej efektywnie (95,2% wszystkich katechin obecnych w herbacie przechodziło do roztworu) niż 80-procentowym etanol (odzysk katechin na poziomie 89,1%) i 80-procentowym metanol (wydobycie katechin na poziomie 77,9%). Woda, która w niniejszej pracy najefektywniej ekstrahowała katechiny, według autorów działała najslabiej, należy jednak zauważyć, że prowadzili oni ekstrakcję dwugodzinną w punkcie wrzenia rozpuszczalnika, a w tych warunkach, jak wspomniano wcześniej, może nastąpić rozpad katechin i najprawdopodobniej dlatego uzyskana przez nich wydajność ekstrakcji katechin przy użyciu wody była najniższa.

Właściwości przeciwrodnikowe ekstraktów zielonej herbaty otrzymanych podczas prowadzenia procesu w różnych warunkach oznaczono trzema metodami. Zbadano ich zdolność do dezaktywacji stabilnych rodników DPPH, zmiatania kationorodników ABTS i chelatowania jonów żelaza (II).

Przeprowadzone badania wykazały, że wszystkie ekstrakty posiadały zdolności dezaktywacji syntetycznych rodników DPPH (tab. 2). Stwierdzono, że dla każdego z rozpuszczalników wraz z wydłużeniem czasu ekstrakcji otrzymane roztwory w większym stopniu dezaktywują rodniki. Nie były to jednak różnice istotne statystycznie. Ponieważ wcześniej stwierdzono wzrost ilości wyekstrahowanych związków polifenolowych z materiału wraz z wydłużeniem czasu ekstrakcji poszukano związku między zawartością związków polifenolowych w roztworach a aktywnością przeciwrodnikową tych roztworów. Najsilniejsze właściwości wobec rodników DPPH wykazywały ekstrakty 80-procentowego metanolu (powyżej 95%) i 80-procentowego acetonu (od 94 do 97% w zależności od czasu ekstrakcji), najslabiej działały ekstrakty wodne czarnej herbaty (% zmiatanych rodników był na poziomie około 50). Efektywność dezaktywacji rodników DPPH w przypadku ekstraktów wodnych była niższa o około 47% w stosunku do ekstraktu z 80-procentowym metanolem i o około 50% w stosunku do ekstraktów z 80-procentowym acetonem.

Drużyńska i inni [2007] badali aktywność przeciwrodnikową zielonej herbaty wobec stabilnych rodników DPPH w ekstraktach acetonowych, metanolowych i wodnych. Najsilniejszym działaniem przeciwrodnikowym w ich badaniach charakteryzował się ekstrakt acetonowy 80%, a następnie ekstrakt metanolowy 80%. Uzyskali wyniki w ekstrakcie 80% acetonowym: ekstrakcja 30-minutowa: 76,3%; ekstrakcja 60-minutowa: 84,4%. W ekstrakcie metanolowym 80%: ekstrakcja 30-minutowa: 58,5%; ekstrakcja 60-minutowa: 60%. Różnice między otrzymanymi w niniejszej pracy wynikami a wartościami

Tabela 2. Zdolność ekstraktów z czarnej herbaty do dezaktywacji rodników DPPH, kationorodników ABTS i chelatowania jonów żelaza (II) po 30- i 60-minutowej ekstrakcji

Table 2. The ability of the extracts of black tea to deactivate the DPPH radicals cation radicals ABTS and chelate iron ion (II) after 30 and 60 minutes extraction

Ekstrakcja 30 minut 30 minutes extraction	Zdolność chelatowania Chelating ability [%]	Rodniki DPPH DPPH radicals [%]	Kationorodniki ABTS ABTS cation radicals [%]
Metanol 80% Methanol 80%	44,77 ( $\pm 2,31$ ) c	95,86 ( $\pm 1,12$ ) a	99,26 ( $\pm 0,99$ ) a
Metanol 100% Methanol 100%	95,52 ( $\pm 3,05$ ) ab	89,11 ( $\pm 1,14$ ) ab	69,67 ( $\pm 0,98$ ) b
Aceton 80% Acetone 80%	87,90 ( $\pm 1,59$ ) b	94,92 ( $\pm 1,65$ ) a	99,41 ( $\pm 0,89$ ) a
Aceton 100% Acetone 100%	99,13 ( $\pm 2,32$ ) a	77,45 ( $\pm 2,00$ ) b	12,55 ( $\pm 0,45$ ) c
Woda Water	25,48 ( $\pm 1,03$ ) c	45,77 ( $\pm 0,98$ ) c	99,03 ( $\pm 0,97$ ) a
<hr/>			
Ekstrakcja 60 minut 60 minutes extraction			
Metanol 80% Methanol 80%	54,50 ( $\pm 2,53$ ) b	98,52 ( $\pm 1,06$ ) a	99,31 ( $\pm 0,78$ ) a
Metanol 100% Methanol 100%	97,18 ( $\pm 1,89$ ) a	90,25 ( $\pm 0,89$ ) a	69,82 ( $\pm 0,98$ ) b
Aceton 80% Acetone 80%	97,70 ( $\pm 1,44$ ) a	97,69 ( $\pm 2,07$ ) a	99,82 ( $\pm 0,90$ ) a
Aceton 100% Acetone 100%	99,83 ( $\pm 1,24$ ) a	77,72 ( $\pm 1,45$ ) b	15,02 ( $\pm 0,79$ ) c
Woda Water	31,11 ( $\pm 1,73$ ) c	57,92 ( $\pm 1,01$ ) c	99,22 ( $\pm 0,98$ ) a

