

OPTIMALIŲ EKSTRAKCIJOS SĄLYGŲ PARINKIMAS KOFEINO KIEKIO NUSTATYMOI ARBATOJE EFEKTYVIOSIOS SKYSČIŲ CHROMATOGRAFIJOS METODU

Inga Stankevičienė, Jolanta Jurkevičiūtė

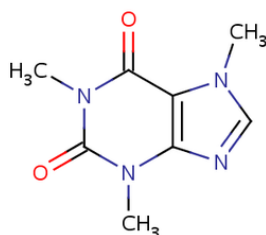
Vilniaus kolegija

Anotacija. Dėl stimuliuojančio poveikio žmogus vidutiniškai suvartoja nuo 150 iki 225 mg kofeino per dieną. Vienas iš daugiausiai kofeino turinčių augalų yra arbata. Todėl tyrimo objektu pasirinkta vieno žinomiausių prekės ženklų juodoji Ceilono stambialapė arbata (gamintojas Šri Lanka „ROYAL ELIXIR TEA“). Mėginiuose kofeino kiekis nustatomas įvairiais tyrimo metodais, tačiau vienas sparčiausių ir dažniausiai taikomų – efektyvioji skysčių chromatografija (ESCh). Taikant šį tyrimo metodą, mėginio paruošimas – ekstrahavimas – yra sudėtingiausias ir ilgiausias etapas. Todėl svarbu parinkti kuo efektyvesnį, spartesnį bei pigesnį mėginio paruošimo būdą. Šiuo tyrimu buvo siekiama patikrinti skirtingų faktorių įtaką kofeino ekstrakcijai bei įvertinti, kuris ekstrakcijos būdas yra optimalus. Tam kofeino ekstrahavimas analizės vandeniu buvo atliekamas skirtingomis sąlygomis – naudojant smulkintą (dalelių dydis 0,2 mm) ir nesmulkintą arbatos mėginius, termostatuojant ir veikiant ultragarsu (dažnis 44 kHz) skirtingoje temperatūroje (25 °C, 30 °C, 60 °C ir 80 °C) skirtingą laiką tarpą (3 min, 5 min, 15 min ir 30 min). Ekstraktas buvo tiriamas ESCh metodu (skysčių chromatografas Shimadzu LC-2010AHT su UV detektoriumi). Chromatografavimo sąlygos: kolonėlės temperatūra 40 °C; mėginio tūris 10 µl; srauto greitis 1 ml/min; UV detektoriaus bangos ilgis 254 nm; gradientinis eliuavimas atliekamas naudojant tirpiklius vandenį ir acetonitrilą; analizės trukmė 11 min. Chromatogramoje kofeino smailė stebima ties 2,35 min. Tyrimo metu nustatyta, kad kofeino ekstrakcija greičiausia pirmąsias 3 min, toliau – sulėtėja. Didžiausias nustatytas kofeino kiekis arbatos mėginiuose yra apie 3800 mg/100 g. Gauti rezultatai parodė, kad optimalus, efektyvus ir spartus mėginio paruošimo būdas yra kofeino vandeninė ekstrakcija iš 0,2 mm dalelių dydžio arbatos termostatuojant 80 °C temperatūroje 5 min.

Reikšminiai žodžiai: kofeinas, ekstrahavimas, efektyvioji skysčių chromatografija, arbata.

Įvadas

Kofeinas ($C_8H_{10}N_4O_2$, 1,3,7-trimetil-2,6-purindionas) yra purino alkaloidas (1 pav.) (Astorino ir kt., 2015). Jis randamas daugiau kaip 60 augalų. Daugiausiai kofeino turi guaranos sėklos (5 %), matės lapai (3 %), arbatos lapeliai (2–5 %), kolos riešutai (1,5–2,5 %) bei kavos pupelės (0,6–2,8 %) (Nacionalinis maisto ir veterinarijos rizikos vertinimo institutas, 2016). Dėl jo stimuliuojančio poveikio, žmogus vidutiniškai kasdien suvartoja 150–225 mg kofeino, kurio didžiąsą dalį gauna su kava ir arbata. Puodelyje kavos yra 50–150 mg kofeino, puodelyje arbatos – per 50 mg (Nacionalinis maisto ir veterinarijos rizikos vertinimo institutas; McLellan ir kt., 2016; Acus, Stukas, 2017). Tačiau, tyrimais nustatyta, kad 100 g arbatžolių turi daugiau kofeino palyginus su 100 g kavos (Astorino ir kt., 2015).



