

BEATA SPERKOWSKA, GRZEGORZ BAZYŁAK

## WPLYW WARUNKÓW EKSTRAKCJI NA ZAWARTOŚĆ ROZPUSZCZALNYCH SZCZAWIANÓW W WODNYCH NAPARACH HERBAT ZIELONYCH I HERBATEK ZIOŁOWYCH

### Streszczenie

Celem pracy było porównanie zawartości rozpuszczalnych szczawianów (RSZ) w wodnych naparach herbat zielonych i herbatek ziołowych uzyskiwanych przy zastosowaniu czterech sposobów ekstrakcji, tj. tradycyjnej metody ekstrakcji przy użyciu wrzącej wody o temp. 100 °C, ekstrakcji wspomagananej promieniowaniem mikrofalowym w temp. 80 °C (EWPM), ekstrakcji wspomagananej ultradźwiękami w temp. 40 °C (EWU-40) i w temp. 60 °C.

Oznaczona metodą manganianometryczną średnia zawartość RSZ w badanych naparach była największa po zastosowaniu metody EWPM i wynosiła od 7,73 do 14,89 mg/g s.m. w herbatach zielonych oraz od 3,53 do 18,11 mg/g s.m. w herbatach ziołowych. Natomiast najmniejsze wartości otrzymano po zastosowaniu metody EWU-40, tzn. od 5,06 do 10,88 mg/g s.m. w herbatach zielonych oraz od 1,5 do 11,03 mg/g s.m. w herbatach ziołowych. W przypadku herbatek ziołowych, pobranych do badań wyłącznie w saszetkach do parzenia ekspresowego, stwierdzono istotną zależność pomiędzy ilością oznaczonych RSZ a rodzajem części anatomicznych wyjściowego surowca roślinnego. Podobnie, jak w przypadku herbat zielonych, największą średnią zawartością RSZ charakteryzowały się napary uzyskane metodą EWPM z herbatek ziołowych z całych liści, np. mięty – 18,11 mg/g s.m., szalwi – 12,23 mg/g s.m. oraz pokrzywy – 11,76 mg/g s.m. Z owoców (nasion) kopru włoskiego uzyskano RSZ na poziomie 3,53 mg/g s.m. produktu, a z kwiatostanu lipy 4,01 mg/g s.m. Wyjątek w tej grupie naparów stanowił kwiatostan rumianku, w którym oznaczono 16,05 mg/g s.m. produktu.

Uzyskane wyniki mogą zostać wykorzystane do standaryzacji metod analitycznych stosowanych podczas oznaczania RSZ w naparach herbat zielonych i herbatek ziołowych w celu identyfikacji kraju i regionu ich pochodzenia, rozpoznawania okresu zbiorów i sposobu produkcji, ujawniania domieszek i zafałszowań oraz weryfikacji przydatności do spożycia i potwierdzania jakości zdrowotnej takich produktów.

**Słowa kluczowe:** kwas szczawiowy, szczawiany, herbata zielona, herbata ziołowa, ekstrakcja, promieniowanie mikrofalowe, ultradźwięki

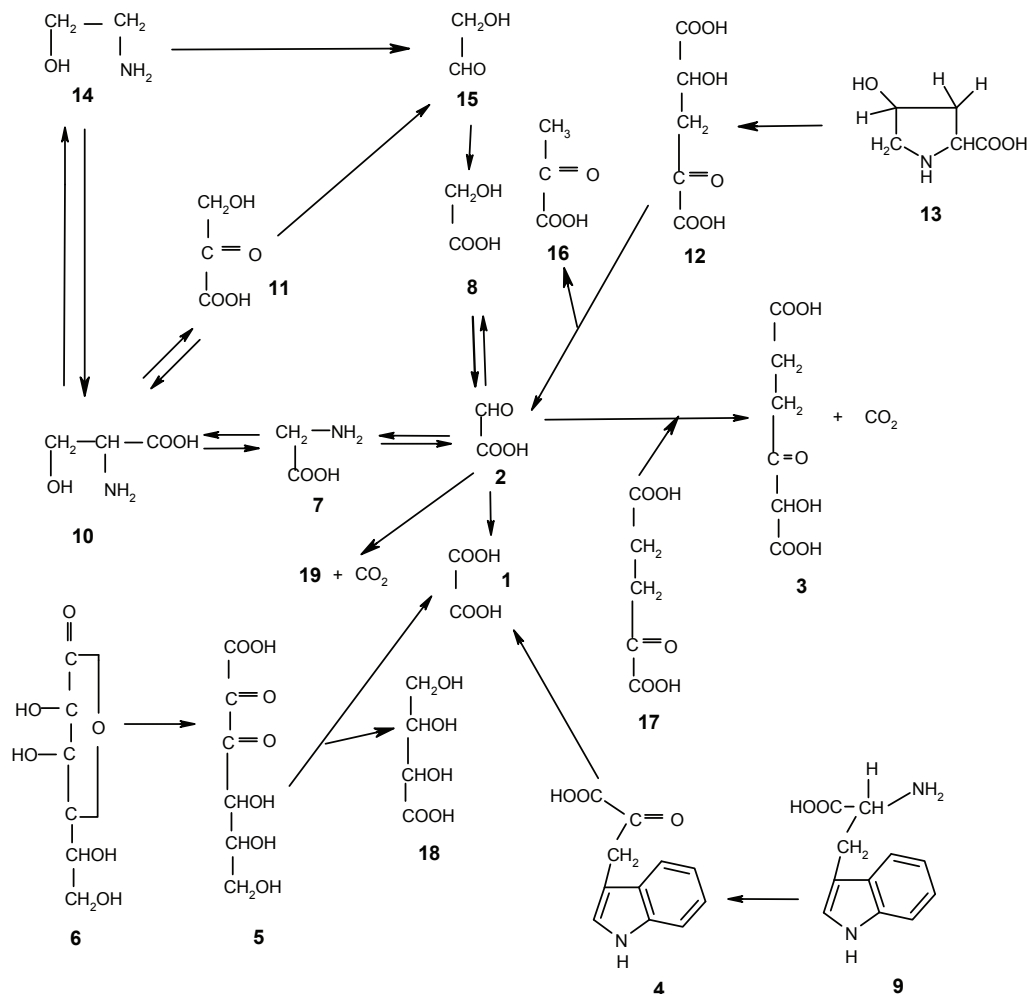
## Wprowadzenie

Kwas szczawiowy zaliczany jest do kwasów dikarboksylowych o zwiększonej mocy – jego stałe dysocjacji kwasowej ( $pK_a$ ) w temp. pokojowej wynoszą 1,3 oraz 4,3 [14]. Występuje powszechnie zarówno w świecie roślinnym, jak i zwierzęcym [1, 14]. Powstaje w roślinach na drodze zróżnicowanych procesów biosyntezy (rys. 1) z takich wyjściowych substratów, jak: kwas askorbinowy, tryptofan, hydroksyprolina, seryna i etanoloamina [17].