a–c – różnice pomiędzy wartościami średnimi oznaczonymi różnymi literami są statystycznie istotne ( $p < 0,05$ ) / differences among mean values denoted by different letters are statistically significant ( $p < 0.05$ ).

uzyskanymi przez Drużyńską i innych [2007] mogą wynikać z odmiennego materiału badawczego, a także z innych warunków ekstrakcji. Analogię można dostrzec w tym, iż zarówno w badaniach Drużyńskiej i innych [2007], jak i w obecnej pracy ekstrakcje przeprowadzone za pomocą wody charakteryzowały się najniższą zdolnością do wychwytywania stabilnych rodników DPPH spośród wszystkich badanych ekstrahentów. Może to być związane z niską stabilnością związków polifenolowych w wodzie. Podobne wyniki uzyskali również Bhebhe i inni [2016].

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że wszystkie roztwory posiadają zdolności dezaktywacji syntetycznych kationorodników ABTS (tab. 2). Właściwości te były nieco większe dla ekstraktów otrzymanych w wyniku dłuższego wytrząsania herbaty czarnej z każdym z badanych układów ekstrahujących. Nie były to jednak różnice

istotne statystycznie. Najwyższy poziom dezaktywacji rodników ABTS wykazał ponownie ekstrakt metanolowy 80% i acetonowy 80% oraz ekstrakt wodny. Związki zawarte w ekstrakcie metanolowym 100% dezaktywowały rodniki na dość wysokim poziomie (około 70%). Najmniejszą zdolnością do unieczynnienia kationorodników ABTS charakteryzowały się substancje zawarte w ekstrakcie acetonowym 100% (15,02% zdezaktywowanych rodników po 60 minutach ekstrakcji).

Z przeprowadzonej analizy regresji wynika, że istnieje bardzo silna dodatnia korelacja między zawartością w ekstraktach katechin a zdolnością ekstraktów do zmiatania kationorodników ABTS (korelacja na poziomie istotności  $\alpha = 0,05$ ). Obliczony współczynnik determinacji wskazuje, że obecne w ekstraktach katechiny w ok. 98% decydują o zdolności ekstraktów czarnej herbaty do inhibicji rodników ABTS.

Waszkiewicz-Robak i inni [2005] badali aktywność antyoksydacyjną ekstraktów wodnych z liściastych herbat zielonych, czarnych i czerwonych wyrażoną jako zdolność do unieczynniania kationorodników ABTS. Ich wyniki pokazały, że ekstrakt z zielonej herbaty w najwyższym stopniu dezaktywował te rodniki (ok. 100%). Ekstrakt z herbaty czarnej charakteryzował się zdolnością do związania ok. 48% rodników ABTS, natomiast najsłabsze działanie w tej reakcji wykazał ekstrakt z czerwonej herbaty (ok. 37%). Wynik otrzymany przez Waszkiewicz-Robak i innych [2005] dotyczący wodnego ekstraktu z czarnej herbaty jest o połowę niższy niż wartość zamieszczona w obecnej pracy. Różnica może wynikać z odmiennego składu chemicznego badanej herbaty. W niniejszych oznaczeniach materiał badawczy stanowiła cejlońska herbata Dilmah, natomiast Waszkiewicz-Robak i inni [2005] przeprowadzali oznaczenia na herbacie Yunnan pochodzącej z Chin.

Właściwości wiązania jonów metali przejściowych mają duży udział w aktywności przeciwutleniającej polifenoli, dlatego w pracy oznaczono zdolności poszczególnych ekstraktów czarnej herbaty do chelatowania jonów żelaza(II) (tab. 2). W największym stopniu jony żelaza były wiązane przez ekstrakty acetonowe 100% (% schelatowanego żelaza wyniósł ok. 99). Najsłabiej wiązały jony żelaza roztwory wodne (od 25 do 31% w zależności od czasu ekstrakcji). Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, iż wydłużenie czasu ekstrakcji skutkowało większą zdolnością chelatowania jonów żelaza przez wszystkie badane ekstrakty, ale jedynie w przypadku roztworu 80-procentowego acetonu różnica ta była istotna statystycznie. Na poziomie istotności  $\alpha = 0,05$  wykonano analizę wariancji (ANOVA) dwuczynnikowego doświadczenia, badającego wpływ czasu ekstrakcji (na dwóch poziomach zmienności) oraz rodzaju rozpuszczalnika (na pięciu poziomach zmienności) na zdolność kompleksowania jonów żelaza(II). Wykazano istotny wpływ rodzaju rozpuszczalnika, czasu ekstrakcji oraz współdziałania tych czynników na zdolność ekstraktów do chelatowania jonów  $Fe^{2+}$ .