1 pav. Kofeino struktūrinė formulė

Šiuo tyrimu buvo siekiama patikrinti skirtingų faktorių įtaką kofeino ekstrakcijai bei įvertinti, kuris ekstrakcijos būdas yra optimalus. **Tyrimo objektu** buvo pasirinkta vieno žinomiausių prekės ženklų juodoji Ceilono stambialapė arbata (gamintojas Šri Lanka „ROYAL ELIXIR TEA“).

Kofeino kiekis yra nustatomas skysčių arba dujų chromatografijos, kapiliarinės elektroforezės, spektrofotometriniais ir kitais tyrimų metodais (Lietuvos Respublikos žemės ūkio ministro įsakymas 2001-03-23, Nr. 25-840; Yisak ir kt., 2018; Khasanov ir kt. 2013; Pasias ir kt., 2017; Riswanto ir kt., 2015; Spiller, Gene, 2019). Vienas iš sparčiausių, efektyviausių ir dažniausiai taikomų analitės kiekio nustatymo metodų – efektyvioji skysčių chromatografija (ESCh) (Astorino ir kt., 2015; ISO 20481:2008; Spiller, Gene, 2019; ISO 10727:2002; Mickevičius, 1999).

Temos aktualumas

Taikant ESCh, mėginio paruošimas bene sudėtingiausias ir daug laiko užimantis etapas. Todėl svarbu parinkti kuo efektyvesnį, spartesnį bei pigesnį mėginio paruošimo būdą. Mėginių paruošimui dažnai taikomi įvairūs ekstrakcijos metodai (Spiller, Gene, 2019; Vičkačkaitė, 2009; Qing-Wen Zhang, 2018; Toledo, Romeo, 2007). Be to, ekstrakcijos efektyvumui įtakos turi fazių sąlyčio

paviršiaus plotas, ekstrahavimo trukmė, maišymas, temperatūra ir daugybė kitų faktorių (Spiller, Gene, 2019; Toledo, Romeo, 2007; Solvent Extraction Principles and Practice, 2004).

ESCh atskyrimui ir nustatymui iš augalinės žaliavos kofeinas gali būti ekstrahuojamas vandeniu ir organiniais tirpikliais (Spiller, Gene, 2019). Šiame darbe ekstrakto gamybai buvo pasirinktas nekenksmingas aplinkai ir pigiausias tirpiklis – I grynumo laipsnio vanduo (toliau analizės vanduo) (LST EN ISO 3696:1996).

Paviršiaus sąlyčio ploto įtaka ekstrakcijos efektyvumui buvo įvertinta veikiant smulkintą ir nesmulkintą juodąją arbatą. Temperatūros poveikis procesui buvo tiriamas mėginius veikiant skirtingos temperatūros ekstrahentu. Norint palengvinti ekstrahuojamų medžiagų išsiskyrimą, dalis mėginių buvo veikiami ultragarsu (ultragarsu skleidžiamos garso bangos didina skvarbą, sukelia įtrūkimus arba ardo biologines ląstelių sienes) (Lazar, 2016). Papildomai buvo keičiama ekstrakcijos trukmė.

Tyrimo tikslas – patikrinti skirtingų faktorių įtaką kofeino ekstrakcijai bei įvertinti, kuris ekstrakcijos būdas yra optimalus.

Tikslui pasiekti iškelti uždaviniai:

1. Parinkus skirtingus faktorius atlikti kofeino ekstrakciją iš juodosios Ceilono arbatos.
2. Kofeino kiekį skirtingomis sąlygomis paruoštuose ekstraktuose nustatyti efektyviosios skysčių chromatografijos metodu.
3. Įvertinti optimalų ekstrakcijos būdą.