Kwas szczawiowy tworzy rozpuszczalne w wodzie sole sodowe i potasowe oraz jedno- i dwupodstawione estry. W wakuolach wyspecjalizowanych komórek roślinnych zwanych idioblastami część jonów szczawianowych jest związana w postaci nierozpuszczalnych soli wapnia i magnezu. Sole te odgrywają istotną rolę w wielu ważnych funkcjach życiowych komórki roślinnej takich, jak: regulacja poziomu wapnia, detoksykacja metali ciężkich, ochrona przed roślinożercami, a także determinują aktywność allelopatyczną poszczególnych roślin [1, 7, 14]. Ilość szczawianów odkładanych w tkankach roślinnych uwarunkowana jest kilkoma czynnikami, przede wszystkim intensywnością biosyntezy szczawianów, która jest najpełniejsza w fazie kwitnienia rośliny [7]. Ponadto ilość zgromadzonych szczawianów uzależniona jest także od części anatomicznej rośliny. Najwięcej szczawianów gromadzonych jest w dolnych liściach roślin, a następnie w liściach górnych, nasionach, łodygach, a najmniejsze ilości występują w korzeniach [7, 14].

Zwiększające się w ostatnich latach spożycie herbat zielonych i herbatek ziołowych w Polsce, które zdeterminowane jest ich prozdrowotnymi właściwościami (np. obecnością polifenoli) oraz powszechną dostępnością, zwiększa także ryzyko wystąpienia szeregu dolegliwości związanych z zaburzeniami bilansu wapnia w ustroju człowieka, szczególnie tworzenia kamieni nerkowych [7, 8, 9, 14, 22]. Badania prowadzone w licznych placówkach naukowych dowodzą, że ilość szczawianów jaką przyjmuje człowiek z codzienną dietą znacznie przewyższa dozwolone normy, tj. 40 – 50 mg/dobę [15, 17]. Na podkreślenie zasługuje fakt, że nie tylko egzogenne źródła szczawianów w diecie stanowią czynnik ryzyka wystąpienia takich zespołów patologicznych, jak: nadmierne wydalanie kwasu szczawowego z moczem (hiperoksaluria), kamica nerkowa, niewydolność nerek, kardiomiopatia i zaburzenia przewodności serca [15].

Określenie ilości szczawianów w żywności i codziennej diecie jest niezwykle istotne, zwłaszcza w przypadku osób narażonych na kamicę nerkową. Gasińska i Gajewska [6] wykazały w diecie osób chorych znacznie wyższą podaż litogenego kwasu szczawowego z kawy i herbaty (około 80 %) niż z antylitogennych składników diety takich, jak wapń, witamina B<sub>6</sub> i całkowita objętość spożytych płynów [6]. W licznych badaniach podaje się graniczną objętość spożywanych naparów herbat zielonych, a także herbatek ziołowych, na poziomie do 2,5 litra na dzień [3, 15, 16, 17]. Stosowane bardzo



Rys. 1. Biosynteza kwasu szczawiowego w roślinach. Oznaczenia związków: (1) kwas szczawiowy, (2) kwas glioksalowy, (3) kwas 2-hydrokso-3-keto-adipinowy, (4) kwas indolopirogronowy, (5) kwas L-4,5,6-trihydrokso-2,3-diketokapronowy (6) kwas L-askorbinowy, (7) glicyna, (8) kwas glikolowy, (9) tryptofan, (10) seryna, (11) kwas hydroksopirogronowy, (12) 4-hydrokso-2-ketoglutaryny, (13) L-hydroksoprolina, (14) etanolamina, (15) aldehyd glikolowy, (16) kwas pirogronowy, (17) kwas 2-ketoglutaryny, (18) kwas L-2,3,4-trihydroksoymasłowy, (19) formyl-S-koenzym A.

Fig. 1. Biosynthesis of oxalic acid in plants. Compounds: (1) oxalate; (2) glyoxylate; (3) 2-hydroxy-3-oxo-adipate; (4) indolepyruvate; (5) 2,3-dioxo-L-gulonate; (6) L-ascorbate; (7) glycine; (8) glycolate; (9) tryptophan; (10) serine; (11) hydroxypyruvate; (12) 4-hydroxy-2-oxoglutarate; (13) L-hydroxyproline; (14) ethanolamine; (15) glycolaldehyde; (16) pyruvate; (17) 2-oxo-glutarate; (18) L-threonate; (19) formyl-S-CoA.

Opracowanie własne na podstawie [1, 17]. / The authors' own adaptation based on [1, 17].

różnorodne metody analityczne, takie jak miareczkowanie manganianometryczne [10], chromatografii gazowej [18], wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z detekcją UV [3, 8], HPLC z detekcją enzymatyczną [9], elektroforezy kapilarnej [5], enzymatyczna Trinity Biotech (Irlandia) [22], chemiluminescencyjna [19], a także spektrofotometrii w bliskiej podczerwieni NIR [12], nie gwarantują uzyskania rzetelnej informacji na temat rzeczywistej zawartości rozpuszczalnych szczawianów (RSZ) w takich naparach. Jak dowodzą nieliczne opublikowane badania, przede wszystkim długość czasu parzenia oraz temperatura wody użytej do ekstrakcji mają ścisły związek z ilością rozpuszczalnych szczawianów w naparach herbaty [3, 9, 16]. Obniżenie temperatury zaparzania oraz stosowanie odpowiednich rozcieńczeń może znacznie zmniejszyć ilość szczawianów przechodzących do naparu. Należy również zwrócić uwagę na fakt, że herbaty czarne i zielone należą do często fałszowanych produktów spożywczych [4, 13], a jednym z powszechnie występujących zafałszowań jest deklarowanie przez dystrybutorów obecności w oferowanym produkcie najwyższej jakości herbaty otrzymanej z młodych listków, podczas gdy w rzeczywistości herbaty takie zawierają często starsze liście, a nawet łodygi, o dużej zawartości kwasu szczawowego [13, 17]. Kwas szczawowy może więc pełnić rolę pośredniego biomarkera zafałszowań herbaty i napojów ziołowych, bowiem jak już wspomniano, w starszych liściach, jak również w łodygach, występuje go więcej niż w deklarowanych na opakowaniu młodych listkach [4, 17].