Drużyńska i inni [2007] badali zdolność do chelatowania jonów  $Fe^{2+}$  przez zieloną herbatę w ekstraktach acetonowych 80%, metanolowych 80% i wodnych. W ich badaniach, podobnie jak w uzyskanych w niniejszej pracy wynikach, jony żelaza były związane w najwyższym stopniu przez ekstrakty acetonowe (ekstrakcja 30. minutowa: 64,4%; ekstrakcja 60. minutowa: 76,5%). Wyniki te są jednak niższe niż prezentowane w obecnej pracy, co świadczy o tym, iż ekstrakty z czarnej herbaty z większą wydajnością kompleksują jony żelaza(II). W ekstraktach wodnych Drużyńska i inni [2007] uzyskali natomiast wyniki w przedziale (ekstrakcja 30-minutowa: 45,1%; ekstrakcja 60-minutowa: 56,1%).

Powodem niższych wartości prezentowanych w niniejszej pracy mogło być użycie do oznaczeń innego rodzaju herbaty.

Worobiej i Tyszka [2012] badały zdolność do kompleksowania jonów żelaza(II) przez ekstrakty wodne czarnych herbat liściastych, granulowanych i ekspresowych. Najsilniejsze właściwości chelatujące charakteryzowały herbaty liściaste (46,7–49,7%). Są to wyniki wyższe niż uzyskane w niniejszej pracy. Worobiej i Tyszka [2012] w swoich badaniach do przygotowania ekstraktów wodnych używały wody destylowanej o temperaturze 100°C, natomiast w prezentowanych w obecnej pracy badaniach była wykorzystywana woda destylowana o temperaturze pokojowej, stąd prawdopodobnie rozbieżności w wynikach.

## WNIOSKI

1. Najskuteczniejszym ekstrahentem katechin (spośród badanych rozpuszczalników) była woda, natomiast najwyższe wydobycie polifenoli ogółem osiągnięto stosując 80-procentowy roztwór wodny acetonu.
2. Wszystkie ekstrakty z czarnej herbaty wykazały właściwości przeciwrodnikowe wobec stabilnych rodników DPPH i kationorodników ABTS, a także zdolności chelatowania jonów żelaza(II).
3. We wszystkich oznaczeniach wydłużenie czasu ekstrakcji powodowało zwiększenie zawartości związków polifenolowych oraz wzrost aktywności przeciwrodnikowej badanych ekstraktów. W większości nie były to jednak różnice istotne statystycznie.

## LITERATURA

- Afzal M., Safer A.M., Menon M., 2015. Green tea polyphenols and their potential role in health and disease. *Inflammopharmacology* 23, 151–161.
- Bhebbhe M., Füler T.N., Chipurura B., Muchuweti M., 2016. Effect of solvent type on total phenolic content and free radical scavenging activity of black tea and herbal infusions. *Food Anal. Method* 9, 1060–1067.
- Dai J., Mumper R.J., 2010. Plant Phenolics: Extractions, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules* 15, 7313–7352.
- Dmowski P., Śmiechowska M., Tesmar A., 2013. Właściwości przeciwutleniające herbaty jako czynnik kształtujący jej wartość zdrowotną. *Probl. Hig. Epidemiol.* 94, 309–312.
- Drużyńska B., Stępniewska A., Wołosiak R., 2007. The influence of time and type of solvent on efficiency of the extraction of polyphenols from green tea and antioxidant properties obtained extracts. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* 6(1), 27–36.
- Khan N., Mukhtar H., 2015. Dietary Agents for prevention and treatment of lung cancer. *Cancer Lett.* 359, 155–164.
- Lai L.S., Chou S.T., Chao W.W., 2001. Studies on the antioxidative activities of Hsian-tsoa leaf gum. *J. Agric. Food Chem.* 49, 963–968.
- Li S., Lo Ch-Y., Lai Ch-S., Ho Ch-T., 2013. Black tea: Chemical analysis and stability. *Food Funct.* 4, 10–18.