Tyrimo metodas – efektyvioji skysčių chromatografija.

Tyrimas buvo atliktas 2019 m. Vilniaus kolegijos Agrotechnologijų fakulteto chemijos laboratorijoje.

Tyrimo metodai ir sąlygos

Kofeino standartinių tirpalų ruošimas. Tyrimui buvo paruoštas standartinis 0,08 mg/ml kofeino (Cayman Chemical) tirpalas. Kalibravimo kreivės sudarymui paruošti 0 µg/ml, 8 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml koncentracijų tirpalai. Sudaryta kalibravimo kreivė pateikta 2 pav.

Mėginių paruošimas. Juodoji Ceilono arbata (gamintojas Šri Lanka „ROYAL ELIXIR TEA“) buvo išdžiovinta džiovinimo spintoje (VENTI-Line VL 53) 103 °C temperatūroje iki pastovios masės (ISO 10727:2002). Drėgmės kiekis mėginiuose buvo apskaičiuotas pagal formulę:

$$w = \frac{(m_1 - m_2) \cdot 100}{m_1}, \quad (1)$$

čia w – drėgmės kiekis, %;

m_1 – medžiagos masė prieš džiovinimą, g;

m_2 – išdžiovintos medžiagos masė, g.

Tyrimui buvo naudojami nesmulkinti ir smulkinti mėginiai. Juodoji arbata buvo smulkinama cikloniniu malūnu (Lab Whirlwind Mill, sieto akučių skersmuo 0,2 mm).

Ekstrahavimas. Optimalių ekstrahavimo sąlygų parinkimui po 1 g (analitinės svarstyklės AB204-S/FACT) smulkintos ir nesmulkintos tiriamosios medžiagos buvo užpilta 100 ml skirtingos temperatūros analizės vandeniu (25 °C, 30 °C, 60 °C ir 80 °C) ir termostatuojama (termostatas Memmert WBU 45) 3 min, 5 min, 15 min ir 30 min.

Taip pat po 1 g smulkintos ir nesmulkintos arbatos užpylus 100 ml 25 °C, 30 °C, 60 °C ir 80 °C temperatūros analizės vandens buvo termostatuojama ir veikama 44 kHz dažnio ultragarsu (ultragarsinė vonelė Grant XUBA3) tais pačiais laiko intervalais.

Kofeino kiekio nustatymas. Kietosioms dalelėms atskirti ekstraktas buvo dekantuojamas, filtruojamas per popierinį (KA1, raudona juosta) ir per 0,22 µm porų dydžio nailono filtrus.

Kofeino kiekis mėginiuose buvo nustatytas atvirkštinių fazių ESCh metodu (chromatografas Shimadzu LC-2010AHT su UV detektoriumi). Chromatografavimo sąlygos: nepolinė YMC-Pack Pro C18 kolonėlė užpildyta silikageliu C₁₈ (dalelių dydis 5 µm, kolonėlės ilgis – 150 mm, vidinis skersmuo – 4 mm); kolonėlės temperatūra 40 °C; mėginio tūris 10 µl; srauto greitis 1 ml/min; UV detektorius (bangos ilgis 254 nm), mobili fazė vanduo ir acetonitrilas (gradientinis eliuavimas). Nustatytos metodo patvirtinimo charakteristikos: teisingumas T = 0,5 %, glaudumas SSN = 0,9 %, aptikimo riba AR = 5,73 mg/100g, nustatymo riba NR = 9,55 mg/100g, išplėstinė neapibrėžtis U = 0,02 · c mg/100g (kur aprėpties daugiklis k = 2 esant pasiklovimo lygmeniui P = 95 %). Metodo patvirtinimo charakteristikų nustatymui buvo tiriami atkuriamumo sąlygomis 20 µg/ml (rezultatų skaičius n = 6) ir 8 µg/ml (n = 6) koncentracijos kofeino kontroliniai tirpalai. Duomenys apdoroti programa *Labsolution*. Kofeino koncentracija 100 g mėginio apskaičiuota:

$$c = p \cdot \frac{V}{m} \cdot f \cdot 100, \quad (2)$$

čia p – koncentracija pagal kalibravimo kreivę, µg/ml;