Celem przedstawionej pracy było określenie wpływu alternatywnych metod zaparzania herbat zielonych i herbatek ziołowych, pozwalających na uzyskanie naparów o najwyższych walorach smakowych i odżywczo-zdrowotnych, na wyniki oznaczania rozpuszczalnych szczawianów metodą manganianometryczną w takich napojach. Przeprowadzono analizy naparów uzyskanych w wyniku zastosowania kilku metod, t.j. tradycyjnej ekstrakcji wodnej, ekstrakcji wspomagananej promieniowaniem mikrofalowym i ekstrakcji wspomagananej ultradźwiękami w różnych wartościach temperatury. Podjęte badania miały także na celu sprawdzenie na ile opisywane w literaturze alternatywne metody ekstrakcji wykorzystywane przy oznaczaniu zawartości innych bioaktywnych związków w herbatach zielonych i czarnych, m.in. katechin [2, 11, 13, 20, 23], mogą mieć wpływ na wyniki oznaczania rozpuszczalnych szczawianów.

### **Material i metody badań**

Badaniami objęto napary uzyskane z 3 marek handlowych herbaty zielonej liściastej, 3 marek handlowych herbaty zielonej ekspresowej w saszetkach oraz 7 marek herbatek ziołowych ekspresowych w saszetkach, określanych przez producentów jako „zioła w torebkach do zaparzania” (tab. 1). Trzy produkty, w postaci herbatek ziołowych z lipy, szalwi i mięty, zakupiono w aptekach ogólnodostępnych, a pozostałe produkty w sklepach spożywczych i hipermarketach na terenie Bydgoszczy w okresie

marzec – sierpień 2008 r. Z produktu każdej marki przeanalizowano 3 próbki w trzech powtórzeniach.

Do oznaczenia rozpuszczalnych szczawianów zastosowano metodę manganianometryczną z uwagi na jej prostotę, dostępność i powtarzalność. W przypadku każdego rodzaju herbaty wykonano ekstrakcję czterema sposobami, najpierw referencyjną metodą tradycyjną przy użyciu wrzącej wody o temp. 100 °C (EWW, sposób 1). Następnie zastosowano trzy alternatywne metody ekstrakcji: wspomaganej promieniowaniem mikrofalowym w temp. 80 °C (EWPM, sposób 2), wspomaganej ultradźwiękami w temp. 40 °C (EWU-40, sposób 3) i w temp. 60 °C (EWU-60, sposób 4). W przypadku ekstrakcji gorącą wodą (EWW) naważkę 3,0 g herbaty zalewano 50 cm<sup>3</sup> wody dejonizowanej o temp. 100 °C i zaparzano napój przez 5 min pod przykryciem. Podczas ekstrakcji z wykorzystaniem ultradźwięków (EWU) zastosowano termostatowaną łaźnię ultradźwiękową o częstotliwości generatora 35 MHz typu Sonorex RK 100H (Bendelin Electronic, Niemcy). Napary do badań przygotowywano zalewając 3,0 g badanej herbaty 50 cm<sup>3</sup> wody dejonizowanej o temp. pokojowej, a następnie prowadzono proces ekstrakcji EWU przez 15 min w temp., odpowiednio, 40 i 60 °C. W przypadku ekstrakcji EWPM użyto kuchenki mikrofalowej typu M1914 (Samsung, Korea Płd.), o częstotliwości promieniowania 2450 MHz. Naważki wielkości 3,0 g badanej herbaty zalewano wodą destylowaną (50 cm<sup>3</sup>) o temp. pokojowej i poddawano działaniu promieniowania mikrofalowego o mocy 450 W przez 2 min do osiągnięcia temp. 80 °C. Uzyskane różnymi metodami napary filtrowano przez sączi wykonane z bibuły jakościowej średniej (61-69 g/m<sup>2</sup>, POCH, Polska) i pobierano 2,5 cm<sup>3</sup> uzyskanego przesącza do próbki wirówkowej o pojemności 15 cm<sup>3</sup>. Następnie dodawano 1,0 cm<sup>3</sup> 25 % chlorku wapnia oraz 2,5 cm<sup>3</sup> acetonu. Przygotowane w ten sposób próbki ochładzono przez 30 min do temp. -6 °C. Powstały osad szczawianu wapnia odwirowywano przez 5 min przy 3000 obr./min przy zastosowaniu wirówki laboratoryjnej typu NPW-53 (NPW, Polska). Płyn z nad osadu dekantowano, dodawano 5,0 cm<sup>3</sup> 10 % kwasu siarkowego i przenoszono ilościowo uzyskany roztwór do kolbek stożkowych na 100 cm<sup>3</sup>, a następnie rozpuszczano na gorąco w łaźni wodnej w temp. 90 °C. Miareczkowanie na gorąco wykonywano przy użyciu 0,002 M roztworu nadmanganianu potasowego do uzyskania barwy różowej utrzymującej się około 1 min. Oznaczone i przeliczone na 1 g suchej masy (s.m.) badanego produktu ilości rozpuszczalnych szczawianów w zależności od zastosowanej metody i warunków ekstrakcji przedstawiono w tab. 2 i 3.

Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono z użyciem nieparametrycznego testu Kruskala-Wallisa ( $p < 0,05$ ), z zastosowaniem programu Statistica 6.1 (Stat Soft, Tulsa, OK, USA).

Tabela 1

Charakterystyka badanych herbat zielonych i herbatek ziołowych.  
Profiles of green and herbal teas analyzed under this research.

Lp. Pos.	Badany produkt # Product analyzed#	Kraj pochodzenia Country of origin	Dystrybutor Distributor	Postać Form
1	Herbata zielona „Gunpowder”	Indonezja, Chiny	Bastek, Mrągowo	duże, zwinięte liście
2	Herbata „Zielona z cytryną”	Indonezja	Tentor, Koneck	drobne liście
3	Tao-Tao-Herbata Zielona „Jaśminowa”	Wietnam	Tan-Viet, Łęgowo	drobne liście, jaśmin
4	Herbata zielona „Sir Roger”	Chiny	Roger, Łódź	saszetki 1,7 g drobne cz. roślin
5	Herbata zielona „Bio-Active”	Chiny	Bio-Active, Warszawa	saszetki 2,0 g b. drobne cz. roślin
6	Herbata zielona „Vitax”	Chiny	Multeafil, Dobrzyca	saszetki 2,0 g b. drobne cz. roślin
7	„Lipa - Herbata Ziołowa- Zielnik Polski” *	Polska	Herbapol, Lublin	saszetki 1,5 g kwiatostan
8	„Owoc kopru włoskiego” *	Polska	Kawon-Hurt, Gostyń	saszetki 2,0 g owoc
9	„Liść pokrzywy- zioła do zaparzenia w saszetkach” *	Polska	Flos, Mokrsko	saszetki 1,5 g liście
10	„Dziurawiec-Herbatka Ziołowa”	Polska	Malwa, Lubiszyn	saszetki 2,0 g całe ziele
11	„Szałwia Fix – Zielnik Apteczny” *	Polska	Herbapol Lublin	saszetki 1,6 g liście
12	„Mięta - Herbata Ziołowa - Zielnik Polski” *	Polska	Herbapol Lublin	saszetki 2,0 g liście
13	„Rumianek - Herbatka Ziołowa”	Polska	Posti, Warszawa	saszetki 1,7 g koszyczki