- Lopez de Dicastillo C., del Mar Castro-Lopez M., Lopez-Vilarino J.M., Gonzalez-Rodriguez M.V., 2013. Immobilization of green tea extract on polypropylene films to control the antioxidant activity in food packing. *Food. Res. Int.* 53, 522–528.
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 727–747.
- Pan M-H., Lai Ch-S., Wang H., Lo Ch-Y., Ho Ch-T., Li S., 2013. Black tea in chemo-prevention of cancer and other human diseases. *Food Sci. Hum. Wellness* 2, 12–21.
- Perlusio I., Serafini M., 2017. Antioxidants from black and green tea: from dietary modulation of oxidative stress to pharmacological mechanism. *Brit J. Pharm.* 11, 1195–1208.
- Perva-Uzunalic A., Skerget M., Knez Z., Weinreich B., Otto F., Grucher S., 2006. Extraction of active ingredients from green tea (*Camellia sinensis*): Extraction efficiency of major catechins and caffeine. *Food Chem.* 96, 597–605.
- Price M.L., Van Scoyoc S., Butler L.G., 1978. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *J. Agric. Food Chem.* 26, 1214–1218.
- Re R., Proteggente A., Pellergrini N., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 9–10, 1231–1237.
- Rutkowski R., Pancewicz S.A., Rutkowski K., Rutkowska J., 2007. Znaczenie reaktywnych form tlenu i azotu w patomechanizmie procesu zapalnego. *Pol. Merk. Lek.* 134, 131–138.
- Simon B., Chemat F., Strube J., 2014. Extraction of polyphenols from black tea – Conventional and ultrasound assisted extraction. *Ultrason. Sonochem.* 21, 1030–1034.
- Singleton V.L., Rossi J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16, 144–158.
- Song T.T., Hendrich S., Murphy P.A., 1999. Estrogenic activity of glycitein, a soy isoflavone. *J. Agric. Food Chem.* 47, 1607–1610.
- Tsao R., 2010. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients* 2, 1231–1246.
- Turkmen N., Sari F., Velioglu Y.S., 2006. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. *Food Chem.* 4, 835–841.
- Waszkiewicz-Robak B., Rusaczonk A., Świdorski F., 2005. Charakterystyka właściwości antyoksydacyjnych herbat liściastych. *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska* 60, 169–172.
- Worobiej E., Tyszka K., 2012. Właściwości przeciwutleniające różnych rodzajów herbat czarnych. *Bromat. Chem. Toksykol.* 3, 659–664.
- Zhu F., Sakulnak R., Wang S., 2016. Effect of black tea on antioxidant, textural, and sensory properties of Chinese steamed bread. *Food Chem.* 194, 1217–1223.

## THE INFLUENCE OF TIME AND TYPE OF SOLVENT ON EFFICIENCY OF THE EXTRACTION OF POLYPHENOLS FROM BLACK TEA AND ANTIRADICAL PROPERTIES OBTAINED EXTRACTS

**Summary.** Polyphenols are compounds with strong antioxidant properties. Antioxidant activity of the polyphenols is manifested in the prevention of the formation of reactive oxygen radicals inactivate existing and in their ability to chelate metal ions. Furthermore, these compounds can inhibit the activity of enzymes contributing to the production of oxygen free radicals and participate in the regeneration of vitamins. A rich source of polyphenolic compounds are as vegetables, fruits, and beverages such as tea, coffee

and red wine. The extraction process of polyphenols is difficult for two reasons. First, these compounds differ structurally. Polyphenols are present in combination with sugars, proteins, and form a polymerized derivatives having a different solubility. Their chemical structure and interaction with other food ingredients are not fully known, and this is a very important aspect when choosing a solvent and determining the conditions of the extraction process. Secondly polyphenols are susceptible to oxidation. High temperature and alkaline environment causing their degradation. For this reason, sample preparation for extraction and the parameters of the process are very important factors that you should pay special attention

The aim of the research was to explore the influence of five extraction solvents: 80% acetone, 100% acetone, 80% methanol, 100% methanol and water and two times of the extraction: 30 minutes and 60 minutes on efficiency of the extraction of total polyphenols and condensed tannins from black tea. The antiradical properties have been determined by two methods: scavenging activity against DPPH radicals and the method with ABTS<sup>•+</sup>. The abilities of extracts to chelate iron ions(II) have been investigated too.

The most effective extractant polyphenols of the solvents tested was 80% acetone – 2.8 g/100g d.m. in 30 minute extraction and 3.2 g/100 g d.m. 60 minute extraction. The highest catechin content of tea was obtained by shaking with water – 30 and 60 minute extractions yielded similar results (about 0.9 g/100 g tea d.m.). All of the black tea extracts have shown antiradical properties to the stable radical DPPH and ABTS cation radicals, and to be able to chelate iron(II). It was found that the extraction time caused a slight increase in the extraction of polyphenol compounds and an increase in the antiradical activity of the extracts. These were not statistically significant differences.

**Key words:** extraction, polyphenols, antiradical activity, black tea