V – ekstrakto tūris, ml;

m – išdžiovintų arbatžolių masė, g;

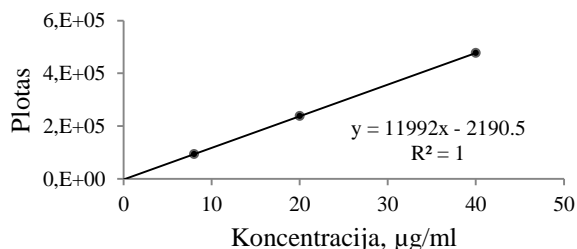
f – praskiedimo faktorius;

100 – perskaičiavimas į kofeino masę 100 g žaliavos.

Tyrimo rezultatai ir jų aptarimas

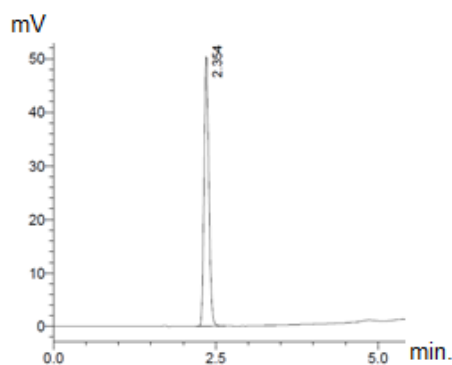
Optimalių ekstrahavimo sąlygų parinkimui buvo naudota išdžiovinta juodoji Ceilono arbata. Nustatytas mėginiuose esantis drėgmės kiekis – 0,2 %.

Kofeino ekstrakcija mėginiuose buvo atliekama keičiant sąlygas: arbatos dalelių dydį (smulkintos arbatos dalelių dydis iki 0,2 mm), temperatūrą bei ekstrahavimo trukmę.



2 pav. Kofeino kalibravimo kreivė

Kofeino kiekis ekstraktuose buvo nustatytas ESCh metodu. Kalibravimo kreivė pateikta 2 pav. Chromatogramoje (3 pav.) matoma kofeino smailė ties 2,35 min.



3 pav. Kofeino chromatograma

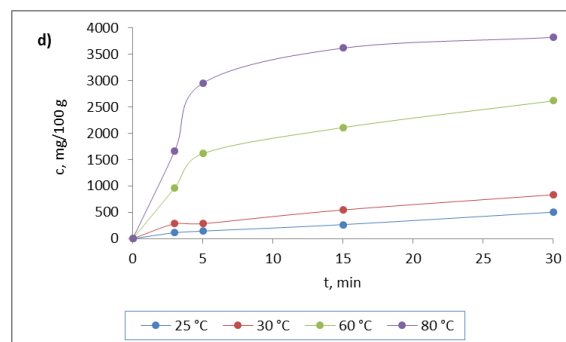
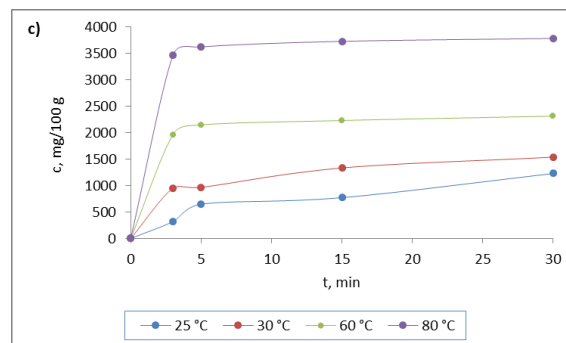
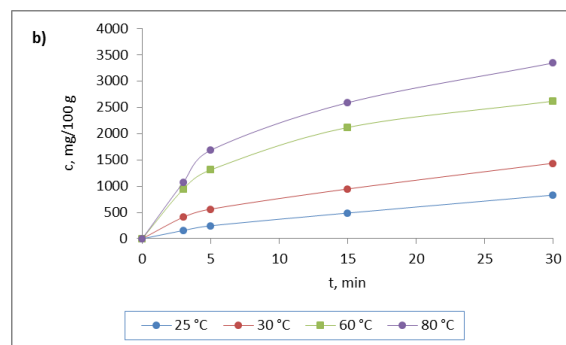
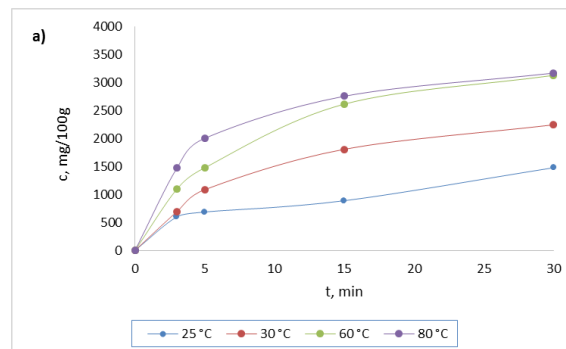
Skirtingų faktorių įtaka kofeino ekstrakcijai buvo vertinama nagrinėjant duomenis, pateiktus 4 pav.