Objaśnienia: / Explanatory notes:

# Oryginalne nazwy handlowe umieszczone na opakowaniach / Original commercial names placed on the package;

\*Produkty zakupione w aptekach ogólnodostępnych na terenie Bydgoszczy / Products purchased in public (widely available) pharmacies in Bydgoszcz

## Wyniki i dyskusja

Wyniki oznaczeń zawartości rozpuszczalnych szczawianów (RSZ) w herbatach zielonych i herbatkach ziołowych oraz ich statystyczną ocenę przedstawiono w tab. 2.

i 3. Zwraca uwagę herbatka ziołowa z szałwi – zastosowanie tradycyjnej metody parzenia gorącą wodą EWW prowadziło do uzyskania naparu o największej zawartości szczawianów (13,13 mg/g s.m) w porównaniu z naparami uzyskanymi pozostałymi trzema metodami (tab. 3).

Stwierdzono, że w przypadku większości badanych herbat zielonych oraz czterech herbatek ziołowych (kopru włoskiego, pokrzywy, mięty oraz rumianku) największą wydajnością uwalniania do naparu rozpuszczalnych szczawianów charakteryzowała się ekstrakcja z wykorzystaniem promieniowania mikrofalowego EWPM. W porównaniu z tradycyjną metodą ekstrakcji gorącą wodą EWW, po zastosowaniu ekstrakcji EWPM najbardziej zwiększył się poziom rozpuszczalnych szczawianów w naparze z herbaty zielonej „Bio-Active”, w której nastąpił prawie trzykrotny wzrost zawartości szczawianów z 4,2 do 12,26 mg/g s.m. tej herbaty (tab. 2). Wysoki wzrost ilości szczawianów odnotowano także po zastosowaniu ekstrakcji EWPM w przypadku herbatki miętowej, z 9,58 do 18,11 mg/g s.m., co stanowi prawie dwukrotny wzrost ilości szczawianów w naparze w porównaniu z ekstrakcją tradycyjną EWW (tab. 3). Podobną zmianę stwierdzono w przypadku herbatki rumiankowej, w której w wyniku zastosowania ekstrakcji EWPM nastąpił wzrost zawartości rozpuszczalnych szczawianów z 9,71 do 16,05 mg/g s.m. (tab. 3). Jedynie w przypadku naparów herbatki ziołowej z lipy, dziurawca i szałwi odnotowano statystycznie istotne zmniejszenie zawartości rozpuszczalnych szczawianów w wyniku zastosowania promieniowania mikrofalowego EWPM w porównaniu z tradycyjnym parzeniem wrzącą wodą EWW (tab. 3). W porównaniu z metodą EWW oraz EWPM, jedynie w przypadku herbaty zielonej „Vitax”, zielonej „Jaśminowej” oraz herbatki ziołowej z dziurawca, najwyższą wydajność ekstrakcji szczawianów do naparu uzyskano przy zastosowaniu ekstrakcji EWU-60, czyli wspomaganej ultradźwiękami w temp. 60 °C (tab. 2 i 3).

W celu optymalizacji wydajności ekstrakcji rozpuszczalnych szczawianów metodą EWU dokonano kilku eksperymentów, z herbatą zieloną liściastą „Gunpowder”, w których zmieniano temperaturę ekstrakcji i czas chłodzenia (w temp. -6 °C) wytrącanego z uzyskanych naparów drobnokrystalicznego osadu szczawianu wapnia. Ze wzrostem temperatury ekstrakcji wspomaganej ultradźwiękami EWU od 40 do 80 °C następował proporcjonalny wzrost zawartości szczawianów w naparze. Podczas ekstrakcji EWU w temp. 60 °C uzyskano zawartość rozpuszczalnych szczawianów w naparze na poziomie porównywalnym z wynikami RSZ w herbacie podczas ekstrakcji metodą tradycyjną z użyciem wrzątku EWW (rys. 2).

Tabela 2

Zawartość rozpuszczalnych szczawianów w badanych herbatach zielonych [mg/g s.m.].  
Content of soluble oxalates in green teas analyzed [mg/g d.m.].

Herbata Tea	„Gunpowder” „Gunpowder” <sup>a</sup>	„Z cytryną” „With lemon” <sup>a</sup>	„Jaśminowa” „Jasmine” <sup>a</sup>	„Sir Roger” „Sir Roger” <sup>b</sup>	„Bio- Active” „Bio- Active” <sup>b</sup>	„Vitax” „Vitax” <sup>b</sup>
EWW	12,24 ± 0,24 (12,0 - 12,48)	8,39 ± 0,09 (8,28 - 8,52)	7,23 ± 0,05 (7,2 - 7,31)	7,59 ± 0,22 (6,15 - 8,25)	4,20 ± 0,62 (3,45 - 4,95)	6,30 ± 0,12 (6,15 - 6,45)
EWPM	14,89 ± 0,63 (13,95 - 15,60)	11,7 ± 1,10 (10,5 - 13,5)	14,36 ± 1,14 (13,2 - 16,2)	8,48 ± 0,57 (7,95 - 9,30)	12,26 ± 1,76 (10,5 - 14,1)	7,73 ± 1,0 (6,60 - 9,0)
EWU-40	8,85 ± 1,59 (7,05 - 10,65)	7,95 ± 0,11 (7,80 - 8,10)	10,88 ± 0,23 (10,50 - 11,10)	5,06 ± 0,51 (4,35 - 5,55)	6,52 ± 0,35 (6,10 - 7,05)	6,34 ± 0,06 (6,30 - 6,45)
EWU-60	13,76 ± 0,27 (13,50 - 14,10)	10,50 ± 0,30 (10,20 - 10,80)	14,63 ± 0,58 (13,80 - 15,30)	6,34 ± 0,06 (6,30 - 6,45)	9,28 ± 0,28 (9,00 - 9,65)	10,91 ± 0,47 (10,50 - 11,70)