Išnagrinėjus duomenis, pateiktus diagramose, matoma, kad kofeino ekstrakcija analizės vandenyje greičiausia pirmąsias 3 min., toliau – sulėtėja. Panašūs ekstrahavimo rezultatai pateikiami kituose literatūros šaltiniuose (ekstrakcija sulėtėja po 2–4 min.) (Chamira, 2015). Nustatytas didžiausias kofeino kiekis mėginiuose yra apie 3800 mg/100 g arba 3,8 %. Tai atitinka kitų autorių darbuose nustatytą kofeino kiekį arbatoje, kuris yra nuo 2 iki 5 % (Nacionalinis maisto ir veterinarijos rizikos vertinimo institutas, 2016). Didžiausias kofeino kiekis išekstrahuojamas šiomis sąlygomis: smulkinta ir nesmulkinta arbata termostatuojama 80 °C temperatūros vandenyje 30 min. (4c ir d pav.).

4a pav. pateikti rezultatai gauti smulkintą arbatą veikiant ultragarsu 25 °C, 30 °C, 60 °C ir 80 °C temperatūroje 3 min., 5 min., 15 min. ir 30 min. Čia

matoma, kad didžiausia dalis (3160 mg/100 g) kofeino išekstrahuojama 80 °C temperatūros analizės vandenyje po 30 min.

4b pav. pavaizduoti duomenys gauti tomis pačiomis sąlygomis ekstrahuojant kofeiną iš nesmulkintos arbatos. ESCh metodu nustatyta, kad didžiausias kofeino kiekis išekstrahuojamas 80 °C



4 pav. Kofeino kiekio mg/100g priklausomybė nuo ekstrahavimo parametru: a) smulkintų arbatžolių veikimas ultragarsu, b) nesmulkintų arbatžolių veikimas ultragarsu, c) smulkintų arbatžolių termostatavimas, d) nesmulkintų arbatžolių termostatavimas.

temperatūros analizės vandeniui po 30 min. Nustatyta kofeino koncentracija apie 3300 mg/100 g.

4a ir b pav. pateiktose diagramose matoma, kad parinktos sąlygos nepakankamos visiškai kofeino ekstrakcijai – manoma, kad ji turėtų būti vykdoma ilgesnį laiką.

4c pav. pateikti smulkintos arbatos veikimo skirtinga temperatūra, skirtingą laiko tarpą, duomenys. Juos išnagrinėjus matoma, kad didžiausias kofeino kiekis išekstrahuojamas po 5 min. 80 °C temperatūros analizės vandenyje.