Objaśnienia: / Explanatory notes:

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± SD oraz zakres, n = 3; / The Table presents mean values ± SD, and the range, n = 3;

EWW – ekstrakcja wrzącą wodą, 100 °C, 5 min / extraction with boiling water at 100 °C, t = 5 min; EWPM – ekstrakcja wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym, 80 °C, 450 W, 2 min / microwave radiation supported extraction at 80 °C, 450 W, t = 2 min; EWU-40 – ekstrakcja wspomaganą ultradźwiękami, 40 °C, 15 min / ultrasound supported extraction at 40 °C, t = 15 min; EWU-60 – ekstrakcja wspomaganą ultradźwiękami, 60 °C, 15 min / ultrasound supported extraction at 60 °C, t = 15 min; a – herbata liściasta / leaf green tea; b – herbata mielona w saszetkach / crushed green tea in sachets.

Wydłużenie czasu chłodzenia (w temp. -6 °C) wytrąconego z naparu osadu szczawianu wapnia od 30 do 60 min powodowało spadek wyników oznaczeń RSZ w badanym naparze zielonej herbaty „Gunpowder”. Dlatego w celu zachowania porównywalności uzyskanych wyników oznaczania RSZ z danymi literaturowymi oraz w celu ujednolicenia czasu analizy manganianometrycznej pozostałych badanych próbek herbaty i herbatek przyjęto okres 30 min, jako optymalny czas chłodzenia (w temp. -6 °C), który zapewnia pełne wytrącenie osadu szczawianu wapnia z naparu.



Tabela 3

Zawartość rozpuszczalnych szczawianów w badanych herbatkach ziołowych [mg/g s.m.].  
Content of soluble oxalates in herbal teas analyzed [mg/g d.m.].

Herbatka Tea Ekstrakcja Extraction	Lipa Lime <sup>a</sup>	Koper Fennel <sup>b</sup>	Pokrzywa Nettle <sup>c</sup>	Dziurawiec Hypericum <sup>d</sup>	Szałwia Sage <sup>c</sup>	Mięta Peppermint <sup>c</sup>	Rumianek Camomile <sup>a</sup>
EWW	4,88 ± 0,08 (4,80-4,95)	2,48 ± 0,08 (2,40-2,55)	10,13 ± 0,44 (9,45-10,65)	7,64 ± 0,28 (7,35-8,1)	13,13 ± 0,48 (12,45-13,65)	9,58 ± 0,11 (9,45-9,75)	9,71 ± 0,29 (9,45-10,2)
EWPM	4,01 ± 0,53 (3,45-4,80)	3,53 ± 0,23 (3,15-3,75)	11,76 ± 0,81 (10,45-12,65)	6,56 ± 0,19 (6,30-6,75)	12,23 ± 1,15 (10,80-13,5)	18,11 ± 0,76 (16,80-18,6)	16,05 ± 0,5 (15,6-16,8)
EWU-40	3,60 ± 0,11 (3,45-3,75)	1,50 ± 0,11 (1,35-1,65)	6,86 ± 0,89 (5,40-7,65)	6,64 ± 0,16 (6,45-6,90)	7,65 ± 0,26 (7,50-8,10)	11,03 ± 0,39 (10,50-11,40)	10,99 ± 0,53 (10,22-11,55)
EWU-60	4,54 ± 0,12 (4,35-4,65)	3,38 ± 0,31 (3,15-3,90)	7,84 ± 0,16 (7,65-8,10)	9,45 ± 0,11 (9,30-9,60)	11,74 ± 0,16 (11,55-12,00)	13,76 ± 0,78 (12,90-15,00)	13,54 ± 0,27 (13,20-13,80)

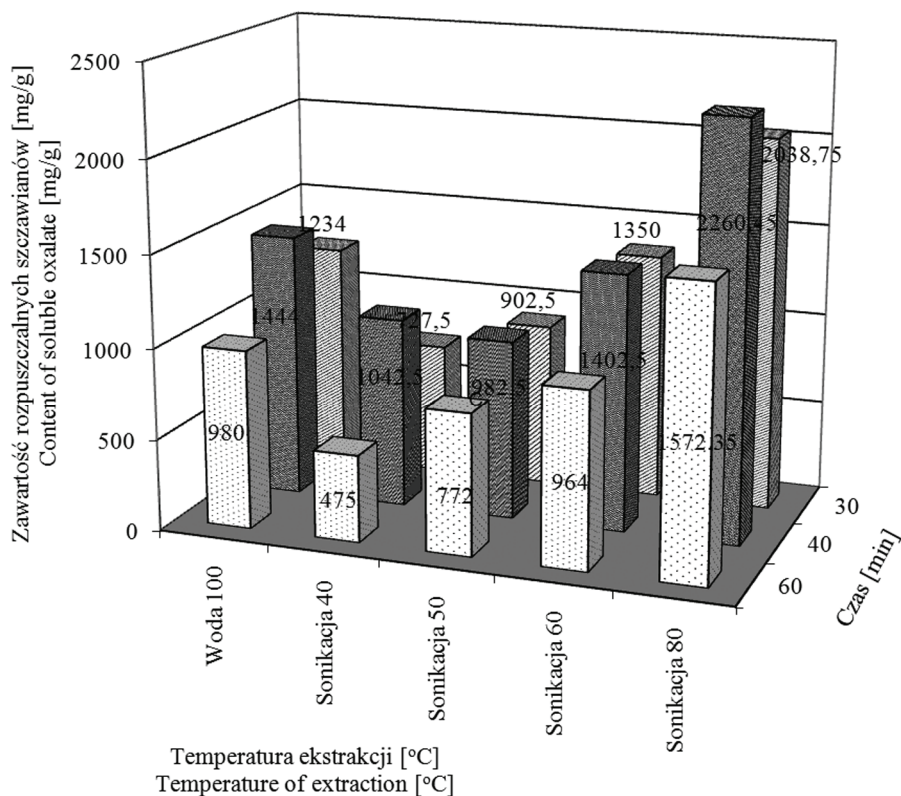
Objaśnienia: / Explanatory notes:

a – kwiaty/kwiatostan / flowers/inflorescence; b – owoce / fruits; c – liście / leaves; d – całe ziele / whole plant;

Pozostałe oznaczenia jak pod tab. 2 / All other explanatory notes as in Tab. 2.

Generalnie, w odniesieniu do herbat i herbatek, najmniejszą wydajnością uwalniania szczawianów do naparu charakteryzowała się metoda ekstrakcji EWU-40, czyli wspomagana ultradźwiękami w temp. 40 °C. Dotyczy to większości badanych herbatek ziołowych, w których po zastosowaniu metody EWU-40 zamiast metody tradycyjnej EWW, nastąpił spadek zawartości szczawianów w naparze o ok. 20 - 40 %, za wyjątkiem herbatki ziołowej rumiankowej i miętovej (tab. 3). W tych dwóch ostatnich przypadkach po zastosowaniu metody EWU-40 stwierdzono ok. 10 - 12 % wzrost zawartości szczawianów, tj. w herbatce rumiankowej z 9,71 (metoda EWW) do 10,99 mg/g s.m. (metoda EWU-40) oraz w herbatce miętovej z 9,52 (EWW) do 11,08 mg/g s.m. (EWU-40). Podobny efekt, czyli 30 - 50 % wzrost zawartości rozpuszczalnych szczawianów w naparze, zaobserwowano w przypadku dwóch herbat zielonych, czyli „Jaśminowej” (liściasta) i „Bio-Active” (saszetki) (tab. 3). Natomiast w przypadku herbat zielonych „Gunpowder” (liściastej) oraz „Sir Roger” (saszetki) sonikacja EWU-40 okazała się o wiele mniej skuteczna ze względu na ilość uzyskiwa-

nych w naparze rozpuszczalnych szczawianów. W zastosowanej trzeciej metodzie ekstrakcji EWU-60 (sonikacja w temp. 60 °C) uzyskano w większości herbat zielonych i herbatek ziołowych wyniki zbliżone do rezultatów oznaczania rozpuszczalnych szczawianów w naparach uzyskanych z zastosowaniem ekstrakcji EWPM, czyli po zastosowaniu ekstrakcji z mikrofalowaniem w temp. 80 °C.



Rys. 2. Zmiany zawartości rozpuszczalnych szczawianów (RSZ) w naparach herbaty zielonej liściastej „Gunpowder” w zależności od zastosowanej metody ekstrakcji wodą o temp. 100 °C (EWW) lub ekstrakcji wspomaganą ultradźwiękami (EWU) w czterech różnych temperaturach (40, 50, 60, 80 °C) oraz od czasu chłodzenia (w temp. -6 °C) wytrąconego z naparu herbaty osadu szczawianu wapnia.

Fig. 2. Changes in the content of soluble oxalates (SO) in the water infusions of „Gunpowder” green tea (mg/g) depending on both the extraction procedure used, i.e. either boiling water extraction at 100 °C (EWW) or ultrasound supported extraction (EWU) at four different temperatures (40, 50, 60, 80 °C) and the cooling time at -6 °C of calcium oxalate precipitated from the final infusion.

Biorąc pod uwagę postać badanych herbat i herbatek, stwierdzono, że – niezależnie od zastosowanej w badaniach metody ekstrakcji – grupą produktów o największej średniej zawartości rozpuszczalnych szczawianów są herbaty zielone liściaste („Gunpowder”, „Zielona z cytryną”) oraz herbatki ziołowe z liści, tj. herbatki z pokrzywy, szalwi i mięty (tab. 2 i 3).

W przypadku zastosowania tradycyjnej metody ekstrakcji EWW największą zawartością rozpuszczalnych szczawianów odznaczał się napar herbaty zielonej „Gunpowder” (12,44 mg/g s.m.) oraz „Zielona z cytryną” (8,39 mg/g s.m.), mniejsze ilości szczawianów oznaczono w herbatach zielonych ekspresowych, zawierających mocno zdeintegrowane części roślin o niezdefiniowanym pochodzeniu, jakie zostały użyte do ich produkcji, np. „Bio-Active” (4,20 mg/g s.m.) oraz „Vitax” (6,30 mg/g s.m.).

Wszystkie użyte w badaniach herbatki ziołowe miały postać tzw. herbatek ekspresowych w jednorazowych saszetkach, z tą różnicą, że surowiec stanowiły różne części roślin: liście, kwiatostany, owoce lub całe rośliny. W przypadku zastosowania tradycyjnej metody ekstrakcji EWW największą ilość szczawianów oznaczono w przypadku herbatek ziołowych liściastych, tj. mięty (9,58 mg/g s.m.), szalwii (13,13 mg/g s.m.) oraz pokrzywy (10,13 mg/g s.m.). Zdecydowanie mniejsze wartości RSZ uzyskano w herbatce z owocu kopru włoskiego (2,48 mg/g s.m.) oraz w herbatce z lipy (4,88 mg/g s.m.). Odstępstwo od tej reguły wykazywały koszyczki rumianku, które charakteryzowały się stosunkowo dużą zawartością rozpuszczalnych szczawianów w naparze uzyskanym metodą EWW na poziomie 9,71 mg/g s.m. (tab. 3).

Analiza statystyczna wyników ( $N = 486$ ) wykazała, że oznaczone średnie zawartości rozpuszczalnych szczawianów w badanych naparach różnią się istotnie ze względu na postać handlową produktu ( $p = 0,0001$ ), rodzaj herbaty ( $p = 0,0099$ ), jak i sposób zastosowanej ekstrakcji ( $p = 0,0001$ ).

W nielicznych opublikowanych dotychczas rezultatach badań dotyczących zawartości rozpuszczalnych szczawianów w naparach herbatek ziołowych, otrzymanych tradycyjną metodą ekstrakcji EWW, w przypadku herbatki miętovej uzyskano wyniki w zakresie od 0,2 do 0,7 mg/100 g s.m. [9], z zastrzeżeniem, że zastosowano nie tylko inną metodę analityczną (wysokosprawną chromatografię cieczową, HPLC), ale także niższą temperaturę wody do ekstrakcji EWW (70 °C, przez 5 min) oraz mniejszą naważkę próbki, tj. 1,25 g na 200 cm<sup>3</sup> naparu. W tych samych badaniach, dotyczących produktów oferowanych w Niemczech, średnia zawartość rozpuszczalnych szczawianów wynosiła: 0,3 mg/100 g s.m. w herbatce rumiankowej (naważka 1,5 g), 1,3 mg/100 g s.m. w herbatce z kopru (3,5 g), 41,2 mg/100 g s.m. w herbatce z szalwi (liście) i 0,6 mg/100 g s.m. w herbatce „owocowej” o niezdefiniowanym składzie (naważka 3,0 g) [9]. W badaniach Charriera i wsp. [3] oznaczona metodą HPLC średnia zawartość rozpuszczalnych szczawianów w naparach sporządzonych metodą EWW w temp. 90 °C (250 cm<sup>3</sup>, 5 min) wynosiła: 0,21 mg/g w ekspresowej herbatce mięto-