Šiuos duomenis palyginus su 4d pav. pateiktais duomenimis, kur kofeino ekstrakcija vykdyta tomis pačiomis sąlygomis iš nesmulkintos arbatos, matoma, kad visiška ekstrakcija įvyksta po 20 minučių 80 °C temperatūroje. Palyginus 4a, b ir 4c, d pav. diagramas matoma, kad visiška kofeino ekstrakcija įvyksta tik temostatuojant smulkintos juodosios arbatos mėginius. Apžvelgus tyrimo rezultatus galima teigti, kad optimalus, efektyvus ir spartus mėginio paruošimo būdas yra kofeino vandeninė ekstrakcija šiomis sąlygomis: arbatos dalelių dydis 0,2 mm, termostatavimas 80 °C temperatūroje 5 min.

Išvados

1. Analizuojant skirtingų faktorių įtaką kofeino vandeninei ekstrakcijai iš juodosios arbatos, buvo paruošti mėginiai skirtingomis sąlygomis – keičiant arbatos dalelių dydį (stambialapė ir iki 0,2 mm dalelių dydžio arbata), keičiant ekstrahavimo temperatūrą (25 °C, 30 °C, 60 °C ir 80 °C), ekstrakcijos trukmę (3 min, 5 min, 15 min ir 30 min.). Mėginiai buvo termostatuojami ir veikiami ultragarsu.

Literatūra

1. Astorino, T. A., *et. al.* (2015). Caffeine – Chemistry, Analysis, Function and Effects. Royal Society of Chemistry, 435.
2. Nacionalinis maisto ir veterinarijos rizikos vertinimo institutas. Mityba, Rizikos vertinimas. Ar tik kavoje yra kofeino ir kaip jis veikia mūsų organizmą. 2016-07-28.
3. McLellan, Tom M., Caldwell, John A., Lieberman, Harris R., (2016). A review of caffeine's effects on cognitive, physical and occupational performance. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 71, 294-312.
4. Acus, E., Stukas, R. (2017). Vilniaus universiteto studentų kofeino turinčių produktų vartojimo paplitimas. *Visuomenės sveikata*, 3 (78).
5. Lietuvos Respublikos žemės ūkio ministro įsakymas "Dėl techninio reglamento, nustatančio kavos ekstraktų ir cikorijos ekstraktų sudėtį ir analizės metodus, patvirtinimo" Valstybės žinios, 2001-03-23, Nr. 25-840.
6. Yisak, H., *et. al.* (2018). Selective determination of caffeine and trigonelline in aqueous extract of green

2. Kiekybinė kofeino kiekio ekstrakto analizė atlikta efektyviosios skysčių chromatografijos metodu. Išanalizavus gautus duomenis nustatyta, kad kofeino ekstrakcija analizės vandenyje greičiausia pirmąsias 3 min., toliau – sulėtėja. Visiška kofeino ekstrakcija įvyksta tik termostatuojant 5 min. smulkintos ir 20 min. nesmulkintos juodosios arbatos mėginius 80 °C temperatūroje. Didžiausias nustatytas kofeino kiekis mėginiuose apie 3800 mg/100 g arba 3,8 %.
3. Apžvelgus efektyviosios skysčių chromatografijos metodu gautus tyrimo rezultatus galima teigti, kad optimalus, efektyvus ir spartus mėginio paruošimo būdas yra kofeino vandeninė ekstrakcija šiomis sąlygomis: arbatos dalelių dydis 0,2 mm, termostatavimas 80 °C temperatūroje 5 min.

7. Khasanov, V. V., Slizhov, Y. G., Khasanov, V. V. (2013). Energy drink analysis by capillary electrophoresis. *J. Anal. Chem.*, 68, 357-359.
8. Pasiás, I., Kiriakou, I., Proestos, C. (2017). Development of a rapid method for the determination of caffeine in coffee grains by GC-FID-a fully validated approach *Antioxidants*, 6, 67.
9. Riswanto, F. D. O., Endang Lukitaningsih, R. R., Martono, S. (2015). Analytical method validation and determination of pyridoxine, nicotinamide, and caffeine in energy drinks using thin layer chromatography-densitometry. *Indones. J. Chem.*, 15, 9-15.
10. Spiller, Gene A. (2019). Caffeine. CRC Press, 384.
11. ISO 20481:2008. Coffee and coffee products -- Determination of the caffeine content using high performance liquid chromatography (HPLC) - Reference method.