wej, od 0,34 do 0,74 mg/g w rumiankowej, 0,12 mg/g w hibiskusowej i od 0,19 do 3,00 mg/g w herbatce z czarnej porzeczki [3]. W badaniach Tsai i wsp., przy użyciu testów enzymatycznych wykorzystujących bakteryjną oksydazę szczawianową, średnia zawartość szczawianów w herbatkach ziołowych dostępnych na Tajwanie wynosiła 3,375 mg/100 g s.m. [22]. Według McKay i wsp. [16] w ekspresowych herbatkach ziołowych oferowanych w Kanadzie zawartość rozpuszczalnych szczawianów w świeżo sporządzonym naparze (wrząca woda – 250 cm<sup>3</sup>, 5 min) wynosiła 6,93 mg/dm<sup>3</sup> w herbatce miętovej, 4,95 mg/dm<sup>3</sup> w herbatce z rumianku (kwiatostan) oraz 47,97 mg/dm<sup>3</sup> w herbatce z dzikiej róży. Wyniki te uzyskano stosując do oznaczania szczawianów metodę enzymatyczną.

Opublikowane dotychczas wyniki badań nt. zawartości rozpuszczalnych szczawianów w naparach zielonej herbaty są często nieporównywalne i rozbieżne ze względu na różnorodność stosowanych warunków przygotowania naparów metodą EWW [3, 17], niustalonego wpływu obecności substancji przeszkadzających [9], jak i niejednolitej metodyki oznaczania tego związku [3, 9, 17, 22]. Według Charriera i wsp. [3] w Nowej Zelandii średnia zawartość rozpuszczalnych szczawianów w naparach herbat zielonych sprządzonych metodą EWW w temp. 90 °C (przez 5 min) wynosiła 0,68 mg/g s.m. (zakres od 0,24 do 1,15 mg/g s.m.). W herbatach zielonych sprzedawanych na Tajwanie średnia zawartość szczawianów oznaczona metodą enzymatyczną wynosiła 4,59 mg/100 g s.m. [22]. W obszernych badaniach Honow i Hessego [9] ustalono, że średnia zawartość rozpuszczalnych szczawianów w naparach zielonej herbaty sprzedawanej na terenie Niemiec wynosiła 6,3 mg/100 g s.m. (zakres od 0,9 do 19,6 mg/100 g s.m.), przy czym wykorzystano naważkę 1,75 g zielonej herbaty i 200 cm<sup>3</sup> wody do sporządzenia naparu, a ekstrakcję EWW prowadzono w temp. 70 °C przez 5 min. Według Massey'a zawartość rozpuszczalnych szczawianów mieści się w zakresie od 6 do 26 mg na 100 cm<sup>3</sup> tradycyjnie sporządzanego naparu zielonej herbaty [15]. Według McKay i wsp. [16] w ekspresowych herbatach zielonych oferowanych w Kanadzie zawartość rozpuszczalnych szczawianów w świeżo sporządzonym naparze (wrząca woda, 250 cm<sup>3</sup>, 5 min) wynosiła 47,97 mg/dm<sup>3</sup> (metoda enzymatyczna). Natomiast Noonan i wsp. [17] podają, że zawartość rozpuszczalnych szczawianów w zielonej herbacie może zawierać się w przedziale od 300 do 2000 mg/100 g s.m.

Pomimo tego, że herbaty zielone i herbatki ziołowe zaliczane są przez żywieniowców w wielu krajach do środków spożywczych o małej (poniżej 2 mg) i średniej (od 2 do 10 mg) zawartości rozpuszczalnych szczawianów w porcji 250 cm<sup>3</sup> napoju [3, 8, 15, 17], a biodostępność kwasu szczawowego z takich produktów nie przekracza 5 - 6 % [15, 17, 21], to niniejsze badania wskazują, że codzienne spożycie zarówno herbat zielonych, jak i herbatek ziołowych, pomimo ich wielu cennych właściwości prozdrowotnych, powinno być ograniczone do 2,5 litra z uwagi na potencjalnie niekorzystne skutki zdrowotne spożycia nadmiaru szczawianów zawartych w tych naparach [3, 9,

15, 16, 17]. Dotyczy to szczególnie herbat zielonych pozyskiwanych często z niepełnowartościowego i niestandardyzowanego surowca roślinnego.

### Wnioski

1. Na zawartość oznaczanych rozpuszczalnych szczawianów w herbatach ma wpływ sposób przygotowywania naparu (metoda ekstrakcji). W większości przypadków badane herbaty zielone i herbatki ziołowe zaparzone metodą ekstrakcji wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym (EWPM) charakteryzowały się większą zawartością szczawianów w porównaniu z naparami uzyskanymi metodą tradycyjną (wrzątek) lub metodą z wykorzystaniem ekstrakcji wspomaganą ultradźwiękami.
2. Największą średnią zawartość rozpuszczalnych szczawianów oznaczono w naparach uzyskanych metodą ekstrakcji wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym w temp. 80 °C (EWPM) w herbatach zielonych liściastych (14,89 mg/g s.m. „Gunpowder”, 14,36 mg/g s.m. „Jaśminowa”). Mniejszą zawartością charakteryzowały się napary uzyskane tą samą metodą z tzw. herbat zielonych ekspresowych w saszetkach, np. „Vitax” 7,73 mg/g s.m.
3. Herbaty i herbatki liściaste, zarówno zielone, jak i ziołowe, charakteryzują się wyższą zawartością rozpuszczalnych szczawianów, w porównaniu z herbatami i herbatkami uzyskanymi z innych części roślin, co wynika z anatomicznego rozmieszczenia szczawianów w roślinie. Wynik taki uzyskano niezależnie od zastosowanego w przeprowadzonych badaniach sposobu ekstrakcji.
4. Ze względu na zawartość rozpuszczalnych szczawianów, objętość i ilość spożywanych w ciągu dnia naparów herbatek ziołowych, jak i herbat zielonych powinna być kontrolowana i limitowana, zwłaszcza w przypadku osób chorych z zaburzeniami funkcjonowania nerek i ze skłonnościami do występowania kamicy nerkowej.