12. ISO 10727:2002. Tea and instant tea in solid form - Determination of caffeine content - Method using high-performance liquid chromatography.
13. Mickevičius, D. (1999). Cheminės analizės metodai. 2 dalis, Žiburys, Vilnius, 352.
14. Vičkačkaitė, V. (2009). Ekstrakciniai mėginio paruošimo dujų chromatografinėi analizei metodai. Vilniaus universitetas, 45.
15. Qing-Wen Zhang, Li-Gen Lin and Wen-Cai Ye (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. Chin Med, 13:20, 26.
16. Toledo, Romeo T. (2007). Fundamentals of Food Process Engineering. Food Science Text Series. 3 Edition. Springer Science & Business Media, 570.
17. Solvent Extraction Principles and Practice, Revised and Expanded. 2 Edition. CRC Press, 2004, 480.
18. LST EN ISO 3696:1996. Analizės vanduo. Apibūdinimas ir bandymo metodai (ISO 3696:1987).
19. Lazar L, *et. al.* (2016). Kinetic modeling of the ultrasound-assisted extraction of polyphenols from Picea abies bark. Ultrason Sonochem. 32, 191–7.
20. Chamira Dilanka Fernando, Preethi Soysa (2015). Extraction Kinetics of phytochemicals and antioxidant activity during black tea (*Camellia sinensis* L.) brewing. Nutr J. 14, 74.

THE CHOICE OF OPTIMAL EXTRACTION PARAMETERS FOR ESTIMATING THE CAFFEINE CONTENT IN TEA USING HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD

Summary

Caffeine (C₈H₁₀N₄O₂, 1,3,7-Trimethylpurine-2,6-dione) is an alkaloid purine. It is a natural substance found in more than 60 plant species. One of the most commonly known sources of caffeine is tea.

The most widely used methods for estimating caffeine include various analytical techniques such as High-Pressure Liquid Chromatography (HPLC), capillary electrophoresis, spectrophotometric, and other methods. Sample preparation for the analysis is a complicated stage, and it takes a lot of time. Therefore, it is important to select more efficient, faster, simpler, less expensive and environment-friendly sample preparation techniques. This study aims to determine optimal conditions of caffeine extraction from Ceylon black tea leaves (Sri Lanka „ROYAL ELIXIR TEA“). The effects of the size of tea particles (0.2 mm and full leaf tea), the temperature (25°C, 30°C, 60°C and 80°C), sonication (44 kHz), and time (3 min., 5 min., 15 min. and 30 min.) on the solubility of caffeine from black tea in water have been investigated. For this purpose, an extraction step has been followed by estimating the caffeine content in the black tea samples. This has been performed by HPLC (Liquid Chromatograph Shimadzu LC-2010AHT) method. The separation and estimation of the caffeine content was carried out using a reverse-phase YMC-Pack Pro C18 column (length 150 mm, internal diameter 4.0 mm, particle size 5 μm), column temperature 40°C, solvent water and acetonitrile (gradient elution), injection volume 10 μl, flow rate 1 ml/min, UV detection at 254 nm, analysis stop time 11 min. The caffeine retention time was 2.35 min. The results of the analysis reveal that the best combinations of particle size, temperature and time extraction with water was 5 min, 80 °C for ground tea leaves. The highest amount of caffeine in the samples was about 3800 mg/100 g.

Keywords: caffeine, extraction, High Pressure Liquid Chromatography, tea.

Informacija apie autorius

dr. Inga Stankevičienė. Vilniaus kolegijos, Agrotechnologijų fakulteto Chemijos katedros docentė. Mokslinių tyrimų laukas: chemija.

El. pašto adresas: inga.stankeviciene@atf.viko.lt

Jolanta Jurkevičiūtė. Vilniaus kolegijos, Agrotechnologijų fakulteto Chemijos katedros lektorė. Mokslinių tyrimų laukas: chemija.

El. pašto adresas: j.jurkeviciute@atf.viko.lt