### Literatura

- [1] Caliskan M.: The metabolism of oxalic acid. Turk. J. Zool., 2000, **24**, 103-106.
- [2] Chang Ch. J., Chiu K. L., Chen Y. L., Chang Ch. Y.: Separation of catechins from green tea using carbon dioxide extraction. Food Chem., 2000, **68**, 109-113.
- [3] Charrier M.S., Savage G.P., Vanhanen L.: Oxalate content and calcium binding capacity of tea and herbal teas, Asia Pacific J. Clin. Nutr., 2002, **11** (4), 298-301.
- [4] Dmowski P., Śmiechowska M.: Wykorzystanie włókna surowego do wykrywania zafałszowań w herbacie. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2008, **3** (58), 116-122.
- [5] Galli V., Barbas C.: Capillary electrophoresis for the analysis of short-chain organic acids in coffee. J. Chromatogr. A, 2004, **1032**, 299-304.
- [6] Gasińska A., Gajewska D.: Tea and coffee as the main sources of oxalate in diets of patients with kidney oxalate stones. Roczn. PZH, 2007, **58** (1), 61-67.
- [7] Gawęda M.: Zawartość szczawianów w roślinach szczawiu zwyczajnego (*Rumex acetosa L.*), pozyskiwanego ze stanowisk naturalnych. Roczn. Akad. Rol. w Poznaniu, 2007, **383**, 471-475.

- [8] Holmes R.P., Assimos D.G.: The impact of dietary oxalate on kidney stone formation. *Urol. Res.*, 2004, **32** (5), 311-316.
- [9] Honow R., Hesse A.: Comparison of extraction methods for the determination of soluble and total oxalate in foods by HPLC-enzyme-reactor. *Food Chem.*, 2002, **78**, 511-521.
- [10] Jabłonowski W.: Zawartość szczawianów w niektórych roślinnych produktach żywnościowych. *Rocz. PZH*, 1964, **15** (4), 411-420.
- [11] Jin Y., Jin Ch. H., Row K. H.: Separation of catechin compounds from different teas. *Biotechnol. J.*, 2006, **1**, 209-213.
- [12] Kim Y. E., Hong S. H., Kim J. W., Lee J. Y.: Evaluation of Fourier transform near-infrared spectrometer for determination of oxalate in standard urinary solution. *L. Prev. Med. Public. Health.*, 2006, **39** (2), 165-170.
- [13] Krawczyk P., Drużyńska B.: Porównanie oznaczania zawartości katechin w liściach zielonej i czarnej herbaty metodą wanilinową i metodą HPLC. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2008, **3** (58), 116-122.
- [14] Lane B.G.: Oxalate, germin, and the extracellular matrix of higher plant. *FASEB J.*, 1994, **8** (3), 294-301.
- [15] Massey L.K.: Food oxalate: Factors affecting measurement, biological variation, and bioavailability. *J. Am. Diet. Assoc.*, 2007, **107** (7), 1191-1194.
- [16] McKay D., Seviour P., Comerford A., Vasdev S., Massey M.K.: Herbal tea: An alternative to regular tea for those who form calcium oxalate stones, *J. Am. Diet. Assoc.*, 1995, **95** (3), 360-361.
- [17] Noonan S.C., Savage G.P.: Oxalate content of foods and its effect on humans. *Asia Pacific J. Clin. Nutr.*, 1999, **8** (1), 64-74.
- [18] Ohkawa H.: Gas chromatographic determination of oxalic acid in foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1985, **68** (1), 108-111.
- [19] Perez-Ruiz T., Martinem-Lozano C., Tomas V., Fenoli J.: Chemiluminescent determination of oxalate based on its enhancing effect on the oxidation of methyl red by dichromate. *Anal. Chim. Acta*, 2005, **552** (1-2), 147-151.
- [20] Row K. H., Jin Y.: Recovery of catechin compounds from Korean tea by solvent extraction. *Biore-sour. Technol.*, 2006, **97**, 790-793.
- [21] Savage G.P., Charrier M.J.S., Vanhanen L.: Bioavailability of soluble oxalate from tea and the effect on consuming milk with the tea. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 2003, **57** (3), 415-419.
- [22] Tsai J.Y., Huang J.K., Wu T.T., Lee Y.H.: Comparison of oxalate content in foods and beverages in Taiwan. *J. Taiwan Urol. Assoc.*, 2005, **16** (3), 93-98.
- [23] Yoshida Y., Kiso M., Goto T.: Efficiency of the extraction of catechins from green tea. *Food Chem.*, 1999, **67**, 429-433.

#### EFFECT OF EXTRACTION CONDITIONS ON THE SOLUBLE OXALATE CONTENT IN WATER INFUSIONS OF GREEN AND HERBAL TEAS

##### S u m m a r y

The objective of this research was to compare the content of soluble oxalates (SO) in water infusions of green and herbal teas made using four different extraction procedures, i.e. a traditional extraction procedure with boiling water of 100°C, a microwave radiation supported extraction at 80 °C (EWPM), and an ultrasound supported extraction at 40°C (EWU-40) and at 60 °C.

The average SO content in the water infusions analyzed, determined by a manganometric method, was the highest after the microwave EWPM procedure of extraction was applied; it ranged from 7.73 to 14.89 mg/g (dry mass) as for the green teas and from 3.53 to 18.11 mg/g as for the herbal teas. The lowest values were obtained after the use of ultrasound EWU-40 procedure; those values ranged from 5.06 to 10.88 mg/g as for green teas, and from 1.5 to 11.03 mg/g as for herbal teas. In the case of herbal teas delivered for the analysis in tea bags for instant brewing, a significant dependency was found between the SO amounts determined and the kind of anatomical parts of the initial raw material. Similarly to the green teas, the water infusions prepared from whole herbal tea leaves with the use of EWPM procedure were characterized by the highest SO content, for example: peppermint tea: 18.11 mg/g; sage tea: 12.23 mg/g; and nettle tea: 11.76 mg/g. In the case of fennel fruit (seed) tea, the content of soluble oxalate determined was at a level of 3.53 mg/g of dry matter of the product, and in the case of linden inflorescence tea: at a level of 4.01 mg/g of dry matter. The exception in this group was the camomile inflorescence tea with a 16.05 mg/g of SO content determined. The results obtained can be applied to standardize analytical procedures used to determine SO contents in imported green teas and local herbal teas for such purposes as: identification of the country and region of origin of a given tea; fixing the harvesting period and determining the type of production process; finding admixtures and stating/excluding falsification; verifying the declared expiration date; and confirming the healthful properties (quality) of those products.

**Key words:** oxalic acid, oxalates, green tea, herbal tea, extraction, microwave radiation, ultrasounds 